



Nouveaux rôles du régulateur de l'immunité MYB30 dans le développement d'*Arabidopsis thaliana*

Vincent Duplan

► To cite this version:

Vincent Duplan. Nouveaux rôles du régulateur de l'immunité MYB30 dans le développement d'*Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30374 . tel-02454521

HAL Id: tel-02454521

<https://theses.hal.science/tel-02454521>

Submitted on 24 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.



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Université Toulouse-III-Paul Sabatier

Présentée et soutenue par :
Vincent Duplan

Le vendredi 15 décembre 2017

Titre :
Nouveaux rôles du régulateur de l'immunité MYB30
dans le développement d'*Arabidopsis thaliana*

École doctorale et discipline ou spécialité :
ED SEVAB : Interactions plantes-microorganismes

Unité de recherche :
Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM)

Directrice de Thèse :
Dr Susana Rivas, Directrice de Recherche, CNRS, Toulouse

Jury :
Dr Sébastien Mongrand, Directeur de Recherche CNRS, LBM, Bordeaux (Rapporteur)
Dr Bertrand Dubreucq, Directeur de Recherche INRA, IJPB, Versailles (Rapporteur)
Dr Julia Buitink, Directrice de Recherche INRA, IRHS, Angers (Examinatrice)
Dr Vincent Burlat, Professeur Université de Toulouse III, LRSV, Toulouse (Examinateur)
Dr Susana Rivas, Directrice de Recherche CNRS, LIPM, Toulouse (Directrice de thèse)

***B**iology is the study of complicated
things that give the appearance of
having been designed for a purpose.*

A handwritten signature in green ink, reading "Richard Dawkins". The signature is stylized with a large initial 'R' and a prominent 'D'.

Richard Dawkins

Table des matières

Liste des abréviations.....	1
-----------------------------	---

Chapitre 1. Introduction.....	4
--------------------------------------	----------

1.1. La cuticule des plantes	5
1.1.1. Une innovation essentielle à la colonisation du milieu terrestre	5
1.1.2. Structure et composition	5
1.1.3. Biosynthèse de la cuticule	9
1.1.4. Régulation de la biosynthèse de la cuticule	14
1.2. La cuticule embryonnaire.....	16
1.2.1. Le développement de la graine d'Arabidopsis	16
1.2.2. La mise en place de la cuticule embryonnaire	21
1.3. Rôles biologiques de la cuticule.....	27
1.3.1. La cuticule dans le développement	27
1.3.2. L'effet Lotus	28
1.3.3. Protection contre la perte en eau.....	29
1.3.4. Protection contre les UV.....	30
1.3.5. Protection contre l'attaque des agents pathogènes	30
1.4. Les réponses immunitaires	33
1.4.1. La PTL.....	33
1.4.2. L'ETI.....	34
1.4.3. Régulation transcriptionnelle des réponses de défense	36
1.5. MYB30, un régulateur positif de la réponse hypersensible.....	37
1.5.1. Les facteurs de transcription de type MYB	37
1.5.2. Fonctions des FT de type MYB.....	39
1.5.3. La sous-famille MYB-R2R3 S1	40
1.5.4. Rôle de MYB30 dans l'immunité.....	43
1.5.5. Rôles de MYB30 dans d'autres processus	45
1.5.6. Régulation de MYB30.....	47
1.6. Contexte scientifique du projet de thèse.....	58
1.6.1. Un rôle pour GSO1 et GSO2 dans l'immunité?.....	58
1.6.2. Un rôle pour MYB30 dans la formation de la cuticule embryonnaire?	58
1.7. Objectifs du projet de thèse.....	61

Chapitre 2. Une voie de signalisation inter-compartimentale reliée à la défense régule l'intégrité de la cuticule embryonnaire chez Arabidopsis.....	62
---	-----------

Chapitre 3. MYB30 est impliqué dans la formation de la cuticule embryonnaire chez <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	122
---	------------

3.1. Résultats.....	123
3.1.1. MYB30 est exprimé dans les cellules épidermiques des embryons en	

développement.....	123
3.1.2. MYB30 est requis pour l'intégrité de la cuticule embryonnaire.....	125
3.1.3. MYB30 contrôle l'expression de gènes de biosynthèse de la cuticule pendant l'embryogenèse.....	128
3.1.4. La dérégulation de <i>MYB30</i> impacte la production de cutine	132
3.1.5. Les expressions de <i>MYB30</i> et <i>GSO2</i> sont interdépendantes pendant le développement de l'embryon	134
3.1.6. MYB30, GSO1 et GSO2 agissent dans la même voie pour établir la formation de la cuticule embryonnaire.....	135
3.2. Discussion.....	140
3.2.1. Un nouveau rôle pour MYB30 dans la biosynthèse de la cuticule embryonnaire	140
3.2.2. MYB30 active l'expression de gènes de biosynthèse de la cuticule pendant l'embryogenèse	144
3.2.3. MYB30 régule la production de cutine	149
3.2.4. MYB30, un nouveau composant de la voie ECF en aval de GSO1/2?.....	150
3.3. Matériel et Méthodes	153

Chapitre 4. Un rôle potentiel pour MYB30 dans l'élongation cellulaire 156

4.1. Résultats.....	157
4.1.1. La dérégulation de <i>MYB30</i> affecte la longueur de l'hypocotyle des plantules étiolées.....	158
4.1.2. La dérégulation de <i>MYB30</i> affecte la longueur des cellules de l'hypocotyle	159
4.1.3. L'aspect de surface du mutant <i>myb30-02</i> n'est pas altéré.....	159
4.1.4. Le mutant <i>myb30-02</i> présente des dépôts de callose ectopiques	161
4.1.5. Le mutant <i>myb30-02</i> ne montre pas de défaut de synthèse de cellulose	162
4.2. Discussion.....	164
4.2.1. La dérégulation de <i>MYB30</i> affecte l'élongation des cellules des hypocotyles étiolés	164
4.2.2. Le mutant <i>myb30-02</i> présente des dépôts de callose ectopiques mais ne montre pas de résistance à l'isoxaben.....	166
4.3. Matériel et Méthodes	168

Chapitre 5. La protéine E3 ubiquitine-ligase MIEL4 est requise pour le développement embryonnaire..... 170

5.1. Résultats et Discussion.....	171
5.1.1. Le gène <i>MIEL4</i> est requis pour le développement de l'embryon.....	174
5.1.2. Le rôle de MIEL4 sur le développement embryonnaire n'est pas dépendant de la présence de MYB30	175
5.1.3. La construction <i>pLEC2:MIEL4</i> ne suffit pas à compléter la létalité des	

embryons <i>miel4-07</i>	175
5.1.4. Le gène <i>MIEL4</i> est épissé de manière alternative	177
5.2. Matériel et Méthodes	179
Chapitre 6. Discussion générale et perspectives	180
Bibliographie	185
Abstract.....	206
Résumé.....	207

Liste des abréviations

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
aa	Acide aminé
ABA	Acide abscissique
ABC	ATP binding cassette
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADN-T	ADN de transfert
AG	Acide gras
ALE1	ABNORMAL LEAF SHAPE1
AP2	APETALA 2
ARF	ADP-ribosylation factor
ARN	Acide RiboNucléique
Asn	Asparagine
ATP	Adénosine TriPhosphate
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
BDG	BODYGUARD
BES1	BRI1-ETHYLMETHANE SULPHONATE SUPPRESSOR 1
BR	Brassinostéroïdes
BT	Bleu de Toluidine
C	Carbone
<i>cer</i>	<i>eceriferum</i>
CESA	Cellulose synthase
ChIP	Immunoprécipitation de chromatine
CoA	Coenzyme A
Col	Écotype Columbia-0 d' <i>A. thaliana</i>
CUS	CUTINE SYNTHASE
DAMP	Motifs moléculaires associés aux dommages
DCA	Acides dicarboxyliques
ECR	Enoyl-coa reductase
ET	Ethylène
ETI	Effector-triggered immunity
FAE	Complexe d'élongation des acides gras (Fatty Acid Elongase Complex)
FAR	Alcohol-forming fatty acyl-CoA reductase
FAS	Complexe de synthèse des acide gras (Fatty Acid Synthase)
FDH	FIDDLEHEAD
FLS2	FLAGELLIN SENSING2
FT	Facteur de transcription
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GDSL	Séquence consensus d'acides aminés Gly, Asp, Ser et Leu
GFP	Green Fluorescent Protein
GK	Gabikat
GO	Gene Ontology
GPAT	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
GSO	GASSHO
GUS	β -glucuronidase
HCD	HCD β -hydroxy acyl-coa déshydratase
HIS	Hybridation <i>in situ</i>
HR	Réponse hypersensible
HTH	HOTHEAD
JA	Acide jasmonique
KAS	Keto-acyl-ACP-synthase
KCR	β -ketoacyl-CoA reductase
KCS	β -ketoacyl-CoA synthase
kDa	kilo Dalton
KOR	KORRIGAN
LACS	Long Chain acetyl-CoA synthetase
LEC2	LEAFY COTYLEDON 2
LRR	Domaine riche en leucine (Leucine rich repeat)
LTP	Lipid Transfer Protein
LTPG	Protéine de transfert de lipides à ancre GPI
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i>
MAMP/PAMP	Motifs moléculaires associés aux microbes ou pathogènes
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique en transmission
MIEL	MYB30-INTERACTING E3 LIGASE
MPT	Modification post-traductionnelle
MS	Murashige et Skoog
MYB	MYB Myeloblastosis
NB-LRR	Nucleotide-binding/leucine-rich-repeat
<i>P. Syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PPR	Pattern recognition receptors
PTI	PRR-triggered immunity
qPCR	PCR quantitative
RE	Réticulum Endoplasmique
RING	Really interesting new gene
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SA	Acide salicylique
TAE	Tris-acetate EDTA
Ub	Ubiquitine

UV	Ultra-Violet
VLCFA	Acides gras à très longue chaîne (Very Long Chain Fatty Acid)
WSD1	WAX SYNTHASE/ACYL-COA :DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE 1
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i>
ZOU	ZHOUP

Chapitre 1

Introduction

1.1. La cuticule des plantes

1.1.1. Une innovation essentielle à la colonisation du milieu terrestre

L'origine des plantes est très ancienne, elle remonte au Méso- ou Néoprotérozoïque (il y a entre 700 et 1 500 millions d'années) où l'ancêtre de la « lignée verte » évoluait dans les océans. Au cours de leur évolution les plantes colonisèrent les eaux douces puis la terre ferme, il y a environ 450 millions d'années, donnant naissance aux plantes terrestres (Leliaert *et al.*, 2011). Cet événement évolutif clé pour la vie sur Terre, associé à la diversification des plantes, a profondément modifié l'environnement terrestre. Ce nouvel habitat où les rayons du soleil ne sont plus filtrés par l'eau apporta un atout considérable aux plantes pour développer leur activité photosynthétique. Néanmoins, les premières plantes terrestres ont dû alors faire face à d'importants défis tels que la dessiccation, les températures extrêmes, la gravité, l'exposition aux radiations UV ou encore l'attaque par de nouveaux micro-organismes pathogènes. Cela a entraîné l'évolution de nouvelles caractéristiques chez ces plantes, telle que la cuticule. La cuticule est une couche lipidique hydrophobe translucide, recouvrant les cellules épidermiques des parties aériennes de la plante, leur permettant de retenir l'eau dans des habitats de plus en plus secs. L'apparition de la cuticule fut donc un trait adaptatif vital pour la terrestrialisation et sans doute une des innovations les plus importantes dans l'histoire de l'évolution des plantes.

1.1.2. Structure et composition

La cuticule est présente chez tous les végétaux mais varie dans sa composition, son épaisseur (20 nm à 200 μ m), ou son organisation en fonction des espèces, des organes, du stade de développement de la plante ou des conditions environnementales. Sur les feuilles, la cuticule recouvre à la fois la face adaxiale et abaxiale (Figure 1.1A) (Jeffree, 2006).

D'un point de vue structurel, la cuticule est complexe, composée majoritairement de molécules de **cutine** liées de manière covalente, et de lipides de nature variable appelés **cires**. Bien qu'elle soit généralement considérée séparément de la paroi cellulaire polysaccharidique, ces deux structures sont liées physiquement. La cuticule est souvent organisée en deux parties : une couche sous-jacente de cutine dans laquelle s'enchevêtrent des polysaccharides de la paroi appelée en anglais « *cuticular layer* » et une couche externe riche en cutine et en cires appelée « *cuticle proper* » (Figure 1.1A et B). Les cires peuvent être soit intégrées à la matrice de cutine (cires intracuticulaires), soit déposées à la surface (cires épicuticulaires), sous la forme d'un film ou de cristaux (Figure 1.1C). Les films de cires épicuticulaires sont par exemple responsables de l'aspect brillant des feuilles et des fruits tandis que les cristaux de cires causent l'aspect terne des feuilles du brocoli ou des tiges d'*Arabidopsis* (Yeats and Rose, 2013). Par ailleurs, la cuticule est généralement plus épaisse au-dessus des cellules anticlinales (convexes), et s'enfonce profondément entre les parois des cellules adjacentes (Figure 1.1D et E).

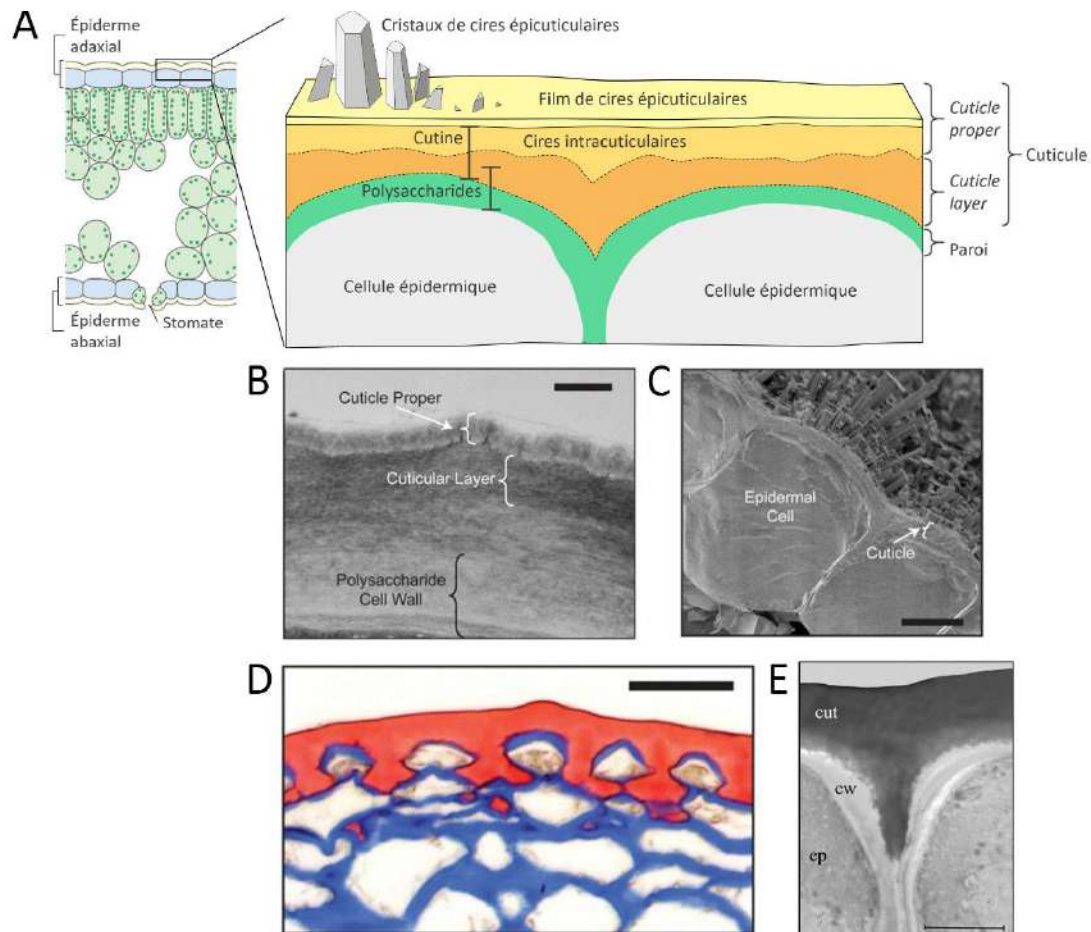


Figure 1.1. Structure de la cuticule

(A) Représentation schématique de la cuticule à la surface d'une feuille. Les différentes caractéristiques structurelles de la cuticule sont indiquées. Les cristaux de cires épicuticulaires ne sont pas toujours présents. (B) Image de microscopie électronique à transmission de la cuticule et de la paroi de cellules épidermiques d'une tige d'*Arabidopsis thaliana*. Echelle = 500 nm. (C) Image de microscopie électronique à balayage de l'épiderme et de sa cuticule d'une feuille d'*Arabidopsis thaliana*, vue en coupe. Echelle = 5 µm. (D) Image en microscopie photonique montrant la cuticule d'un fruit de Tomate au stade vert-mature, coloré au Rouge Sudan et les parois polysaccharidiques colorées au Bleu Alcian. Echelle = 50 µm. (E) Image de microscopie électronique à transmission de l'épiderme d'un fruit de Tomate à un stade de développement précoce. cut: cuticule; cw: paroi; ep: cellule épidermique. Echelle = 5 µm. (A-D : d'après Yeats and Rose, 2013, E : d'après Domínguez *et al.*, 2011)

1.1.2.1. La cutine

Les monomères de cutine sont constitués typiquement d'**acides gras à longues chaînes** contenant 16 ou 18 atomes de carbone (16C ou 18C) hydroxylés (Figure 1.2A). Ils sont liés entre eux par des liaisons esters impliquant la fonction acide d'un monomère et un groupement hydroxyle du monomère voisin, formant ainsi de longues chaînes linéaires. La présence de groupements hydroxyles en milieu de chaîne, ainsi que de glycérol ou d'acides carboxyliques permet également de créer des liaisons entre les monomères de cutine et de former un réseau (Figure 1.2B ; Fich *et al.*, 2016). Grâce à ces liaisons covalentes, la cutine résiste aux dommages mécaniques et forme l'ossature de la cuticule.

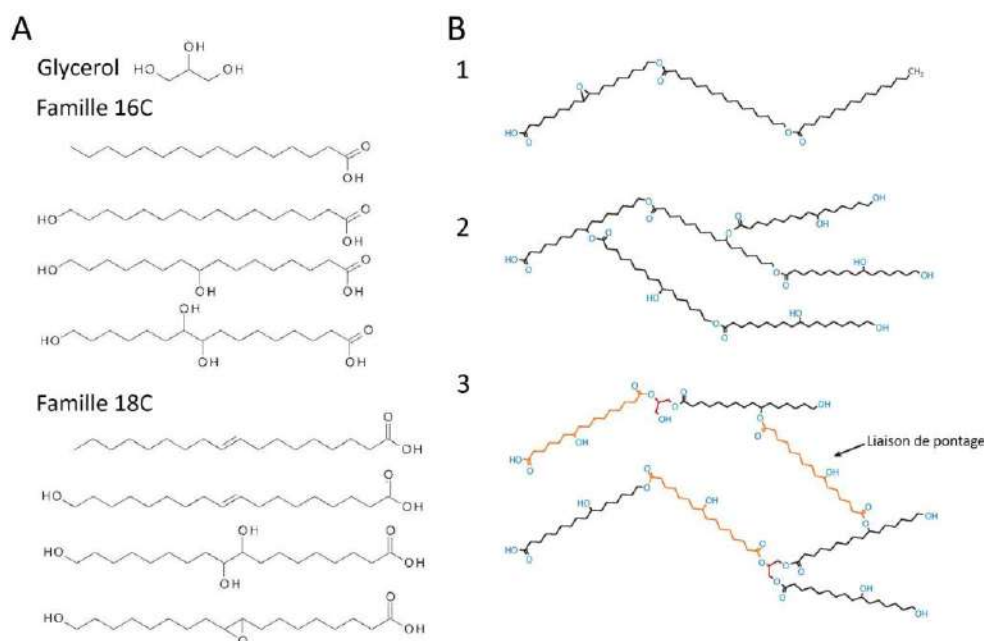


Figure 1.2. Composition de la cutine

(A) Monomères majeurs présents dans les cutines C16 et C18 (d'après Domínguez *et al.*, 2011). **(B)** Différents types de liaisons sont possibles au sein de la cutine (d'après Fich *et al.*, 2016). Trois types de structures moléculaires sont possibles pour la cutine, en fonction des monomères impliqués. **1.** Chaîne linéaire. **2.** Les groupements hydroxyles en milieu de chaîne permettent la formation de réseaux. **3.** Les diacides (en orange) servent de liaisons de pontage entre les différentes chaînes de cutine et permettent l'incorporation de glycérol (en rouge) dans le polymère.

1.1.2.2. Le cutane

Le cutane est un autre biopolymère lipidique qui est présent dans certaines cuticules végétales, soit comme une alternative ou en combinaison avec la cutine. Il est composé de chaînes alkyles, principalement liées par des liaisons éther. Les relations entre le cutane et la cutine semblent complexes et restent encore peu documentées de par la difficulté d'analyse du composé.

1.1.2.3. Les cires

Les cires, quant à elles sont composées d'un mélange complexe de dérivés d'acides gras saturés à très longue chaîne (**VLCFA**), contenant 22 à 48 C (Bernard and Joubès, 2013). Ces composés aliphatiques comprennent des alcanes (C21-C35), des aldéhydes (C24-C36), des cétones (C21-C35), des alcools primaires (C22-C40) et secondaires (C21-C35), mais aussi certains métabolites secondaires tels que des triterpènes, des flavonoïdes et des stérols (Figure 1.3 ; Jetter *et al.*, 2006). Cette diversité importante des cires se caractérise au niveau microscopique par une grande diversité de structures cristallines à la surface des organes (Figure 1.4).

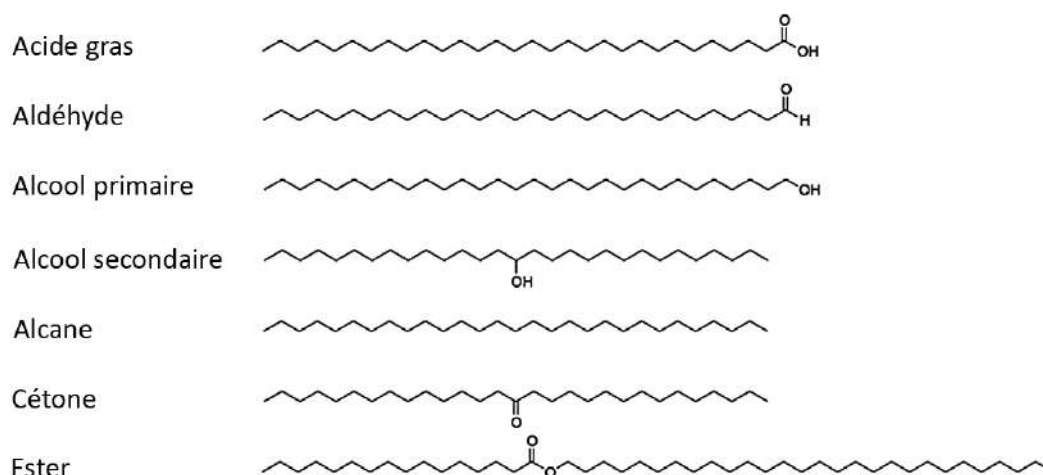


Figure 1.3. Les principales classes de cires cuticulaires (d'après Yeats and Rose, 2013)

La plupart des classes de cires peuvent contenir une grande variété de longueur de chaîne, les composés sont représentés ici comportent une longueur de chaîne carbonée moyenne.

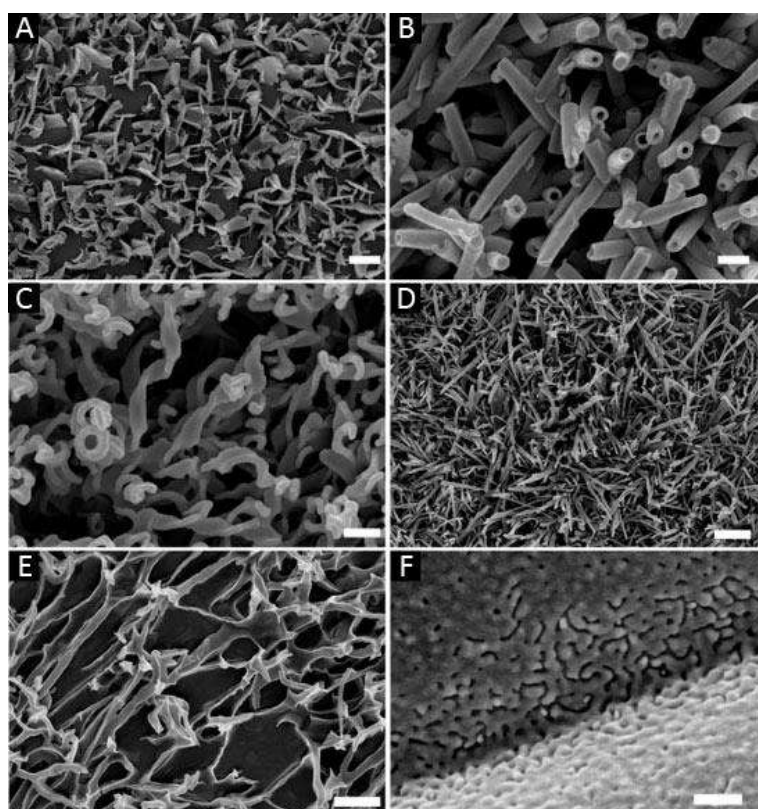


Figure 1.4. Illustration de la variété morphologique des cires épicuticulaires en fonction des espèces (d'après Jeffree, 2006)

Les images ont été prises en microscopie électronique à effet de champs à basse température. **(A)** Surface abaxiale d'une feuille de *Quercus pubescens*, montrant des cristaux de cires plats. Echelle = 1 μm . **(B)** Surface adaxiale d'une jeune feuille de *Mahonia aquifolium*, montrant des tubes creux de type 10 nonacosanol. Echelle = 200 nm. **(C)** Rubans en spirales sur une feuille de *Cerinthe major purpurascens*. Echelle = 200 nm. **(D)** Une couche dense de tubes de β -dicétones sur une feuille de *Hosta sieboldiana*. Echelle = 3 μm . **(E)** Un réseau filamentaire sur la surface abaxiale de *Rosa* sp. Les filaments semblent avoir une coupe transversale en forme de triangle. Echelle = 1 μm . **(F)** Cires formant un film à la surface d'un trichome d'une cosse d'un Laurier de Saint-Antoine (*Chamerion angustifolium*). Echelle = 500 nm.

Les plantes possèdent également d'autres barrières lipidiques protectrices, telles que la subérine ou la sporopollénine. La subérine est relativement similaire à la cutine mais elle est située au niveau de l'endoderme et de l'exoderme des racines, à l'extérieur des téguments de la graine ou encore dans le liège des arbres, tandis que la sporopollénine recouvre la paroi externe (exine) des grains de pollen (Pollard *et al.*, 2008; Samuels *et al.*, 2008).

1.1.3. Biosynthèse de la cuticule

Un grand nombre de gènes codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse ou la régulation de la composition et de la structure de la cuticule ont été identifiés ces vingt dernières années.

La biosynthèse de tous les composants de la cuticule commence par la production d'Acyl-CoA, molécule clé à deux carbones utilisée dans un grand nombre de voies de biosynthèse, produite à partir du citrate, de l'oxydation des acides gras ou bien du pyruvate. Le complexe de synthèse des acides gras ou **FAS**, situé dans le stroma des plastes (Ohlrogge and Browse, 1995), produit les acides gras C16 et C18 en faisant subir à l'Acyl-CoA une succession de cycles permettant l'ajout de 2 atomes de carbone à chaque fois. Chaque cycle comprend quatre réactions: condensation, réduction, déshydratation et réduction. Chaque réaction utilise un groupement Acyl-Carrier-Protein (ACP) comme co-facteur, ce qui résulte en la production de molécules C16-ACP et C18-ACP qui sont ensuite hydrolysées par les acyl-ACP-thioestherases A ou B (FATA ou FATB) qui libèrent un acide gras et un ACP. Ces acides gras C16 et C18 libres sont ensuite activés en acyl-CoA thioesters gras par des enzymes appelées Long-Chain acyl CoA Synthetase (LACS) et finalement exportés en dehors des plastes et transférés vers le réticulum endoplasmique (RE) (Harwood, 2005) où ils vont subir une série de modifications afin de devenir des composants finaux de la cutine ou des cires ([Figure 1.5](#)).

1.1.3.1. Biosynthèse de la cutine

Dans la voie de biosynthèse de la cutine, les acides gras importés des chloroplastes subissent dans le RE une série de modifications qui vont permettre de produire des esters d'acides gras-glycérol oxygénés appelés monoacylglycérols. Bien que l'ordre exact de ces réactions reste incertain, des travaux suggèrent que les acides gras sont d'abord activés par conjugaison avec un CoA, puis hydroxylés avant le transfert du groupement acyl sur un glycérol (Li-Beisson *et al.*, 2009).

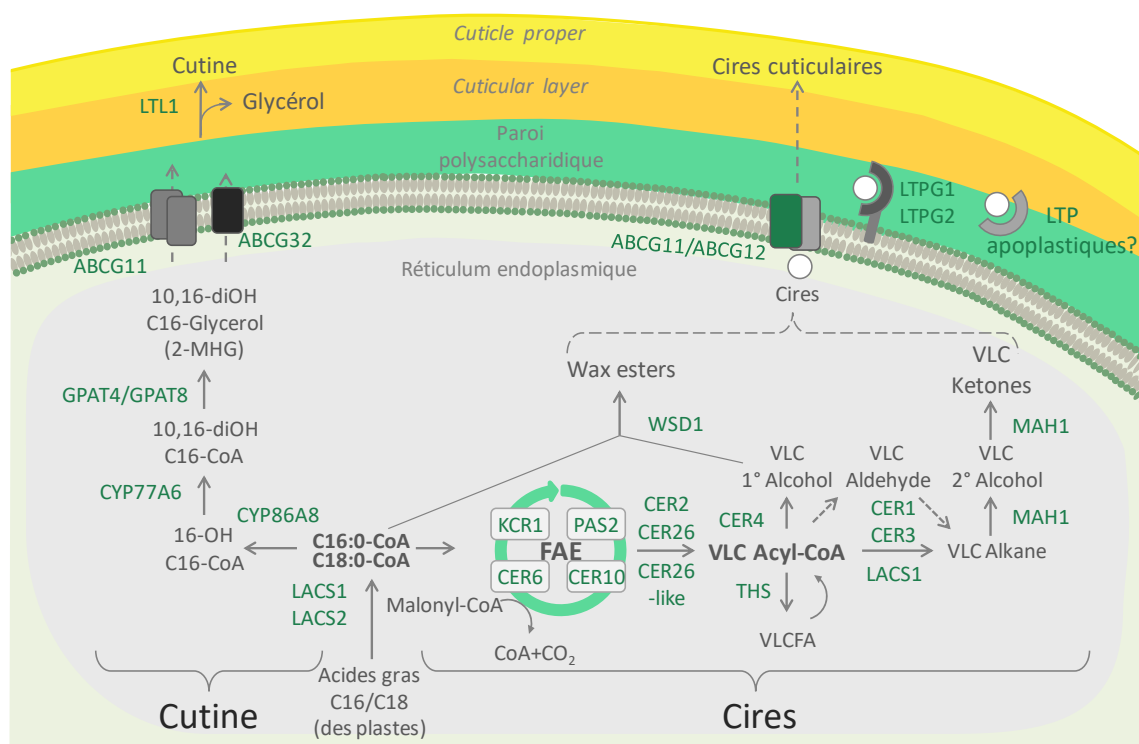


Figure 1.5. Voies de biosynthèse de la cuticule (adapté de Yeats and Rose, 2013)

Les enzymes sont représentées en vert, les composés cuticulaires en gris. Détails dans le texte.

Chez *Arabidopsis*, la cutine des feuilles et des tiges est riche en acides gras dicarboxyliques (DCA) tandis que celle des fleurs est composée majoritairement de polyhydroxyacides, suggérant que la composition des cutines varie entre les différents organes d'une même espèce de plantes (Bonaventure *et al.*, 2004; Franke *et al.*, 2005; Delude *et al.*, 2016).

Les acyltransferases qui synthétisent l'acyl-CoA sont codées par les gènes de la famille **LACS**, qui compte neuf membres chez *Arabidopsis*, et ce sont les protéines LACS1 et LACS2 qui semblent être responsables de la biosynthèse des monomères de cutine C16 (Lü *et al.*, 2009; Schnurr *et al.*, 2004) (Figure 1.5).

L'hydroxylation du carbone terminal et/ou des carbones centraux des acides gras est réalisée respectivement par les sous-familles **CYP86** et **CYP77** de la famille des cytochromes P450. La caractérisation des mutants *lcr* et *att1* a montré que LCR (CYP86A8) et ATT1 (CYP86A2) sont les deux cytochromes P450 majeurs impliqués dans l'hydroxylation des monomères de cutine dans les feuilles et les tiges d'*Arabidopsis* (Wellesen *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2004). Le mécanisme responsable de la conversion en DCA reste incertain mais l'oxydoreductase HOTHEAD (**HTH**) pourrait être impliquée, bien que son expression ne soit pas spécifique de l'épiderme (Krolkowski *et al.*, 2003; Kurdyukov, Faust, Trenkamp, *et al.*, 2006).

De plus, il a été montré qu'une enzyme supplémentaire, une glycerol-3-phosphate acyl-transferase (**GPAT**) est requise pour transférer le groupement acyl sur un glycérol. Chez *Arabidopsis* les enzymes GPAT4 et GPAT8 agissent dans les feuilles et les tiges tandis que GPAT6 agit dans les fleurs (Li *et al.*, 2007; Li-Beisson *et al.*, 2009).

Très récemment, une époxyde hydrolase d'*Arabidopsis* appelée **EH1** a été identifiée comme un nouveau membre de la voie de biosynthèse de la cutine (Pineau *et al.*, 2017). Cette enzyme convertit les époxydes des acides gras à 18 C en glycol et participe donc à la formation des monomères de cutine.

1.1.3.2. Biosynthèse des cires

1.1.3.2.1. Les complexes FAE

Dans le réticulum endoplasmique, la chaîne acyl des C16 et C18 est estérifiée puis les C16-CoA et C18-CoA deviennent des substrats pour les complexes d'élongation des acides gras (**FAE**) (Figure 1.5). Ces complexes de quatre enzymes catalysent l'ajout de 2C dérivés du malonyl-CoA à l'acyl-CoA en un cycle de quatre étapes qui est décrit dans la Figure 1.6. Après une succession de cycles, les acides gras comportent alors 20 à 36C et sont appelés acides gras à très longue chaîne (**VLCFA**).

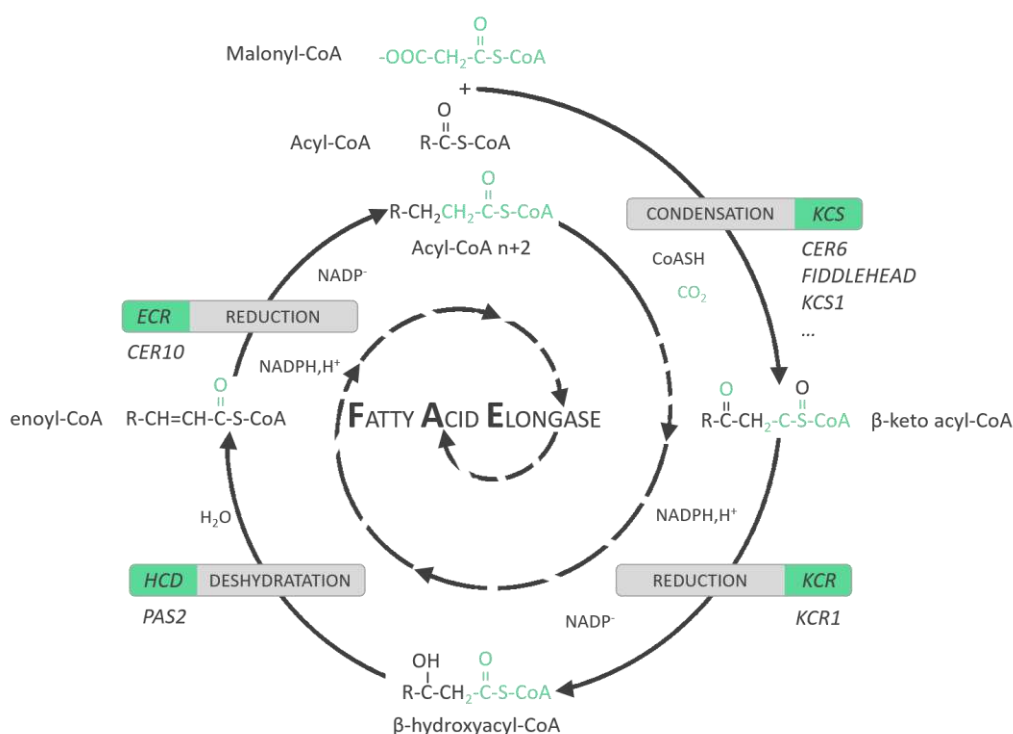


Figure 1.6. Le complexe d'élongation des acides gras (FAE) (adapté de Bernard and Joubès, 2013)

Le complexe d'élongation des acides gras catalyse la synthèse des VLCFA par des cycles répétés qui ajoutent deux carbones à la chaîne acyl initiale. La première étape du cycle d'élongation est la condensation de deux carbones du malonyl-CoA vers la chaîne acyl-CoA, qui est catalysée par une β-ketoacyl-CoA synthase (**KCS**). Le β-ketoacyl-CoA formé est ensuite réduit par une β-ketoacyl-CoA réductase (**KCR**) pour donner un β-hydroxy acyl-CoA qui est alors déshydraté par une β-hydroxy acyl-CoA déshydratase (**HCD**). Enfin, une enoyl-CoA réductase (**ECR**) permet d'obtenir l'acyl-CoA n+2 par une nouvelle réduction.

Il existe en réalité différents complexes FAE, composés de membres différents des quatre familles d'enzymes citées précédemment. Des études où l'activité élongase des cellules a été bloquée ont suggéré que ces différents complexes FAE pourraient fonctionner en série ou en parallèle pour produire la grande diversité de longueur de chaîne retrouvée dans les VLCFA (von Wettstein-Knowles, 1982). Chez *Arabidopsis*, les enzymes KCR, HCD et ECR impliquées sont très généralement KCR1, PAS2 et CER10, respectivement. En revanche, le génome d'*Arabidopsis* compte vingt-et-un gènes *KCS* putatifs. Six d'entre eux (*KCS1*, *KCS2*, *KCS10/FDH*, *KCS13/HIC*, *KCS20* et *KCS6/CER6*) ont été caractérisés, et leur rôle potentiel dans la synthèse des précurseurs de cuticule a été proposé (Millar *et al.*, 1999; Todd *et al.*, 1999; Yephremov *et al.*, 1999; Pruitt *et al.*, 2000). Parmi eux, seul *CER6* semble spécifique à la synthèse des cires. En effet, chez le mutant *cer6*, l'accumulation des cires de la tige est pratiquement supprimée (Millar *et al.*, 1999; Hooker *et al.*, 2002).

1.1.3.2.2. La voie des alcools et la voie des alcanes

Les VLCFA-acyl-CoAs peuvent ensuite être transformés en VLCFA libres ou servir de substrat à deux voies distinctes, la voie des alcools ou la voie des alcanes, afin de produire les diverses cires finales composant la cuticule (Figure 1.5).

La voie des alcanes est responsable de la synthèse de plus de 80% des cires totales de la rosette d'*A. thaliana* (Bernard and Joubès, 2013). Les VLCFA sont d'abord probablement réduits en aldéhydes intermédiaires puis convertis en alcanes, qui comportent un carbone de moins. Des études ont montré que **CER1** et **CER3** forment un complexe enzymatique permettant la conversion de VLC acyl-CoAs en VLC alcanes (Bernard *et al.*, 2012). Dans les feuilles d'*Arabidopsis* les alcanes sont les produits finaux de la voie des alcanes tandis que dans les tiges ces molécules peuvent par la suite être modifiées en alcools secondaires et en cétones. Ces deux réactions d'oxydation sont réalisées par une hydrolase, Midchain Alkane Hydrolase1 (**MAH1/CYP96A15**), appartenant à la famille des cytochromes P450 (Greer *et al.*, 2007).

La voie des alcools primaires est responsable de la synthèse d'environ 20% des cires cuticulaires. Dans cette voie les VLCFA-CoA sont réduits en alcools primaires par l'action de **CER4**, une Alcohol-Forming Fatty Acyl-CoA Reductase (FAR), puis **WSD1**, une enzyme de synthèse des cires WS (Wax Synthases), estérifie les alcools primaires en esters d'alcools (Rowland *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). Cette dernière enzyme utilise également comme substrat des acyl-CoA en C16, et par ailleurs la majorité des esters d'*Arabidopsis* comportent 16 carbones, signifiant que cette solution est prédominante pour la formation des esters d'alcools chez cette plante.

1.1.3.2.3. Transport des cires et des monomères de cutine

Après leur synthèse dans le RE, les précurseurs cuticulaires hydrophobes sont transportés à travers le cytoplasme hydrophile puis exportés à travers la membrane plasmique vers l'extérieur des cellules épidermiques (Figure 1.5). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour le transport à travers le cytoplasme et l'étude de mutants affectés dans le

trafic vésiculaire et le système de sécrétion de protéines suggère que ce transport implique une voie vésiculaire et/ou une voie sécrétoire utilisant l'appareil de Golgi (McFarlane *et al.*, 2014).

Une fois que les composants de la cuticule ont atteint la membrane plasmique, leur exportation vers la matrice extracellulaire est prise en charge par des protéines transmembranaires comme les ATP binding cassette (**ABC**) **transporteurs**. Chez *Arabidopsis*, CER5/ABCG12 et ABCG11 forment un hétérodimère jouant un rôle dans l'export des cires (Pighin *et al.*, 2004; Bird *et al.*, 2007; Panikashvili *et al.*, 2007) tandis qu'ABCG11 peut également former un homodimère ou un hétérodimère avec une autre protéine inconnue pour le transport des monomères de cutine (McFarlane *et al.*, 2010). Plus récemment, un autre transporteur de type ABC a été identifié chez *Arabidopsis* comme essentiel à la formation de la cuticule, il s'agit de PEC1/ABCG32 (Fabre *et al.*, 2016).

Enfin, des protéines de la famille des Lipid Transfer Protein (**LTP**) permettent l'exportation des composants des cires vers la matrice extracellulaire. Plus particulièrement, les LTPG (Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Lipid Transfer Protein) sont des protéines possédant une cavité hydrophobe et une ancre GPI qui les lie à la membrane plasmique. Par exemple, LTPG1 et LTPG2 ont un rôle dans la formation de la cuticule (Debono *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012). À ce jour il n'a pas pu être démontré que les LTP seraient capables de se détacher de leur ancre GPI, ce qui permettrait de libérer la protéine potentiellement chargée d'un lipide. Par conséquent, le rôle de ces protéines dans le transport des lipides à travers la paroi pecto-cellulosique de la cellule reste toujours hypothétique (Bernard and Joubès, 2013). C'est pourquoi il a été proposé que des LTPs apoplastiques pourraient jouer ce rôle bien que des preuves génétiques ou biochimiques manquent à ce jour. Un autre mécanisme à prendre en considération est la diffusion passive à travers la paroi des composés lipidiques vers la cuticule nécessitant une plus faible quantité d'énergie (Fich *et al.*, 2016).

La dernière étape de la synthèse de la cutine est la transformation des monomères en polymères. Ce mécanisme reste largement méconnu même si une cutine synthase extracellulaire de tomate (GDSL1/CD1) a été identifiée (Girard *et al.*, 2012; Yeats *et al.*, 2012). Cette enzyme semble catalyser *in planta* l'estérification des monomères au niveau des chaînes centrales de 2-monoacylglycerol (Yeats *et al.*, 2014). De manière cohérente, la quantité de cutine polymérisée est plus faible chez le mutant *cd1* comparée à des plantes sauvages. Un orthologue de CD1 chez *Arabidopsis* nommé CUTINE SYNTHASE 1 (**CUS1**)/LI-TOLERANT LIPASE 1 (LTL1) catalyse la polymérisation de la cutine *in vitro* et le mutant *cus1/ltl1* présente les caractéristiques typiques des mutants déficients en cutine (Shi *et al.*, 2011). Récemment, l'homologue de CUS1/LTL1, nommé CUS2 a été montré comme requis pour la formation des crêtes cuticulaires à la surface des pétales d'*Arabidopsis* (Hong *et al.*, 2017).

D'autres gènes semblent jouer un rôle dans la formation de la cuticule mais les fonctions biochimiques précises des protéines restent encore à déterminer afin de les placer dans une partie spécifique de la voie de biosynthèse. C'est le cas de **BODYGUARD** (**BDG**), qui

code pour une protéine α/β -hydrolase localisée dans la partie externe de la paroi cellulaire, et dont le mutant perte de fonction d'*Arabidopsis* a été examiné. Une première étude a révélé que les plantes *bdg* présentaient une cuticule désorganisée au niveau microscopique, une plus grande perméabilité, mais paradoxalement une plus grande quantité de cutine et de cires (Kurdyukov, Faust, Nawrath, *et al.*, 2006). Une seconde étude, plus récente, a montré que deux autres mutants alléliques de *bdg* (*bdg6* et *bdg7*) présentaient une diminution d'environ 60% de la quantité de cutine, dans les jeunes feuilles et les fleurs (Jakobson *et al.*, 2016). Cependant, la quantité de cutine dans les feuilles de ces mutants augmente au cours de leur développement, jusqu'à dépasser légèrement celle du sauvage chez les plantes adultes, confirmant ainsi les résultats de la première étude. Ces données démontrent que BDG participe à la synthèse de la cutine, et suggèrent qu'il pourrait agir dans les jeunes feuilles en expansion, puis d'autres protéines, partiellement ou totalement redondantes avec BDG, pourraient être produites dans les stades plus tardifs du développement foliaire afin de compenser la perte de BDG chez les mutants *bdg*. De plus, la surexpression de BDG provoque une augmentation de certains monomères de cutine et notamment une augmentation des taux de monomères en C18 dans les feuilles. Les auteurs ont donc proposé un rôle de BDG dans la synthèse ou l'incorporation des monomères en C18 insaturés (Jakobson *et al.*, 2016). Cependant, BDG pourrait aussi agir en tant que transacylase, comme cela a été montré pour d'autres protéines α/β hydrolase (Lenfant *et al.*, 2013) et ainsi agir sur la polymérisation des monomères de cutine en C18.

1.1.4. Régulation de la biosynthèse de la cuticule

Différentes études ont montré qu'un grand nombre de facteurs de transcription (FT) sont impliqués dans la régulation de la biosynthèse et l'accumulation des composants de la cuticule. La plupart de ces FT appartiennent à l'une de ces trois familles: les facteurs de réponse à l'éthylène (ERF), les FT myeloblastosis (MYB) et les homeodomain-leucine zipper class IV (HD-Zip IV). La surexpression de ces FT mène à des changements dans l'accumulation et/ou la composition de la cuticule, et souvent à une plus grande tolérance aux stress chez diverses plantes transgéniques. Cependant, malgré les effets positifs sur la protection des plantes, l'expression ectopique de certains FT a également un effet négatif sur la croissance et le rendement (Aharoni *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007).

Le premier FT à avoir été identifié comme jouant un rôle dans la régulation de la biosynthèse de la cuticule est **WAX INDUCER1/SHINE1 (WIN1/SHN1)**. Chez *Arabidopsis*, WIN1/SHN1 fait partie d'une sous-famille de trois membres appartenant à la famille des APETALA2/ethylene-responsive factors (AP2/ERF), qui est caractérisée par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN de type AP2. La surexpression de *WIN1/SHN1* produit des plantes aux feuilles plus brillantes, accumulant plus de cires épicuticulaires, mais également plus de cutine, ce qui permet à ces plantes d'être plus résistantes à la sécheresse (Aharoni *et al.*, 2004). Cependant, l'inactivation des trois gènes de la sous-famille cause une diminution de la quantité de cutine mais pas d'altération de la quantité des cires (Shi *et al.*, 2011). Il a également été démontré que ces FT activent directement les

promoteurs de divers gènes de la voie de biosynthèse de cutine, renforçant leur rôle primordial dans la régulation de la cutine et ayant aussi un effet en aval sur les cires (Shi *et al.*, 2011).

D'autres FT de la famille AP2/ERF jouent un rôle dans la régulation de la cuticule. C'est le cas par exemple de **WXP1** et **WXP2** qui, une fois surexprimés chez *Medicago truncatula*, induisent une production de cires plus importante, ainsi qu'une augmentation de la tolérance à la sécheresse (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007). La quantité de n-alcanes est plus importante chez les lignées surexprimant WXP1 ou WXP2 par rapport aux plantes sauvages mais la quantité d'alcools primaires augmente chez les plantes surexprimant WXP1 tandis qu'elle diminue chez les lignées surexprimant WXP2. D'autres différences sont également notables entre les deux gènes: les plantes surexprimant WXP1, où la perméabilité de la cuticule n'est pas affectée, sont plus tolérantes au froid, tandis que les plantes surexprimant WXP2, avec une perméabilité de la cuticule diminuée, y sont plus sensibles.

Deux FT de type MYB, **MYB106** et **MYB16** ont été identifiés comme régulateurs de la biosynthèse de cutine et fonctionnant de manière similaire à WIN1/SHN1. Ces deux FT activent de manière directe l'expression de *WIN1/SHN1* mais également d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse de cuticule (Oshima *et al.*, 2013).

MYB96 est un FT induit par l'ABA qui confère une tolérance à la sécheresse chez *Arabidopsis*, en partie grâce à une induction de la production de cires. Ce FT active un grand nombre de gènes de la voie de biosynthèse des cires, en particulier ceux codant pour les enzymes responsables de la production de VLCFA (Seo *et al.*, 2011). La liaison directe de MYB96 aux promoteurs de nombreux gènes de la voie de biosynthèse des cires a pu par ailleurs être détectée (voir section 1.5.2 "La sous-famille MYB-R2R2 S1"). Récemment, il a été démontré que MYB96 et **MYB94** ont un effet additif sur la biosynthèse de cires (Lee *et al.*, 2016). En effet, l'expression de MYB94 complémente le phénotype du mutant *myb96* à la fois en conditions contrôles et de sécheresse, et le phénotype du double mutant *myb94myb96* est plus marqué que celui des mutants simples, au niveau de la diminution de cires et de la diminution d'expression des gènes de biosynthèse des cires. Enfin, les deux FT partagent les mêmes gènes cibles et interagissent avec les mêmes régions des promoteurs de ceux-ci (Lee *et al.*, 2016).

À l'inverse de MYB96 et MYB94, **MYB41** régule négativement la biosynthèse de cutine en réponse à la sécheresse. MYB41 est induit en réponse à l'ABA, la sécheresse et le stress osmotique. Des données montrent que MYB41 interagit avec et est phosphorylé par la protéine MAP kinase MPK6, ce qui a pour conséquence d'améliorer sa liaison à l'ADN (Cominelli *et al.*, 2008; Hoang *et al.*, 2012).

Enfin, le FT **MYB30**, sujet central de cette étude, est induit durant l'infection par des agents pathogènes, et capable d'activer l'expression de 13 gènes reliés à la synthèse de la cuticule, dont plusieurs gènes du complexe FAE (Raffaele *et al.*, 2008). Il a été démontré que la surexpression de *MYB30* provoque une accumulation importante de VLCFA et une altération mineure de la composition en cires. Cependant, aucune différence dans

l'épaisseur de la cuticule ni dans l'aspect des cellules épidermiques n'a pu être observée chez les plantes adultes dérégulées pour l'expression de *MYB30*, tout comme d'autres phénotypes classiques de mutants cuticulaires tels que la fusion d'organes, la diminution de la fertilité, ou encore la diffusion de chlorophylle dans l'éthanol. Le rôle de *MYB30* dans la réponse immunitaire est décrit plus en détail dans la section 1.5.4.

Ayant décrit ces généralités sur la cuticule et sa biosynthèse chez les plantes, dans la prochaine section nous allons nous intéresser à une cuticule particulière: la cuticule embryonnaire. Mais avant cela, il est nécessaire de rappeler quels sont les événements qui se déroulent lors du développement de la graine et en particulier de l'embryon, afin d'avoir une vue globale du contexte dans lequel cette cuticule est mise en place.

1.2. La cuticule embryonnaire

1.2.1. Le développement de la graine d'*Arabidopsis*

La graine est la structure qui contient et protège l'embryon végétal, et assure la dissémination de l'espèce. La graine est formée de trois tissus d'origines différentes: l'embryon et l'albumen sont issus de la double-fécondation, tandis que les téguments, qui entourent les deux premiers tissus, sont d'origine maternelle.

1.2.1.1. La double fécondation

Chez les Angiospermes, la reproduction se fait par le mécanisme de double fécondation entre un grain de pollen contenant deux noyaux spermatiques haploïdes (n) et l'ovule, ce qui donnera naissance à deux zygotes à l'origine de la graine. L'une des cellules spermatiques du grain de pollen féconde la cellule œuf (n), ce qui donne l'embryon diploïde ($2n$). L'autre fusionne avec les deux noyaux polaires de la cellule centrale, formant un tissu triploïde ($3n$) appelé albumen qui servira à nourrir l'embryon (Russell, 1993).

1.2.1.2. L'embryogénèse

Suite à la double-fécondation, la cellule unique du zygote suit un schéma de divisions asymétriques et de différenciations cellulaires afin de former l'embryon mature.

Après fécondation, le zygote s'allonge avant de se diviser asymétriquement, formant une petite cellule apicale, et une plus grande cellule basale (Zhang and Laux, 2011) ([Figure 1.7](#)). La **cellule basale** se divisera ensuite de manière symétrique, formant le suspenseur, une structure attachant l'embryon aux tissus maternels qui l'entoure. Le suspenseur est ensuite éliminé un peu plus tard dans le développement *via* un processus de mort cellulaire programmée encore mal compris (Ingram, 2017).

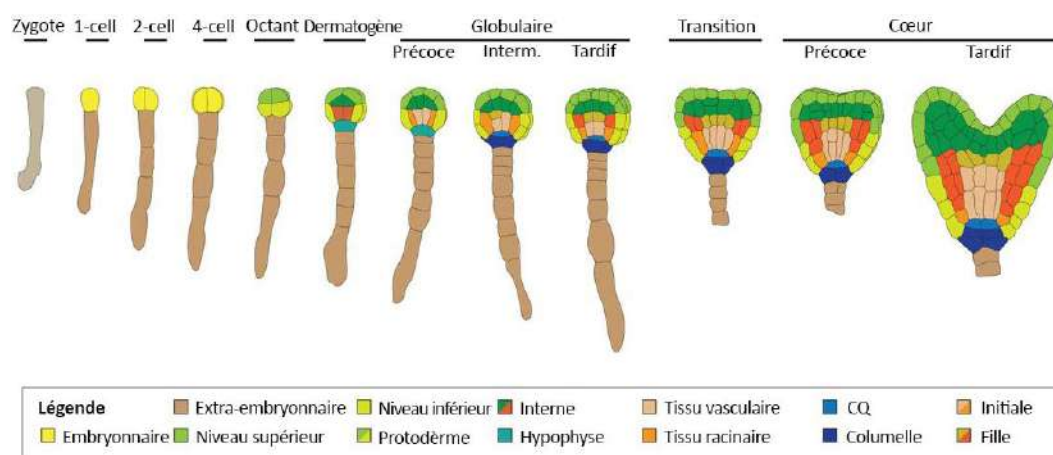


Figure 1.7. Développement embryonnaire précoce d'*Arabidopsis* (d'après Hove *et al.*, 2015)

Schéma de coupes longitudinales d'un embryon d'*Arabidopsis* en développement. Les stades de développement de l'embryon sont indiqués dans la ligne du haut. Les cellules sont colorées selon leur lignée, comme indiqué dans la légende. cell: cellule(s); CQ: centre quiescent.

La **cellule apicale** quant à elle va tout d'abord se diviser symétriquement, établissant un axe apico-basal en formant un étage supérieur et un étage inférieur au stade **octant**. Le passage du stade octant au stade **dermatogène** nécessite un changement de plan de division (les cellules se divisent pratiquement en diagonale) ce qui résulte dans l'établissement d'un autre axe, l'axe radial. Les cellules situées le plus à l'extérieur sont appelées cellules protodermiques, et vont subir plusieurs divisions symétriques afin de former les tissus épidermiques. Lors de la transition vers le stade **globulaire** précoce, les premiers tissus internes sont établis. À la suite d'une série de divisions asymétriques, les cellules internes forment les précurseurs des tissus vasculaires et du parenchyme. Toujours à ce stade, la cellule la plus apicale du suspenseur, appelée hypophyse, est incorporée à l'embryon et donnera plus tard une partie de l'apex racinaire. Les étapes qui suivent le stade globulaire tardif peuvent être considérées comme les plus importantes pour le développement de l'embryon. Durant la transition du stade globulaire précoce au stade globulaire tardif, l'hypophyse se divise asymétriquement pour former une petite cellule apicale et une plus grande cellule basale. La première deviendra le centre quiescent, et la seconde la columelle, tous deux faisant partie du méristème apicale racinaire (Hove *et al.*, 2015).

Dans les stades suivants, les cellules continuent de se diviser et de se différencier, accompagnées par la mise en place du méristème apical et du méristème racinaire. L'initiation des cotylédons au stade triangulaire provient d'une croissance localisée située à deux pôles opposés de la région apicale. Lorsque l'embryon est au stade **cœur**, les organes majeurs de la plantule ainsi que les différents tissus sont ébauchés : hypocotyle, cotylédons, radicule, mais également les tissus provasculaires, le protoderme et le cortex. Passé le stade cœur, le méristème apical caulinaire est mis en place. Après la forme cœur, il deviendra **torpille**, puis **cotylédons courbés**, et enfin **embryon mature** (Figure 1.8).

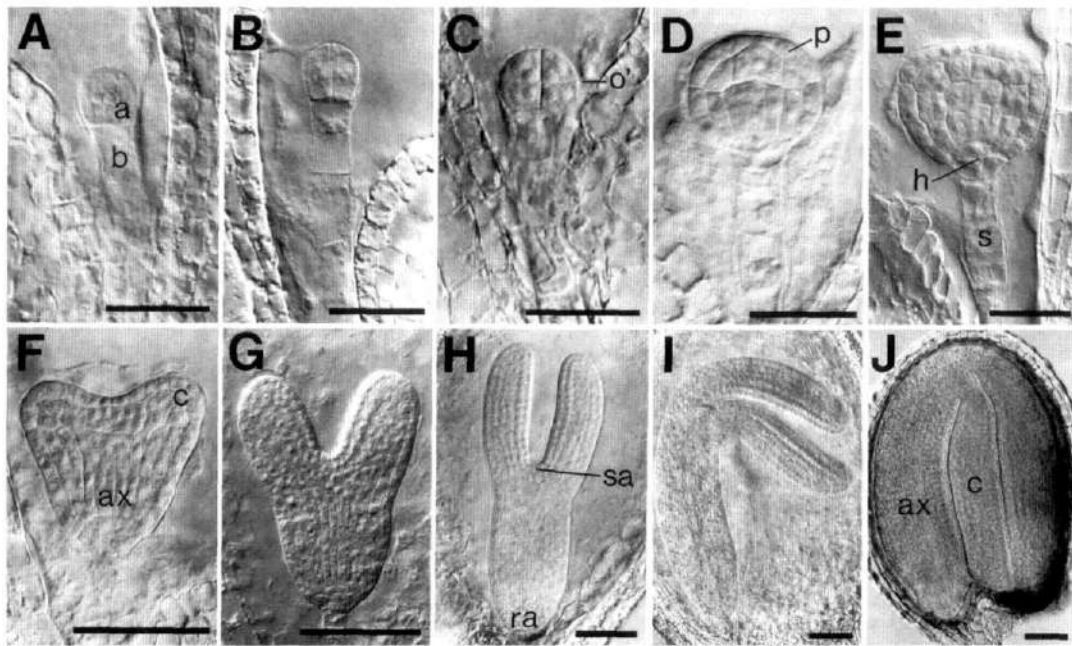


Figure 1.8. Embryogenèse d'*Arabidopsis* (d'après West and Harada, 1993)

Images en microscopie photonique à contraste interférentiel d'embryons d'*Arabidopsis thaliana* en développement. **(A)** Zygote. a : cellule apicale ; b : cellule basale. **(B)** Stade deux ou quatre cellules. **(C)** Stade octant. **(D)** Stade globulaire précoce. p : protoderme. **(E)** Stade transition. h : hypophyse ; s : suspenseur. **(F)** Stade cœur précoce. ax : axe ; c : cotylédons. **(G)** Stade cœur tardif. **(H)** Stade torpille. ra : apex racinaire ; sa : apex caulinaire. **(I)** Stade cotylédons courbés. **(J)** Stade embryon mature. Echelles : A à E = 25µm, F à J = 50 µm.

1.2.1.3. Le développement de l'albumen

Dans la plupart des plantes à fleurs l'**albumen** fournit des nutriments à l'embryon, assurant ainsi son développement et, dans certains cas, sa germination. Par ailleurs, des études suggèrent qu'il aurait aussi pour rôle de réguler la formation de la surface de l'embryon et sa croissance (Ingram, 2010 ; et voir section 1.2.2.2.) L'albumen peut avoir une existence éphémère, comme c'est le cas chez de nombreuses espèces dont *Arabidopsis thaliana*, où il est consommé par le développement de l'embryon, ou il peut être une structure persistante de la graine, comme chez les céréales. En effet, l'albumen des céréales est la source la plus importante de calories alimentaires et de matière première pour la fabrication de nombreux produits alimentaires ou de biofuel à travers le monde. Après la double fécondation, le génome de l'albumen a un ratio 2:1 d'origine maternelle/paternelle à l'inverse du ratio 1:1 de l'embryon (voir section 1.2.1.1.). Chez la plupart des plantes à fleurs, le développement de l'albumen est divisé en deux phases principales: une phase **syncytiale**, puis une phase **cellularisée** qui sont décrites plus en détails dans la [Figure 1.9](#).

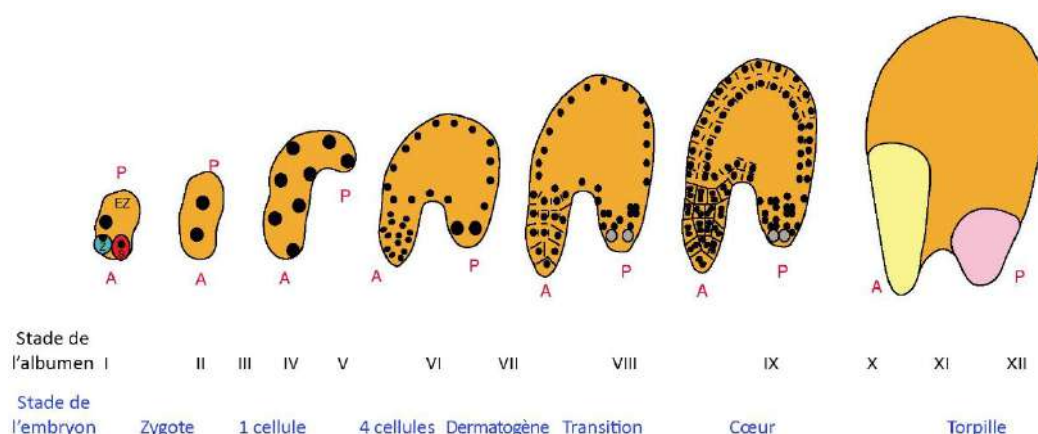


Figure 1.9. Principales étapes du développement de l'albumen d'*Arabidopsis* (d'après Berger, 2003)

La double fécondation du sac embryonnaire par les gamètes mâles donne naissance à deux zygotes : un zygote principal issu de la fécondation de l'oosphère (Z) et un zygote accessoire, l'albumen, dérivant de la fécondation de la cellule centrale diploïde (EZ). Le développement de l'albumen est divisé en deux phases, tout d'abord une phase syncytiale, puis une phase cellularisée. Les stades du développement sont définis par une succession de mitoses pseudo-synchrones. Trois domaines mitotiques sont définis depuis le pôle antérieur (A) jusqu'au pôle postérieur (P). Ces domaines sont appelés albumen micropylaire (jaune), albumen périphérique (orange) et albumen chalazal (rose). Le huitième cycle mitotique est suivi par une cellularisation de l'albumen périphérique syncytial. S : synergides.

L'albumen entre ensuite dans un processus de maturation, accumulant des molécules de stockages comme des protéines, des lipides, et de l'amidon afin de subvenir aux besoins de l'embryon pendant son développement. Enfin, l'embryon continue sa croissance et remplit la cavité au détriment de l'albumen, au point qu'il ne reste plus qu'une seule couche cellulaire d'albumen au stade mature chez *Arabidopsis*.

1.2.1.4. Le développement des téguments

Les **téguments** (ou testa) constituent la couche la plus externe de la graine et ont un rôle protecteur pour l'embryon face aux conditions extérieures, mais ils transmettent également les signaux environnementaux vers l'intérieur de la graine afin que celle-ci ajuste son métabolisme (Radchuk and Borisjuk, 2014).

Dérivant directement des téguments de l'ovules, les téguments de la graine sont d'origine maternelle, et comportent cinq assises cellulaires : les **téguments externes** sont constitués de deux couches cellulaires alors que les **téguments internes** en comptent trois (Figure 1.10). Les cellules des téguments subissent une croissance très rapide dans les premiers jours après la fécondation, à travers des phénomènes de division et d'expansion cellulaire (Haughn and Chaudhury, 2005). Les cellules de la couche la plus interne (l'**endothélium**, Figure 1.10) synthétisent des proanthocyanidines (PA), des polymères de flavonols aussi appelés tanins condensés et qui donnent sa couleur brune à la graine. De manière intéressante, la paroi des cellules de l'endothélium faisant face à l'albumen semble bordée par une structure riche en composés lipidiques, ressemblant à

une cuticule (Beeckman *et al.*, 2000). Les deux couches des téguments externes accumulent ensuite temporairement des amyloplast, servant au stockage de l'amidon. La couche la plus interne des deux (Figure 1.10, te1) produit également une paroi plus épaisse sur la face interne de ses cellules, tandis que la couche épidermique (Figure 1.10, te2) synthétise et sécrète une grande quantité de mucilage (un complexe essentiellement pectique) dans l'apoplaste (Haughn and Chaudhury, 2005). Au cours de la sécrétion du mucilage, la vacuole des cellules épidermiques se contracte, laissant apparaître une colonne de cytoplasme au centre de la cellule entourée d'un espace apoplastique rempli de mucilage. Après la synthèse du mucilage, une paroi secondaire est déposée qui vient compléter l'espace occupé par la colonne cytoplasmique, formant la columelle. Enfin, durant les derniers stades de développement de la graine, les cellules de toutes les couches des téguments meurent. La structure des cellules épidermiques est conservée par le mucilage et la columelle, et les assises cellulaires restantes sont compactées ensemble (Haughn and Chaudhury, 2005).

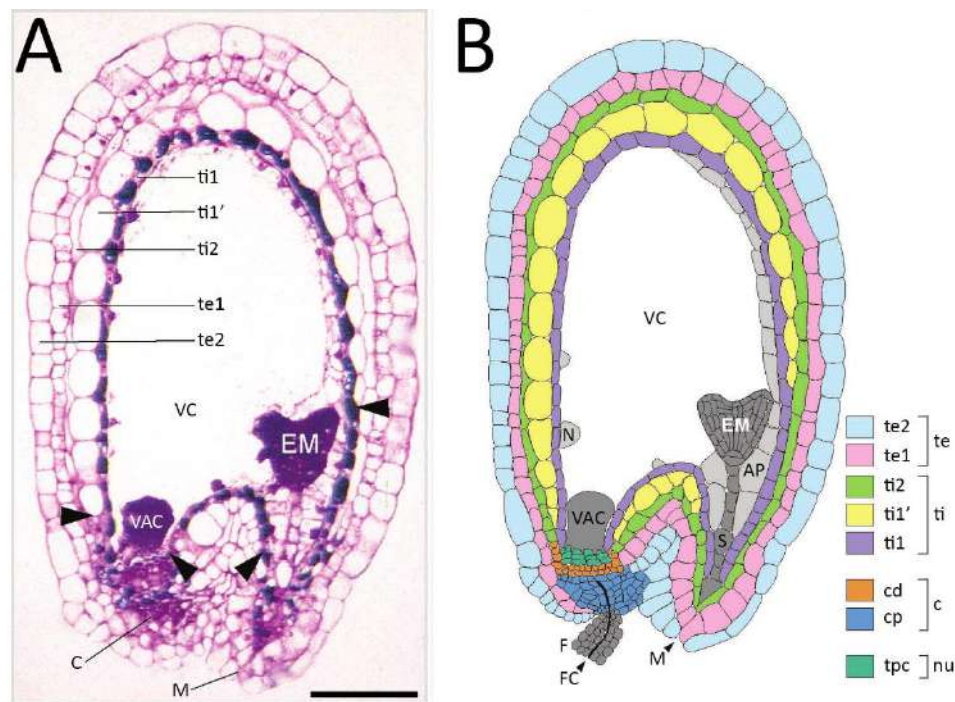


Figure 1.10. Structure des téguments de la graine d'*Arabidopsis thaliana* (d'après Debeaujon *et al.*, 2003)

(A) Coupe longitudinale colorée au Bleu de Toluidine d'une graine au stade cœur de développement embryonnaire. Les flèches indiquent la limite de la couche ti1'. Echelle = 65µm. (B) Schéma d'anatomie de la graine. Les couches des téguments sont nommées d'après Beeckman et al. (2000). L'endothélium correspond à la couche ti1. AP : albumen périphérique ; C : chalaze ; cd : chalaze distale ; cp : chalaze proximale ; EM : embryon ; F : funicule ; FC : faisceau conducteur ; M : micropyle ; N : nodule ; nu : nucelle ; S : suspenseur ; te : tégument externe ; ti : tégument interne ; VAC : vésicule de l'albumen chalazal ; VC : vacuole centrale.

1.2.1.5. Maturation et dessiccation de la graine

Au cours de la maturation de la graine, l'embryon et l'albumen synthétisent trois types de réserves: des sucres, des lipides et des protéines. Chez *Arabidopsis*, où l'albumen

n'est pas persistant, elles sont majoritairement stockées dans les cotylédons, alors que les céréales en emmagasinent la plus grande partie dans l'albumen (Baud *et al.*, 2002).

Après la période d'accumulation des réserves, la graine entre dans la dernière étape de maturation, appelée dessiccation. Cette étape est associée à une perte en eau importante (la graine d'*Arabidopsis* perd par exemple environ 90% de sa teneur en eau) et rend la graine sèche en prévision de la période quiescente. L'expression des gènes et le métabolisme de la graine restent cependant actifs pendant cette phase (environ 30% du génome d'*A. thaliana* est reprogrammé) notamment afin de produire des protéines de la famille maturation (MAT), associées à la maturation, mais aussi des protéines de la famille des Late Embryogenesis Abundant (LEA), et des protéines Hsp (Heat-Shock Proteins), associées à la quiescence et à la tolérance à la dessiccation (Angelovici *et al.*, 2010).

Cette étape construit donc des mécanismes de protection afin que la graine survive à la déshydratation et à la quiescence et prépare la graine à la germination.

1.2.1.6. Dormance et germination de la graine

Le contrôle de la germination des graines, à la fois de manière temporelle et spatiale, est crucial pour la survie et la prolifération des plantes. Les plantes ont donc évolué de manière à ce qu'à la fin de leur développement les graines entrent en dormance, une suppression temporaire de la germination sous des conditions favorables. Après un certain temps cette inhibition de la germination est levée. La régulation hormonale de la dormance est un mécanisme très conservé chez les plantes à graine. En effet, l'induction et le maintien de la dormance par l'acide abscissique (**ABA**) et la levée de la dormance par les gibbérellines (**GA**) et l'éthylène sont observées chez de nombreuses espèces (Nogaki, 2014; Corbineau *et al.*, 2014).

Une fois la dormance levée, la germination de la graine commence par l'imbibition, processus passif qui permet à la graine d'absorber l'eau qui l'entoure. Le premier signe visible de la germination correspond à la croissance de la racine qui sort par le micropyle. Les molécules nutritives de la plante, en particulier celles stockées dans les cotylédons, sont dégradées pour apporter de l'énergie pour la croissance des racines. Peu de temps après le début de la croissance de la racine, la tigelle commence à se développer et la plantule complète est ainsi formée.

1.2.2. La mise en place de la cuticule embryonnaire

1.2.2.1. Une cuticule unique

Bien que l'on sache qu'au cours de l'embryogenèse les cotylédons se recouvrent d'une couche cuticulaire (Sterk *et al.*, 1991), la biogenèse de la cuticule embryonnaire reste très mal connue.

L'épiderme de la plante est formé très tôt dans le développement, au stade dermatogène de l'embryon, où 8 cellules les plus externes forment le protoderme (voir section

1.2.1.2.). Cependant, des marqueurs de l'identité épidermique, incluant le gène **ATML1**, sont exprimés dès le stade embryonnaire deux cellules suggérant que l'épiderme ou du moins le protoderme pourrait être un état par défaut, en tout cas chez l'embryon. Cependant, des données transcriptomiques *in silico* générées à partir de tissus de graines d'*Arabidopsis* capturés par microdissection laser suivi d'une analyse microarray (Le *et al.*, 2010) montrent que de nombreux composants clés de la voie de biosynthèse de la cuticule, dont *LACS2*, *FDH*, et *BDG1*, sont déjà fortement exprimés chez l'embryon pré-globulaire, suggérant que la biogenèse et le dépôt de la cuticule sont certainement initiés très tôt durant le développement embryonnaire.

La cuticule embryonnaire est unique, car tout comme l'épiderme embryonnaire, elle est synthétisée *de novo*, contrairement aux cellules épidermiques de la plante à un stade plus avancé, qui résultent d'une division de cellules déjà existantes et sont donc "pré-équipées" d'une couche cuticulaire (Javelle *et al.*, 2011). De plus, la cuticule embryonnaire n'est pas en contact avec l'air ou une autre surface cuticularisée. En effet, il n'y a aucune preuve dans la littérature ni de données de microscopie électronique (Delude *et al.*, 2016); V. Duplan, données non publiées) qui montre que l'albumen produise une cuticule à sa jonction avec l'embryon. La cuticule embryonnaire émerge donc dans un contexte très particulier, et il est tentant d'imaginer qu'il existe des mécanismes moléculaires et cellulaires spécifiques qui permettent la mise en place correcte de la cuticule embryonnaire et par conséquent la séparation efficace entre l'embryon et l'albumen qui l'entoure.

1.2.2.2. La voie ECF (Embryo Cuticle Functionality)

Des travaux récents ont mis en évidence chez *Arabidopsis* une voie de signalisation spécifique à la graine, qui implique à la fois des acteurs moléculaires de l'embryon mais aussi de l'albumen, et qui est nécessaire pour la formation d'une cuticule embryonnaire fonctionnelle et pour la séparation physique entre embryon et albumen. Cette voie est appelée voie ECF, pour "*Embryo Cuticle Functionality*". Les cinq composants clés de cette voie identifiés à ce jour sont montrés dans la [Figure 1.11](#).

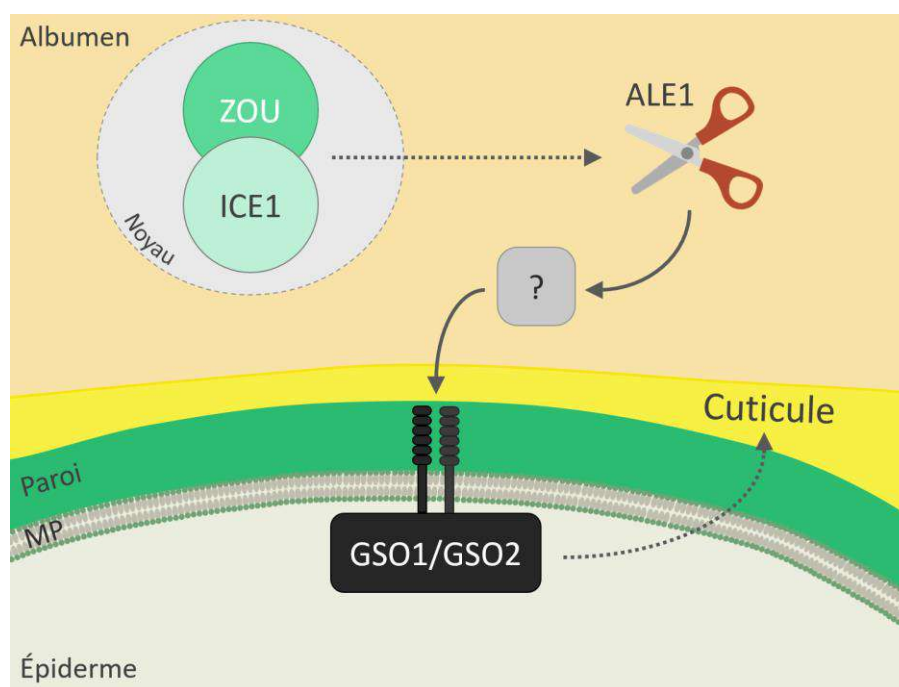


Figure 1.11. Contrôle transcriptionnel de la biosynthèse de la cuticule durant le développement (adapté de Delude *et al.*, 2016)

Les facteurs de transcription ZOU et ICE1 sont exprimés dans la zone de l'albumen qui entoure l'embryon et activent la transcription du gène codant pour la serine-protéase ALE1. Il est supposé qu'ALE1 clive une protéine cible, produisant un ligand peptidique perçu par les récepteurs kinases GSO1 et GSO2, situés dans la membrane plasmique (MP) des cellules épidermiques de l'embryon. GSO1 et GSO2 agissent ensuite de manière redondante pour la signalisation menant à la mise en place de la cuticule embryonnaire.

Les deux premiers composants de la voie ECF sont des FT de type basic Helix-Loop-Helix (bHLH): **ZHOUP1 (ZOU)/RGE1** qui est exprimé spécifiquement dans l'albumen entourant l'embryon (Kondou *et al.*, 2008, p.1; Yang *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2013), et **ICE1/ SCREAM** qui agit en hétérodimère avec ZOU (Denay *et al.*, 2014), mais est également impliqué dans divers processus développementaux et physiologiques (Shirakawa *et al.*, 2014; Kanaoka *et al.*, 2008; Chinnusamy *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2007). Les mutants d'*Arabidopsis* *zou* et *ice1* présentent tous les deux des défauts de formation de la cuticule embryonnaire (Denay *et al.*, 2014) et leurs embryons sont incapables de se détacher correctement de l'albumen au cours du développement (Yang *et al.*, 2008). Toutefois, une couche cuticulaire est présente à la surface des embryons des plantes *zou*. De plus, aucune altération de l'expression de marqueurs épidermiques (Denay *et al.*, 2014; Xing *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2008) ni de gènes impliqués dans la biosynthèse de cuticule (G. Ingram, F. Domergue, données non publiées) n'est détectée chez ces deux mutants.

Le troisième gène impliqué dans cette voie est également exprimé de manière spécifique dans la région de l'albumen qui entoure l'embryon, et code pour une protéine appelée **ABNORMAL LEAF SHAPE1 (ALE1)**, une protéase de la famille des subtilases qui est nécessaire pour le développement de la cuticule de l'embryon et pour la séparation embryon/albumen (Tanaka *et al.*, 2001). La protéine ALE1 est prédite pour être adressée à

l'apoplaste *via* la voie de sécrétion, et représente donc un élément de communication cellule à cellule de la voie. L'expression d'*ALE1* est contrôlée par les FT ZOU et ICE1, sa transcription étant complètement abolie chez les mutants de ces deux gènes. En accord avec le fait que ZOU et *ALE1* agissent dans la même voie génétique, les phénotypes de leurs mutants ne montrent pas d'additivité chez le double mutant (Yang *et al.*, 2008). De plus, l'expression ectopique d'*ALE1* chez des plantes *zou* complète partiellement leurs défauts cuticulaires (Yang *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2013; Denay *et al.*, 2014).

Enfin, ***GASSHO1 (GSO1)*** et ***GSO2*** sont deux gènes génétiquement proches codant pour des récepteurs kinases, qui sont fortement exprimés au cours du développement embryonnaire et qui agissent de manière redondante pour promouvoir la production d'une cuticule embryonnaire fonctionnelle et la séparation embryon/albumen (Tsuwamoto *et al.*, 2008). Le double mutant *gso1 gso2* possède un phénotype similaire au mutant *ale1* et ce phénotype n'est pas additif avec celui de *ale1* ou *zou*, confirmant le rôle très probable de *GSO1* et *GSO2* dans un processus de signalisation impliquant la communication entre l'albumen et l'embryon, tous deux en développement, nécessaire à la biogenèse de cuticule embryonnaire (Waters *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2013).

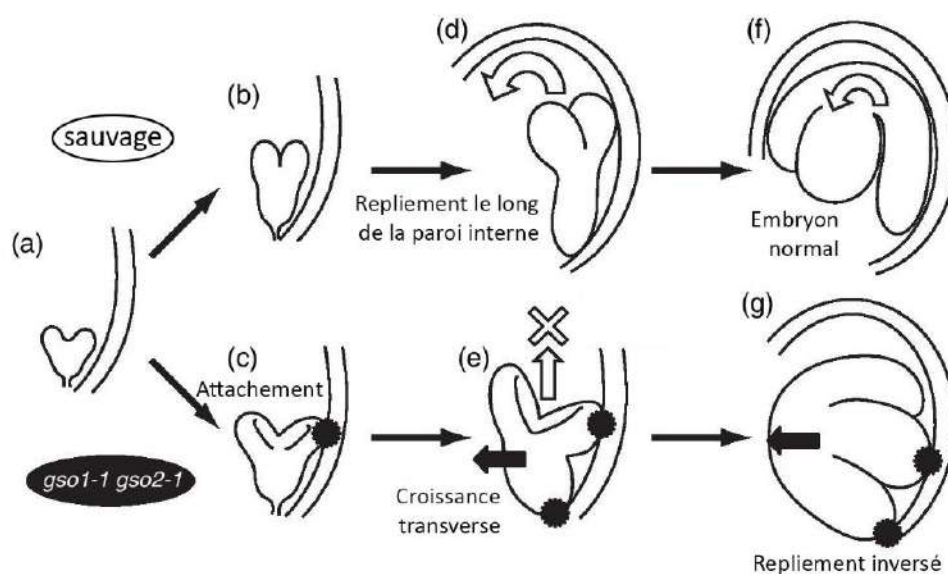


Figure 1.12. Mécanisme potentiel pour le repliement anormal des embryons *gso1 gso2* (d'après Tsuwamoto *et al.*, 2008)

Au stade cœur, aucune différence n'est notable entre le sauvage et le double mutant *gso1 gso2* (a). L'embryon sauvage continue de croître, avec ses cotylédons droits (b). À l'inverse, la formation de cotylédons concaves et écartés est observée chez les embryons *gso1 gso2* à ce stade (c). De plus, dû aux structures épidermiques anormales, telle qu'une cuticule imparfaite, l'embryon croît et une partie apicale de l'embryon adhère à l'albumen périphérique. Au stade torpille tardif, l'embryon sauvage, qui possède une structure épidermique intacte, se recourbe le long de la paroi interne (d), donnant un embryon mature normal (f) ; chez l'embryon *gso1 gso2*, le cotylédon attaché à l'albumen périphérique stoppe le développement vertical normal (e), et cause un repliement inversé de l'embryon (g).

Les gènes *GSO1* et *GSO2* sont exprimés dans les siliques, les graines, les fleurs, les bourgeons et les racines mais leur expression est très faible dans les feuilles ou les tiges. Plus précisément dans la graine, *GSO1* est fortement exprimé dans l'embryon et *GSO2* est fortement exprimé dans l'embryon et les téguments (Belmonte *et al.*, 2013), tandis que dans les racines, les transcrits de *GSO1* sont présents en très faible quantité et *GSO2* n'est pas exprimé (Tsuwamoto *et al.*, 2008). L'absence de *GSO1* et *GSO2* cause des effets pléiotropiques chez les embryons et les plantules d'*Arabidopsis*. En effet, lors de l'embryogenèse du double mutant *gso1gso2*, les défauts de cuticule embryonnaire entraînent un attachement anormal des cotylédons à l'albumen qui les entoure, empêchant ainsi l'embryon de croître verticalement, et causant un recourbement inverse de l'embryon lors de sa croissance (Figure 1.12).

L'étude des plantes *gso1gso2* a révélé que les plantules de ces mutants présentent également des défauts de croissance et des défauts morphologiques. Effectivement, plus de deux-tiers des plantules montrent une fusion des cotylédons par leurs faces adaxiales et l'hypocotyle de ces plantules est significativement (2,6 fois) plus court que celui du sauvage (Tsuwamoto *et al.*, 2008). En accord avec cela, l'observation en microscopie électronique à balayage a montré que les cellules épidermiques de l'hypocotyle du double mutant sont significativement plus courtes que celles du sauvage et semblent comprimées et rugueuses (Figure 1.13 a-d). Cette même technique de microscopie a montré aussi que les cotylédons du mutant *gso1gso2* possèdent plus de stomates que ceux du sauvage, et qu'ils sont regroupés par "grappes", certains d'entre eux étant même adjacents, une distribution qui n'est pas retrouvée à la surface du sauvage (Tsuwamoto *et al.*, 2008). Enfin, il a été noté que pratiquement toutes les cellules du mésophylle de *gso1gso2* sont plus grosses que celles du sauvage, donnant lieu à des cotylédons environ deux fois plus grands que ceux du sauvage. Aucune de ces anomalies n'a été observée sur les vraies feuilles, suggérant que le rôle de *GSO1* et *GSO2* est confiné à l'embryon. En accord avec le rôle de *GSO1* et *GSO2* dans la formation de cuticule embryonnaire, Tsuwamoto et collaborateurs ont montré que les plantules *gso1gso2* sont fortement perméables à des colorants hydrophiles, comme le Bleu de Toluidine (Figure 1.13 e et f), et sont également très sensibles à la dessiccation. Sous des conditions d'humidité élevée, les plantules survivent et peuvent par la suite donner des plantes fertiles (Tsuwamoto *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2013).

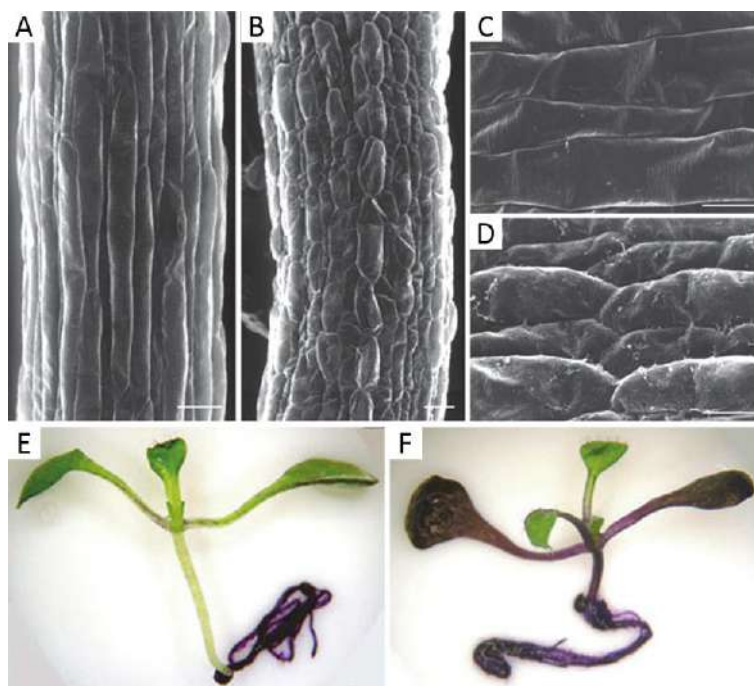


Figure 1.13. Phénotype du double mutant *gso1 gso2* (d'après Tsuwamoto *et al.*, 2008)

(A-D): images en microscopie électronique à balayage des structures de surface de plantules sauvages Col-0 (A,C) et du double mutant *gso1 gso2* (B,D). A et B: hypocotyles. C et D: agrandissements de A et B, respectivement. (E et F): perméabilité par coloration au bleu de toluidine des plantules de 6 jours du sauvages Col-0 (E) double mutant *gso1 gso2* (F). Echelles: A-D = 50 μ m; E et F = 1 mm.

Aucun de ces phénotypes n'est visible chez les plantes mutantes simples *gso1* ou *gso2* ainsi que pour les plantes *gso1gso2* transformées avec *GSO1* ou *GSO2*, confirmant le lien de cause à effet entre ces RLK et les phénotypes décrits et montrant aussi la redondance fonctionnelle entre ces deux gènes.

En plus de leur implication dans la formation de la cuticule embryonnaire, il a été montré que *GSO1* et *GSO2* jouent un rôle dans la formation d'une autre barrière apoplastique, la bande de Caspary ainsi que dans la régulation de la croissance racinaire. En effet, une étude a montré que *GSO1* et *GSO2* sont nécessaires pour la croissance racinaire chez *Arabidopsis* en maintenant l'activité de prolifération cellulaire des méristèmes racinaux proximal et distal. Les deux RLK régulent aussi l'identité des cellules épidermiques en contrôlant le plan de division des cellules souches racinaires. De plus, la croissance sur milieu contenant des sucres métabolisables permet de pallier les défauts de prolifération mais pas ceux de plan de division cellulaire des doubles mutants *gso1gso2* suggérant que *GSO1* et *GSO2* contrôlent la croissance racinaire en modulant la réponse au sucrose après germination (Racolta *et al.*, 2014). Récemment, deux peptides hormonaux produits dans le cylindre central des racines ont été découverts et appelés Casparian strip integrity factor 1 (CIF1) et CIF2 (Nakayama *et al.*, 2017). Ces deux peptides se lient spécifiquement à *GSO1* et *GSO2*, ce qui permet la formation d'une bande de Caspary fonctionnelle dans les racines d'*A. thaliana* (déposition de lignine puis de subérine en "bande" autour de l'endoderme racinaire qui permet le filtrage des minéraux par l'endoderme racinaire) (Nakayama *et al.*, 2017). Ces résultats placent *GSO1* et *GSO2* au cœur d'une nouvelle voie de signalisation qui régulent l'homéostasie des ions minéraux dans

les racines.

Très récemment, une nouvelle structure entourant l'embryon pendant son développement a été décrite, et implique le FT ZOU, les récepteurs kinases GSO1 et GSO2, et un peptide appelé KERBEROS (Moussu *et al.*, 2017). Cette structure nommée **gaine** (*sheath* en anglais) se forme à la surface de l'embryon lors du début de son élongation. La gaine est déposée par-dessus la cuticule embryonnaire, et intègre des composants dérivés de l'albumen riches en molécules de type extensines. ZOU est nécessaire à la production de la gaine, et à celle du peptide KERBEROS, qui est requis pour la formation d'une gaine embryonnaire normale et pour la séparation embryon-albumen. Enfin, GSO1 et GSO2 sont nécessaires pour la déposition de la gaine à la surface de l'embryon mais pas pour la production des composants de la gaine dans l'albumen (Moussu *et al.*, 2017). Ces travaux révèlent la présence d'une nouvelle structure, dont la formation dépend de la production coordonnée de matériaux dans l'albumen et de la signalisation dans l'embryon, mettant en avant l'interaction moléculaire complexe entre ces deux tissus durant le développement précoce de la graine.

1.3. Rôles biologiques de la cuticule

Comme énoncé plus haut, la première fonction de la cuticule est d'empêcher les pertes d'eau excessives, permettant le contrôle des échanges gazeux et de la transpiration par les stomates. Mais la cuticule a également un certain nombre d'autres fonctions importantes pour la plante: elle joue un rôle central dans le développement de la plante en établissant des barrières entre les organes, agit comme un écran protégeant des rayons UVs excessifs, permet une plus grande tolérance à certains stress biotiques et forme la première barrière physique de défense contre les attaques de pathogènes.

1.3.1. La cuticule dans le développement

La cuticule joue un rôle important dans le développement de la plante, et comme nous l'avons vu précédemment, pendant l'**embryogénèse** afin de créer des barrières entre les organes. En effet, de nombreux mutants dont la cuticule est altérée présentent des organes fusionnés (Jenks *et al.*, 1995; Lolle *et al.*, 1998; Yephremov *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2005; Kurdyukov, Faust, Trenkamp, *et al.*, 2006; Kurdyukov, Faust, Nawrath, *et al.*, 2006). Parmi les mutants affectés dans la production de cires, seul *cer3* montre des fusions d'organes et, de manière surprenante, la synthèse de cutine ne semble pas impactée chez ce mutant, indiquant que seul le défaut de production d'aldéhydes observé chez *cer3* serait à l'origine de son phénotype (Chen *et al.*, 2003; Rowland *et al.*, 2007). La mutation de *CER10*, *KCR1* et *PAS2*, codant pour trois enzymes clés du complexe d'élongation des acides gras, cause même des malformations morphologiques encore plus sévères allant jusqu'à la létalité de l'embryon, suggérant que la régulation des VLCFA est essentielle pour le développement de la plante (Bach *et al.*, 2008; Beaudoin *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2005).

La cuticule joue aussi un rôle dans d'autres processus développementaux tels que la maturation du **pollen**, l'interaction pollen-stigma et l'hydratation du pollen (Javelle *et al.*,

2011; Jessen *et al.*, 2011; Li-Beisson *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2011; Zinkl *et al.*, 1999). En effet, un certain nombre de mutants d'*Arabidopsis*, du riz et d'autres plantes déficients pour la production de lipides polliniques sont mâle-stériles (Wilson and Zhang, 2009).

Certains régulateurs de la biosynthèse de la cuticule semblent également jouer un rôle dans la formation des **stomates**. Par exemple, la surexpression du FT WIN1/SHN1 résulte en une diminution de la taille des stomates et une réduction de l'ouverture stomatale (Aharoni *et al.*, 2004). De plus, plusieurs mutants *cer*, affectés dans la production des cires, montrent une augmentation importante du nombre de stomates (Bird and Gray, 2003).

Enfin, des études ont montré que le développement des trichomes pouvait être affecté chez des mutants déficients pour la production de la cuticule tels que *fdh* et *lcr*, suggérant un lien entre la cuticule et la différenciation des cellules épidermiques (Bird and Gray, 2003). De manière intéressante, une étude récente a révélé que la composition des cires à la surface des trichomes était différente de celle des autres cellules épidermiques (Hegebarth *et al.*, 2016). L'avantage biologique potentiel de cette cuticule riche en acides gras à chaînes plus longues reste cependant à déterminer.

1.3.2. L'effet Lotus

La cuticule confère la capacité aux feuilles d'éliminer l'eau à leur surface. L'eau, au contact de la cuticule hydrophobe, va former des gouttes qui vont glisser jusqu'au sol, permettant d'une part l'élimination de spores, et/ou d'agents pathogènes avant que ceux-ci infectent la plante, et d'autre part de collecter et de nettoyer les particules et les débris de la surface de la feuille (Figure 1.14). Ce mécanisme d'auto-nettoyage est appelé "effet Lotus" d'après le Lotus Sacré (*Nelumbo nucifera*), dont les feuilles présentent cette caractéristique. Les cristaux de cires épicuticulaires de l'épiderme de *Nelumbo nucifera* forment un grand nombre de microstructures, ainsi, les gouttes d'eau en raison de leur tension superficielle élevée ont tendance à rétrécir leur surface avec la cuticule et par conséquent à atteindre une forme sphérique. L'efficacité de ce système varie suivant les espèces et le stade de développement des organes, mais elle a été corrélée avec l'abondance de cristaux de cires épicuticulaires en surface (Barthlott *et al.*, 2016).



Figure 1.14. Illustration de l'effet Lotus

(A) Feuille de *Camellia japonica* dont l'hydrophobicité entraîne un changement de conformation des gouttes d'eau, qui prennent des formes sphériques. (Photo: Futureprospects). **(B)** Image de synthèse de l'effet Lotus. Trois gouttes d'eau reposent sur les microstructures d'une feuille. (©William Thielicke)

Même si aucune étude n'a démontré que l'effet Lotus apporte un avantage adaptatif à la plante, les connaissances dans ce domaine ont permis le développement par biomécanisme de matériaux superhydrophobes (Bhushan, 2012).

1.3.3. Protection contre la perte en eau

Chez *Arabidopsis*, il a été montré que la sécheresse et le stress osmotique provoquent une accumulation des lipides constituant la cuticule, associée à une meilleure tolérance à ces stress, suggérant que l'induction de la production de la cuticule fait partie des mécanismes de tolérance aux stress hydriques (Kosma *et al.*, 2009).

Cependant, des études réalisées sur diverses espèces indiquent qu'il n'y pas toujours de corrélation entre l'épaisseur de la cuticule et la résistance à la dessiccation de la plante (Riederer and Schreiber, 2001). En revanche, des défauts dans la composition ou l'organisation de la cuticule peuvent affecter fortement sa perméabilité (Bessire *et al.*, 2011). Néanmoins, comme le manque d'un composé cuticulaire est parfois accompagné d'autres changements dans la composition de la cuticule, la contribution précise de chaque composé cuticulaire et ses caractéristiques protectrices sont souvent difficiles à évaluer. Une étude a montré que les cires contribuent environ à 95% de la tolérance à la sécheresse chez les fruits de Tomate dépourvus de leur cires cuticulaires après un traitement par un solvant organique (Leide *et al.*, 2007). Les composés non polaires, tels que les alcanes, semblent plus particulièrement importants pour la perméabilité de la cuticule étant associés à une diminution de la perméabilité, tandis que les composés non aliphatiques, tels que les triterpènes, apparaissent moins efficaces contre la rétention d'eau (Leide *et al.*, 2007; Buschhaus and Jetter, 2012). Ce point fut démontré dans une étude utilisant deux espèces de Piment, opposées dans leur phénotype de tolérance à la dessiccation. En effet, le taux d'alcanes, mais pas la quantité totale de cires, était négativement corrélé à la perméabilité de la cuticule, l'espèce se desséchant le plus rapidement ayant trois fois plus de cires que l'autre (Parsons *et al.*, 2012).

De même, la quantité de cutine n'est pas nécessairement une indication de la perméabilité de la cuticule. Par exemple, des études sur trois mutants de Tomate nommés *cd1-3*, dans lesquels la cutine des fruits est pratiquement inexistante, n'ont révélé que de très faibles changements dans la perte d'eau (Isaacson *et al.*, 2009). En revanche, le mutant d'*Arabidopsis att1* chez qui la quantité de cutine totale est diminuée de 30%, présente une augmentation de la perméabilité cuticulaire (Xiao *et al.*, 2004). De la même façon, le mutant *pec1* (*permeable cuticle1*), un mutant d'une ATP binding cassette (ABCG32) chez *Arabidopsis*, montre une diminution de 40% de la cutine ce qui entraîne une augmentation de la dessiccation chez les plantes mutantes (Bessire *et al.*, 2011).

En résumé, les différentes études menées sont parfois contradictoires et ne permettent pas de déterminer clairement qui des cires ou de la cutine joue un rôle prédominant sur la perméabilité de la cuticule. En revanche, la **composition** de la cuticule et donc son architecture, plus que son épaisseur, semble primordiale à sa fonction de protection contre les pertes en eau.

1.3.4. Protection contre les UV

Les rayons UV et particulièrement les UV-B émis par le soleil peuvent endommager l'ADN, le système photosynthétique et les membranes des plantes (Rozema *et al.*, 1997). Une des propriétés de la cuticule est qu'elle protège les cellules des plantes de ces rayons.

En effet, une étude réalisée sur des cuticules isolées de différentes espèces a montré qu'elles bloquaient efficacement les UV-B tout en laissant passer les longueurs d'ondes plus élevées, nécessaires à la photosynthèse (Krauss *et al.*, 1997). La cuticule permet également de réfléchir de manière très efficace les UV mais aussi les autres longueurs d'ondes de la lumière blanche grâce aux cristaux de cires (Holmes, 2002). Par exemple, la plante succulente *Dudleya brittonii* peut réfléchir jusqu'à 83% des UV-B, mais cette valeur est fortement diminuée si les cires épicuticulaires lui sont retirées (Mulroy, 1979). En accord avec cela, la réflectance des cuticules lisses est faible (<10%) tandis que celle des cuticules pruineuses (aspect de surface poudreux, glauque, dû à des poussières cireuses, trouvé notamment chez la prune et le raisin) est plus élevée (20%) (Riederer and Muller, 2008). Toutefois, plusieurs études ont montré que l'absorbance des radiations UV par l'épiderme joue un rôle plus important que la réflexion par les cires dans la protection des plantes contre les longueurs d'ondes nocives (Shepherd and Wynne Griffiths, 2006).

1.3.5. Protection contre l'attaque des agents pathogènes

Au-delà des rôles décrits précédemment, la cuticule constitue la première barrière physique contre l'attaque des agents pathogènes. Ces agents pathogènes peuvent être de natures différentes. Ici nous nous intéresserons aux études menées sur le rôle de la cuticule dans la tolérance aux attaques par des bactéries, des champignons et des insectes.

1.3.5.1. Protection contre les bactéries

Tang et collaborateurs ont identifié une plante mutée dans le gène **LACS2** comme étant plus sensible à une souche avirulente (qui ne déclenche pas la maladie) de la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) (Tang *et al.*, 2007). Différents degrés de nécrose ont pu être observés sur les feuilles du mutant *lacs2* trois ou quatre jours après inoculation, ce qui représente des symptômes beaucoup plus sévères que ceux observés classiquement lors d'une infection d'une plante sauvage par une souche virulente (qui déclenche la maladie). En outre, les plantes *lacs2* possèdent une cuticule environ 1,6 fois plus fine que le sauvage et présentent également les phénotypes classiques d'un mutant affecté dans la cuticule, tels que la sensibilité à la dessiccation, la diffusion accélérée de la chlorophylle des feuilles dans l'éthanol, et la capacité des surfaces foliaires à permettre la germination du pollen sauvage (Tang *et al.*, 2007).

Un autre mutant d'*Arabidopsis* sensible à *P. syringae* a été isolé lors d'un crible utilisant une souche portant le gène bactérien *avrPto* fusionné à la luciférase (Xiao *et al.*, 2004). AvrPto est une protéine de virulence, délivrée à l'intérieur de la cellule de la plante par

le système de sécrétion de type III (SST3) de la bactérie, qui est activé lorsque la bactérie reconnaît le contact avec l'hôte à infecter. Le mutant d'*Arabidopsis* identifié fut appelé "*aberrant induction of type three genes 1*" (**att1**) car après infection, l'expression des gènes associés au SST3 de *P. syringae* était significativement augmentée (10 fois plus qu'avec le sauvage 12 heures après infiltration). Le clonage du gène révéla qu'*ATT1* code pour une ω -hydroxylase (CYP86A2) appartenant à la famille des cytochromes P450, requise pour la biosynthèse de la cutine (voir section 1.1.3.1). Le mutant *att1* montre une diminution de 30% de la quantité de cutine totale et une augmentation de la perméabilité cuticulaire, le rendant également plus sensible à la dessiccation (Xiao *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que la cuticule de ce mutant est plus perméable, y compris à des petites molécules provenant de l'hôte, qui pourraient être perçues par la bactérie induisant ainsi les gènes de type III. Il est également possible que le passage de l'eau à travers une cuticule plus perméable vers les chambres sous-stomatiques, qui sont les lieux de colonisation principaux de *P. syringae*, dilue un facteur d'alerte qui pourrait potentiellement limiter la propagation de la bactérie.

1.3.5.2. Protection contre les champignons

Dans les interactions plantes-pathogènes, la cuticule peut également avoir un rôle de signalisation. En effet, les spores de certains champignons ont besoin de signaux chimiques provenant de l'hôte pour initier la formation d'un appressorium afin de pénétrer à l'intérieur de la cellule végétale (Kolattukudy *et al.*, 1995). Par exemple, la formation d'appressoriums chez *Magnaporthe grisea* (qui cause la pyriculariose chez le riz) peut être induite sur des surfaces de verre recouvertes de cires cuticulaires ou même d'acides gras à longues chaînes et d'alcools gras ou d'alcane de synthèse (Hegde and Kolattukudy, 1997). Il a également été démontré que les acides gras ω -hydroxylés provenant de la cutine ont un effet positif sur la pénétration des spores de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* et activent l'expression de son gène de cutinase (Woloshuk and Kolattukudy, 1986).

De manière surprenante, plusieurs mutants d'*Arabidopsis* affectés dans la synthèse de cutine ont été trouvés comme plus résistants au champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. La lignée d'*A. thaliana* **CUTE**, qui exprime de manière ectopique une cutinase extracellulaire de *Fusarium solani* f.sp. *pisi* (Sieber *et al.*, 2000), ne montre en effet aucun symptôme après inoculation avec *B. cinerea*. En revanche, cette lignée est plus sensible à trois autres nécrotrophes: *Plectosphaerella cucumerina*, *Alternaria brassicicola* or *Sclerotinia sclerotiorum* (Chassot, 2006; Chassot *et al.*, 2007). Cette résistance semble indépendante des trois voies de signalisation majeures impliquant les phytohormones acide salicylique (SA), acide jasmonique (JA) et éthylène (ET). Une analyse transcriptomique a permis de mettre en évidence huit gènes différentiellement exprimés chez les plantes CUTE, trois membres de la famille des LTP, deux membres des peroxydases (PO), et deux membres des inhibiteurs de protéines (PI). Ces trois familles de protéines ont déjà été montrées comme pouvant jouer un rôle dans la défense contre l'attaque des agents pathogènes (Chassot *et al.*, 2008).

Le mutant **bodyguard**, qui présente des défauts cuticulaires, est également résistant à

B. cinerea. Cette absence de symptômes est accompagnée du relargage de composés antifongiques et de l'augmentation de l'expression des mêmes gènes dont l'expression est dérégulée chez les plantes CUTE (Chassot *et al.*, 2007). De manière similaire, il a été montré que le mutant *lacs2* est plus résistant à *B. cinerea*, et il a été proposé que cette résistance soit probablement due aux mêmes mécanismes que pour les mutants précédemment cités, impliquant une activité antifongique accrue (Tang *et al.*, 2007).

Le cultivar de Tomate Delayed Fruit Deterioration (**DFD**) est lui aussi plus résistant à *B. cinerea* (Figure 1.15), mais il semblerait que cette résistance soit due à un taux de cutine et de cires plus élevées que d'autres cultivars, tel qu'Ailsa Craig (AC). Les fruits du mutants DFD montrent en effet au dernier stade de maturation 36% de cires en plus qu'AC, une quantité de cutine doublée, mais une épaisseur de cuticule identique (Saladié *et al.*, 2007). Des analyses biochimiques et biomécaniques indiquent que la matrice de cutine de DFD est bien plus dense que celle d'AC, ce qui pourrait expliquer sa résistance au champignon nécrotrophe.

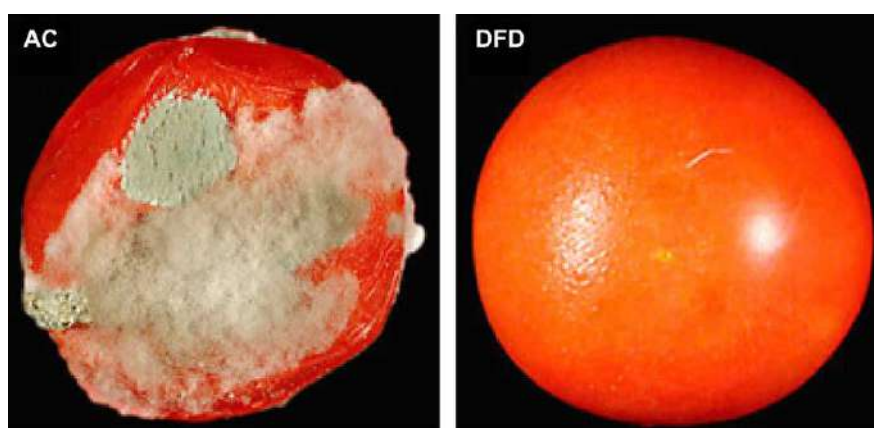


Figure 1.15. Sensibilité à *B. cinerea* chez la Tomate (d'après Saladié *et al.*, 2007)

Des fruits intacts, au stade rouge-mature, des cultivars Ailsa Craig (AC) et Delayed Fruit Deterioration (DFD) ont été infectés avec *B. cinerea* par application en surface. En plus d'être résistant à *B. cinerea*, DFD est tolérant à la sécheresse, et présente des taux de cires et de cutine plus élevés qu'AC au stade rouge-mature.

D'autre part, des études ont montré que l'application par spray de monomères ou d'hydrolats de cutine permet la protection partielle d'un cultivar très sensible d'orge contre *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (Schweizer *et al.*, 1996). Des études plus récentes ont démontré que la cutine a un effet sur l'expression des gènes de défense et la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui sert à la signalisation de diverses réponses défensives des plantes (Kim *et al.*, 2008; J., H., Park *et al.*, 2008). Plus récemment, L'Haridon et collaborateurs ont trouvé une corrélation positive entre un défaut de synthèse de la cuticule, la perméabilité de celle-ci et la production constitutive des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui déclenche la résistance à *B. cinerea* (L'Haridon *et al.*, 2011).

Ces données ont permis d'avancer deux hypothèses pour expliquer la résistance des plantes présentant un défaut de cuticule. Premièrement, des composés spécifiques de la cuticule pourraient agir comme signaux intracellulaires pour activer les défenses de la plante, et la production et/ou le relargage de composés antifongiques. Dans la deuxième

hypothèse, la cuticule plus perméable des mutants pourrait permettre à des molécules élicitrices provenant de *B. cinerea* ou du milieu PDB (potato dextrose broth, utilisé comme milieu d'inoculation) de pénétrer plus facilement à l'intérieur des cellules végétales, activant plus rapidement les défenses de la plante.

1.3.5.3. Protection contre les insectes

La cuticule forme non seulement une barrière physique contre l'attaque d'insectes, mais les cires cuticulaires en particulier peuvent servir de piège aux pollinisateurs ou aux proies potentielles. Rowe et collaborateurs ont examiné comment les cires de trois plantes carnivores différentes, *Nepenthes ventrata*, *Brocchinia reducta* et *Catopsis berteroniana*, influencent l'attachement et la mobilité de la mouche *Calliphora vomitoria* (Gaume *et al.*, 2004). L'étude révéla que les cires épicuticulaires qui recouvrent l'intérieur des pièges en forme d'urne des trois plantes recouvrent les setæ (poils microscopiques) des pattes de la mouche, la faisant ainsi glisser et diminuant fortement sa capacité à quitter la plante (Gaume *et al.*, 2004).

Ayant décrit les rôles de défense de la cuticule en réponse à différents stress biotiques, la prochaine section décrit les réponses immunitaires de la plante ainsi que le rôle clé joué par la régulation transcriptionnelle dans la mise en place d'une réponse de défense appropriée.

1.4. Les réponses immunitaires

En plus de posséder des défenses physiques, passives, telles que la cuticule ou la paroi, les plantes sont capables de percevoir activement la présence de pathogènes, et de déclencher diverses réponses immunitaires pour se défendre.

Contrairement aux animaux, les plantes n'ont pas de cellules immunitaires spécialisées et chaque cellule végétale a la capacité de déclencher ces réponses immunitaires de manière autonome. Cette immunité innée déclenche des réponses à la fois locales et systémiques, permettant à la plante de combattre les agents pathogènes de manière rapide et localisée mais aussi étendue dans le temps et dans l'espace. Le système immunitaire des plantes est classifié en deux niveaux décrits ci-après.

1.4.1. La PTI

Le premier niveau de défense fait intervenir des récepteurs situés à la surface cellulaire appelés **PPR** (pattern recognition receptors), conduisant à un ensemble de réactions de défenses basales appelé **PTI** (PPR-triggered immunity). En effet, la PTI repose sur la perception par des PRRs de motifs moléculaires spécifiques qui sont reconnus par la plante comme des signaux de danger. Ces signaux peuvent provenir de l'agent pathogène, comme les motifs moléculaires associés aux microbes ou pathogènes (**MAMP/PAMP**), ou de la plante, comme les motifs moléculaires associés aux dommages (**DAMP**) qui sont libérés après perception du pathogène ou après des dommages causés à la cellule par le pathogène (Boller and Felix, 2009). Les protéines d'*Arabidopsis* FLS2 (Flagellin Sensing2)

et EFR (EF-Tu receptor), reconnaissant respectivement les PAMP bactériens flagelline et facteur d'élongation EF-Tu, sont les PRRs les mieux caractérisés (Zipfel, 2014).

La PTI comprend une large gamme de réponses, de la cellule à l'organisme tout entier, visant à freiner la réplication du pathogène et la propagation de la maladie. Les premiers événements cellulaires incluent la production rapide d'espèces réactives de l'oxygène (**ROS**), l'activation de mitogen-activated protein kinases (**MAPK**), et l'expression de **gènes de défense** (Boller and Felix, 2009). La PTI est suffisante pour repousser la plupart des microbes, et la meilleure preuve de son importance biologique est le fait que les pathogènes ont évolué de manière à échapper ou à supprimer activement cette première couche de défense, afin de développer la maladie (Dodds and Rathjen, 2010; Dou and Zhou, 2012). De plus, les plantes qui sont privées de leurs PRR ou de certains composants de signalisation de la PTI sont souvent plus sensibles aux agents pathogènes (adaptés ou non à contourner la PTI) (Macho and Zipfel, 2014).

1.4.2. L'ETI

La coévolution entre les plantes et les agents pathogènes a poussé ces derniers à développer une batterie de facteurs de virulence appelés **effecteurs**, qui sont injectés à l'intérieur des cellules de la plante grâce à leur système de sécrétion de type III, afin de diminuer les défenses basales (Deslandes and Rivas, 2012). En retour, les plantes ont développé des moyens de détecter ces effecteurs, déclenchant un second niveau de défense de plus grande amplitude appelée *effector-triggered immunity* (**ETI**), qui arrête la croissance de l'agent pathogène (Jones and Dangl, 2006). Les deux acteurs de cette coévolution renouvellent sans-cesse leurs armes moléculaires afin de contourner les mécanismes de l'adversaire, créant ainsi des cycles d'attaque et de contre-attaque perpétuels pour le contrôle de la santé de la plante (Figure 1.16 ; Jones and Dangl, 2006).

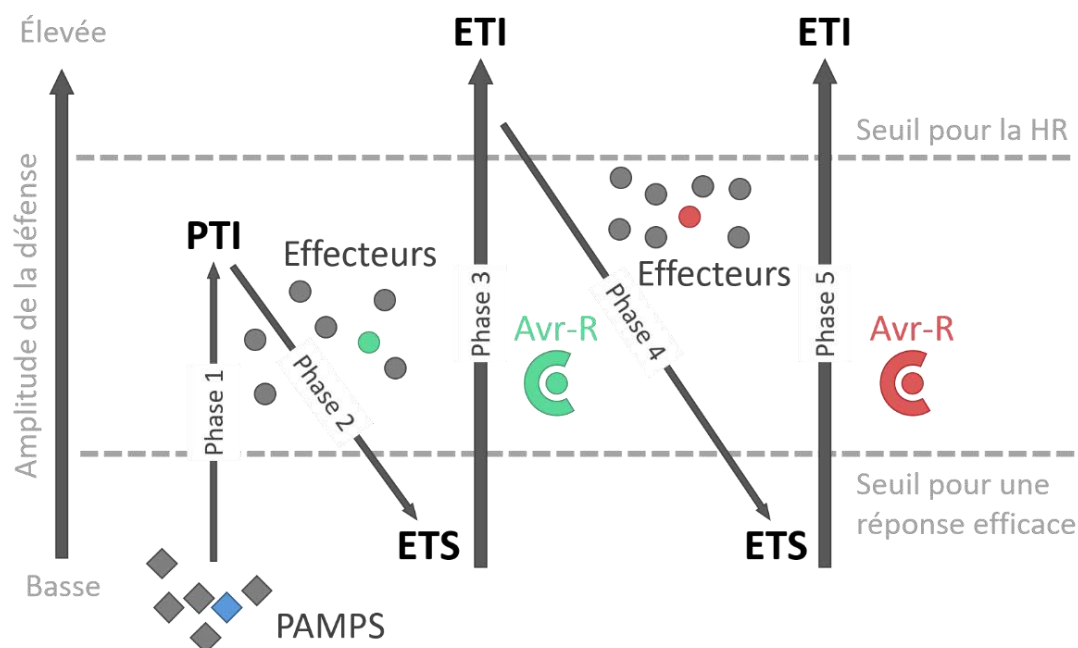


Figure 1.16. Le modèle zigzag (adapté de Jones and Dangl, 2006)

Le modèle zigzag illustre l'intensité des réponses de défense de la plante mises en place lors de l'interaction avec un agent pathogène. Dans la **phase 1**, la plante détecte les motifs moléculaires associés aux microbes ou agents pathogènes (MAMP/PAMP, losange bleu) *via* les PRR afin de déclencher un ensemble de réactions de défenses basales appelé PTI (PRR-triggered immunity). Dans la **phase 2**, des agents pathogènes ayant réussi à infecter la plante délivrent des effecteurs qui interfèrent avec la PTI, ou qui permettent la nutrition ou la dispersion de l'agent pathogène, ce qui entraîne la sensibilité de la plante ou ETS (effector-triggered susceptibility). Dans la **phase 3**, un effecteur (indiqué en vert) est reconnu par une protéine NB-LRR, activant l'ETI (effector triggered immunity), une version amplifiée de la PTI qui dépasse souvent le seuil d'induction de la réponse hypersensible (HR). Dans la **phase 4**, des individus pathogènes qui ont perdu l'effecteur vert sont sélectionnés, et ont éventuellement gagné de nouveaux effecteurs par transfert de gène horizontal (en rouge) qui peuvent aider l'agent pathogène à supprimer l'ETI. Dans la **phase 5**, la sélection favorise de nouveaux allèles de NB-LRR de plantes qui peuvent reconnaître un de ces effecteurs nouvellement acquis, déclenchant à nouveau l'ETI.

Pour induire l'ETI, les plantes utilisent une famille de récepteurs intracellulaires polymorphiques "nucleotide-binding/leucine-rich-repeat" (**NB-LRR**), similaires aux récepteurs de type NOD (NLR) chez les animaux, qui interceptent de manière directe ou indirecte les facteurs de virulence injectés à l'intérieur des cellules de l'hôte par les agents pathogènes. Le génome des plantes compte généralement plusieurs centaines de gènes codant pour des NB-LRR (environ 150 chez *Arabidopsis* par exemple ; Meyers *et al.*, 2003). Dû à la pression exercée par les attaques constantes des agents pathogènes, ces gènes évoluent très rapidement: leur nombre augmente et leurs séquences se diversifient au fil de l'évolution afin d'améliorer les capacités de reconnaissance des récepteurs (Guo *et al.*, 2011; Jacob *et al.*, 2013; Karasov *et al.*, 2014).

La réponse aval de l'ETI est en partie similaire à celle de la PTI, elle comprend notamment des flux rapides de **calcium**, la production de **ROS**, l'activation en cascade de **MAPK**, la production de **phytohormones** et une **reprogrammation** de l'expression génique (Cui *et*

al., 2015). Cependant, dans l'ETI, ces phénomènes sont amplifiés ou de plus longue durée que dans la PTI (Tsuda and Katagiri, 2010). Un aspect qui reste largement méconnu à ce jour concerne les voies de signalisation qui opèrent immédiatement en aval de l'activation des NB-LRR et qui font le lien avec les réponses en aval. La reprogrammation transcriptionnelle, une étape clé pour la mise en place de la réponse défensive, est détaillée dans la section suivante.

Enfin, l'ETI est souvent accompagnée par une forme de mort cellulaire programmée au site d'infection appelée réponse hypersensible (**HR**), qui limite la propagation du microorganisme dans la plante (Figure 1.17). Bien que souvent utilisée comme un marqueur de l'ETI, HR et résistance ne sont pas toujours couplées (Bendahmane *et al.*, 1999; Gassmann, 2005; Coll *et al.*, 2010; Heidrich *et al.*, 2011).

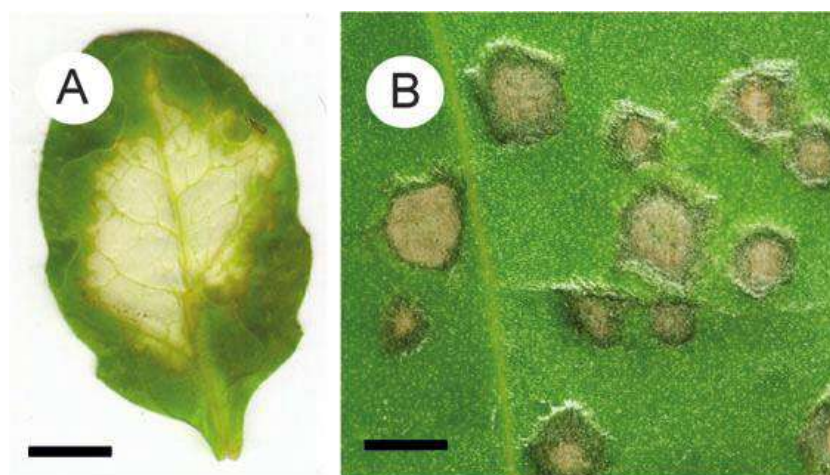


Figure 1.17. Illustration de la Réponse Hypersensible (d'après Mur *et al.*, 2008)

(A) Feuille d'*Arabidopsis* 24h après infection avec 1×10^6 cellules.ml⁻¹ de la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpm1*. Echelle = 1 cm. **(B)** Détail d'une feuille de *Nicotiana tabacum* cv. Samsun 72h après infection avec le Virus de la Mosaïque du Tabac (TMV). Echelle = 0,5 cm.

1.4.3. Régulation transcriptionnelle des réponses de défense

Dans la cellule, la régulation de l'expression des gènes est contrôlée par un certain nombre de processus comme la méthylation de l'ADN, l'organisation de la chromatine ou la liaison de FT à des séquences spécifiques de régions régulatrices de l'ADN.

Les FT possèdent un domaine de liaison à l'ADN leur permettant de se lier à des séquences promotrices *cis* situées sur leurs gènes cibles, ainsi qu'un domaine d'activation ou de répression de la transcription. L'action des FT peut être modulée au niveau transcriptionnel et post-traductionnel, par des associations à des **interacteurs protéiques** ou par des modifications post-traductionnelles (**MPT**). Les plantes possèdent un grand nombre de gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels, et par exemple chez *Arabidopsis*, entre 6 et 10% du génome code pour des FT (Pireyre and Burow, 2015). Sur la base de leur structure et sur la comparaison des séquences des domaines de liaison à l'ADN, les FT ont été classés en plusieurs familles (Pabo and Sauer, 1992).

Chez les plantes, plusieurs familles de FT, dont les AP2/ERF, bHLH, basic domain Leucine Zipper (bZIP), MYB, TGA bZIP (TGA basic leucine zipper), Whirly et les WRKY ont été montrés comme étant impliqués dans la régulation des réponses de la plante face aux stress biotiques (Buscaill and Rivas, 2014; Eulgem and Somssich, 2007; Dubos *et al.*, 2010). La reprogrammation transcriptionnelle des cellules implique des changements majeurs dans l'expression des gènes afin de privilégier la défense par rapport à d'autres processus tels que la croissance ou le développement. En effet, il a été démontré que certains régulateurs sont responsables du compromis (*trade-off* en anglais) entre croissance et immunité afin de permettre une réallocation des ressources selon le contexte, et permettre ainsi la survie de la plante (Fan *et al.*, 2014; Lozano-Durán *et al.*, 2013; Malinovsky *et al.*, 2014). De plus, des travaux indiquent que jusqu'à 25% des gènes d'*Arabidopsis* voient leur niveau de transcription modifié suite à l'infection par un agent pathogène (Maleck *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2003). Ainsi, de nombreuses études ont révélé le rôle clé des FT dans l'établissement de la résistance aux maladies engendrées par l'attaque d'un agent pathogène, et certaines revues résument par ailleurs ces travaux (Buscaill and Rivas, 2014; Tsuda and Somssich, 2015).

Mon travail de thèse ayant été focalisé sur l'étude du FT d'Arabidopsis MYB30, la section suivante se concentre sur la description de la famille de FT de type MYB, les réactions de défense contrôlées par MYB30, et les mécanismes de régulation de ce FT.

1.5. MYB30, un régulateur positif de la réponse hypersensible

1.5.1. Les facteurs de transcription de type MYB

Les protéines MYB sont caractérisées par un domaine de liaison à l'ADN très conservé: le **domaine MYB**. Ce domaine peut contenir jusqu'à quatre répétitions (R) imparfaites de séquences d'environ 52 acides aminés, chacune formant trois hélices alpha (Dubos *et al.*, 2010, [Figure 1.18](#)). La seconde et la troisième hélice de chaque répétition contiennent trois résidus tryptophane (ou hydrophobes) régulièrement espacés qui, ensemble forment un cœur hydrophobe (Ogata *et al.*, 1996). La troisième hélice de chaque répétition est l'hélice de reconnaissance qui est en contact direct avec l'ADN, et s'intercale dans le sillon majeur (Jia *et al.*, 2004).

Les protéines MYB sont classées en différents groupes en fonction du nombre des répétitions MYB qu'elles contiennent (une, deux, trois ou quatre, [Figure 1.18](#)). Toutes les classes sont retrouvées chez les plantes, ce qui en fait le taxon avec la plus grande diversité de protéines MYB.

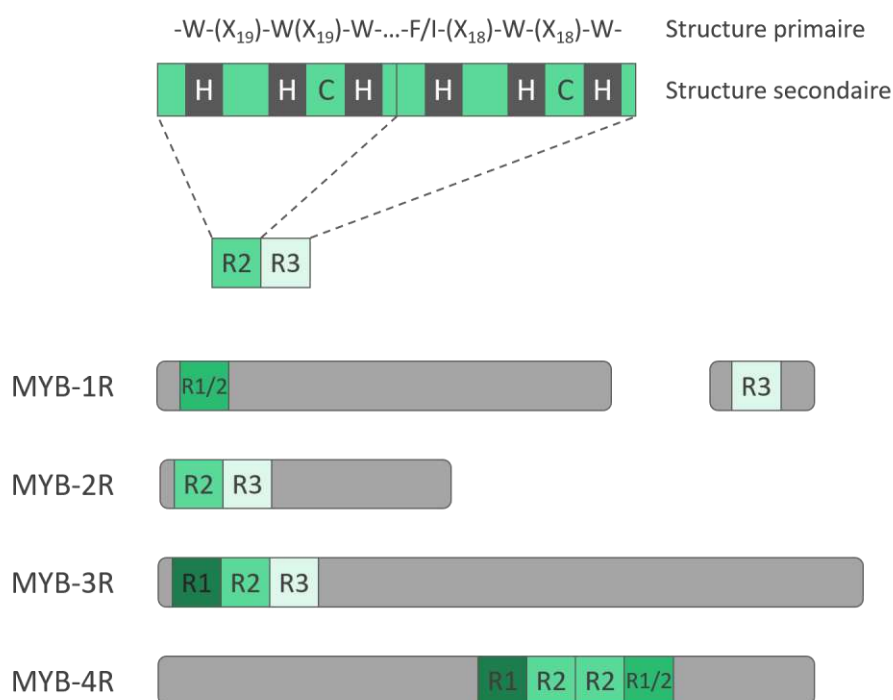


Figure 1.18. Les classes de facteurs de transcription de type MYB chez les plantes (adapté de Dubos *et al.*, 2010)

Les protéines MYB des plantes sont classées en fonction du nombre de répétitions MYB (R) adjacentes qu'elles contiennent. Les structures primaires et secondaires d'une protéine MYB-R2R3 typique sont indiquées. C: coude; H: hélice; W: Tryptophane; X: acide aminé aléatoire.

- Les protéines **MYB-1R**

Ce groupe hétérogène comprend des protéines avec une seule répétition MYB (R3-MYB) ou une répétition MYB incomplète (R1/2-MYB) (Figure 1.18), et sont collectivement désignés en anglais par *MYB-related*. Chez *Arabidopsis* on retrouve 68 protéines de ce groupe (Du *et al.*, 2013), pour beaucoup impliqués dans la morphogenèse végétale (Pesch and Hülskamp, 2009; Wang and Chen, 2014), dans le métabolisme secondaire (Dubos *et al.*, 2010; Nemie-Feyissa *et al.*, 2014) ou dans la régulation du cycle circadien (Nguyen and Lee, 2016). Certains ont été décrits comme des régulateurs transcriptionnels contrôlant l'homéostasie du phosphate (Nagarajan *et al.*, 2016). D'autres sont capables de contrôler l'expression génique de façon indirecte à travers la modification des histones ou le remodelage de la chromatine (Boyer *et al.*, 2002; Boyer *et al.*, 2004; Marian and Bass, 2005; Clapier and Cairns, 2009).

- Les protéines **MYB-2R** (ou **MYB-R2R3**)

Les protéines MYB-R2R3 contiennent deux répétitions MYB, constituent le groupe le plus étendu des FT de type MYB chez les plantes, avec 126 membres chez *Arabidopsis* (Dubos *et al.*, 2010, Figure 1.19), et sont absentes chez les animaux. Il a été proposé que les R2R3-MYB ont évolué à partir d'un ancêtre R1R2R3-MYB, par la perte de la répétition R1 puis par l'expansion de cette famille de gènes (Rosinski and Atchley, 1998; Du *et al.*, 2013). Sur la base de la conservation du domaine de liaison à l'ADN situé dans la partie

N-terminale de la protéine et de motifs d'acides-aminés conservés localisés dans la partie C-terminale, les FT MYB-R2R3 ont été divisées en 23 sous-groupes (Dubos *et al.*, 2010, [Figure 1.19](#)). De nombreuses études ont permis de révéler l'implication de cette classe de FT de type MYB dans le métabolisme primaire et secondaire, la différenciation cellulaire, les processus développementaux ainsi que dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques (Ambawat *et al.*, 2013).

- Les protéines **MYB-3R**

Les protéines MYB-3R sont caractérisées par la présence de trois répétitions MYB appelées R1, R2 et R3 ([Figure 1.18](#)). Chaque répétition de MYB-3R identifiée chez le Tabac ou chez *Arabidopsis* présente plus de similarité de séquence avec les répétitions MYB des vertébrés qu'avec celles des autres protéines MYB de plante. Par conséquent, les protéines MYB à trois répétitions de plantes et d'animaux représentent un groupe distinct dans la superfamille MYB et sont communément appelées MYB-3R (Ito, 2005). Ces protéines sont codées par cinq gènes chez *Arabidopsis* et sont retrouvées dans la plupart des organismes eucaryotes, suggérant qu'elles représentent une classe de gènes conservés qui dérivent des MYB-R2R3 (Stracke *et al.*, 2001; Ambawat *et al.*, 2013). Les MYB-3R sont associées à la régulation transcriptionnelle des cyclines et de ce fait interviennent dans le contrôle du cycle cellulaire (Haga *et al.*, 2007; Ambawat *et al.*, 2013).

- Les protéines **MYB-4R**

Les protéines MYB-4R contiennent quatre répétitions MYB et constituent la plus petite des classes de protéines MYB ([Figure 1.18](#)). Une seule protéine MYB-4R semble être codée par le génome de différentes espèces végétales et à ce jour, son rôle n'a pas encore été identifié (Ambawat *et al.*, 2013).

1.5.2. Fonctions des FT de type MYB

Alors que les vertébrés ne possèdent que trois protéines MYB (c-Myb, A-Myb et B-Myb) (Lipsick *et al.*, 2001), les membres de la famille des FT de type MYB chez les plantes sont sur-représentés. Chez les vertébrés, ces protéines forment une petite famille jouant un rôle central dans la prolifération cellulaire et le développement. Chez les plantes, l'expansion des protéines MYB-R2R3 pourrait être apparue en réponse à leur adaptation à un mode de vie sessile. Les FT de type MYB sont impliqués dans une grande diversité de fonctions chez les plantes supérieures (Dubos *et al.*, 2010) incluant la régulation du **métabolisme primaire** et **secondaire** (Lepiniec *et al.*, 2006; Gigolashvili, Yatusovich, *et al.*, 2007; Gigolashvili, Berger, *et al.*, 2007; Gigolashvili *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009), le contrôle du **développement cellulaire** (Kang *et al.*, 2009) et du **cycle cellulaire** (Haga *et al.*, 2007), les **réponses de défense** à divers stress **biotiques** et **abiotiques** (Seo *et al.*, 2009), la synthèse d'**hormones** (Seo and Park, 2010) et la **transduction de signaux** (Shin *et al.*, 2007).

En effet, les FT de type MYB jouent d'importants rôles en tant que régulateurs des **réponses de défense** contre l'attaque d'agents pathogènes chez différentes espèces. Par exemple, chez *Nicotiana tabacum*, l'expression de plusieurs gènes MYB-R2R3 est induite

en réponse à des éliciteurs (Sugimoto *et al.*, 2000). Chez l'Orge (*Hordeum vulgare*), HvMYB6 est un régulateur positif des réponses immunitaires face à *B. graminis* (Chang *et al.*, 2013). Chez *Oryza sativa*, un gène de type MYB apparenté à AtMYB78 a été démontré comme étant exprimé en réponse aux attaques fongiques (Lee *et al.*, 2001). Chez Arabidopsis, le FT MYB-R2R3 MYB108/BOS1 est un régulateur positif de défense, puisque le mutant d'Arabidopsis *bos1* présente de plus grands symptômes après infection par divers agents pathogènes biotrophes ou nécrotrophes (Mengiste *et al.*, 2003). De plus, le FT MYB-R2R3 MYB72 fut identifié comme l'un des gènes significativement induit dans les racines d'Arabidopsis en réponse à *Pseudomonas fluorescens* WCS417r (Verhagen *et al.*, 2004). Ce FT spécifique des racines est un facteur de la signalisation précoce qui fonctionne comme un nœud de convergence de la résistance systémique induite (ISR) déclenchée par divers microorganismes bénéfiques (Van der Ent *et al.*, 2008). Enfin, MYB44 agit comme un intégrateur du *cross-talk* entre les voies de signalisation SA et JA durant les réponses de défense (Shim and Choi, 2013).

1.5.3. La sous-famille MYB-R2R3 S1

Parmi les MYB-R2R3, la sous famille S1 est composée de cinq membres (Figure 1.19), dont MYB30, sujet d'étude de cette thèse. Afin d'avoir une vision plus globale des fonctions des plus proches homologues de MYB30, cette section décrit les rôles connus des autres membres de cette sous-famille.

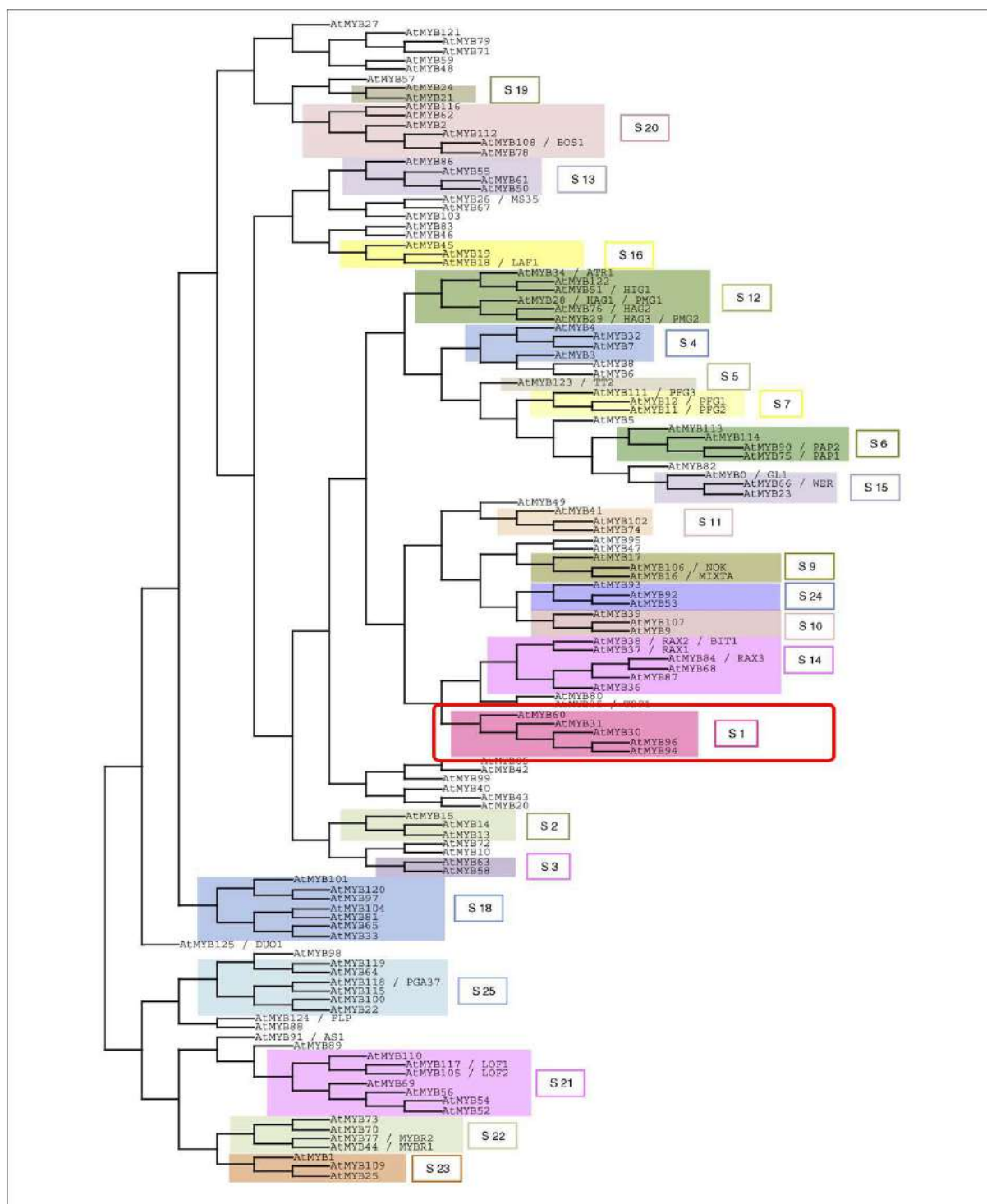


Figure 1.19. Représentation schématique des relations entre les différents sous-groupes de protéines MYB-R2R3 (d'après Dubos *et al.*, 2010)

L'arbre a été construit en utilisant le logiciel Clustal X2, grâce à la méthode de *neighbor joining* et 1000 bootstraps avec des séquences pleines longueurs d'acides aminés de protéines MYB. Sur la base de la conservation du domaine de liaison à l'ADN et des motifs d'acides aminés du domaine C-terminal, les protéines MYB-R2R3 ont été divisées en 23 sous-groupes. Le sous-groupe S1, auquel appartient MYB30, est encadré en rouge.

- MYB60

La protéine MYB60 a tout d'abord été décrite comme agissant en aval de la cascade de signalisation de l'ABA dans des conditions de sécheresse afin de réguler l'ouverture des stomates et la croissance racinaire (Cominelli *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2011). Une autre étude également a montré que le gène *MYB60* d'*Arabidopsis* est capable d'inhiber la biosynthèse des anthocyanes chez la laitue (J.,-S., Park *et al.*, 2008). En effet, la surexpression de MYB60 est corrélée à la diminution d'accumulation des anthocyanes chez cette plante.

- MYB31

Très peu de choses sont connues concernant MYB31. Une étude transcriptomique a détecté que l'expression de *MYB31* était induite 30 minutes après traitement à la chitine (Libault *et al.*, 2007) tandis qu'une seconde étude indique que ce gène est exprimé après traitement avec diverses phytohormones telles que les gibbérellines, l'auxine et l'acide salicylique (Yanhui *et al.*, 2006).

- MYB94 et MYB96

MYB94 et MYB96 ont clairement été identifiés comme des régulateurs positifs de la production des **cires cuticulaires**, et ce notamment afin de promouvoir la tolérance à la sécheresse (voir également section 1.1.4 "Régulation de la biosynthèse de la cuticule"). En effet, les deux gènes sont induits en condition de **sécheresse** et après traitement à l'**ABA**, et semblent agir dans une partie spécifique de la voie de signalisation de l'ABA, en aval des kinases SnRK2, afin d'activer la biosynthèse de cires cuticulaires (Seo *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2011; Lee and Suh, 2015; Cui *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016). Il a notamment été démontré que MYB94 et MYB96 sont capables de se lier directement aux promoteurs de certains gènes de la voie de biosynthèse des cires tels que *KCS1*, *KCS2*, *KCS6*, *KCR1*, *CER2*, *CER3*, *FAR3*, *ECR* et *WSD1*, et qu'ils partagent même certains sites de liaison sur ces promoteurs (Seo *et al.*, 2011; Lee and Suh, 2015; Lee *et al.*, 2016). En accord avec ces données, il a été montré que les mutants simples *myb94* et *myb96* étaient plus sensibles à la sécheresse, et de manière intéressante, l'effet de leurs mutations est additif, montrant que les deux FT régulent positivement la tolérance à la sécheresse indépendamment l'un de l'autre (Lee *et al.*, 2016). Par ailleurs, la surexpression de MYB96 d'*Arabidopsis* dans la brassicacée *Camelina sativa* cause chez ces plantes transgéniques une plus grande accumulation de cires cuticulaires et confère une plus grande tolérance à la sécheresse (Lee *et al.*, 2014). De plus, une autre étude montre que MYB96 est capable de se lier directement au promoteur de *LTP3* afin d'activer son expression, et que LTP3 est nécessaire à la tolérance à la sécheresse et au gel (Guo *et al.*, 2013). Cependant, bien qu'en réponse au froid, l'expression de *MYB96* soit induite et que le FT semble jouer un rôle dans la tolérance à ce stress, ces deux phénomènes semblent indépendants de l'ABA (H., G., Lee and Seo, 2015).

Au-delà de ses rôles dans la tolérance aux stress abiotiques, MYB96 joue un rôle dans des processus développementaux. Effectivement, des études montrent que ce FT coordonne les processus de **dormance** et de **germination** de la graine à travers la régulation

de deux événements distincts. D'une part, MYB96 active l'expression du gène *ABA-INSENSITIVE 4 (ABI4)*, un FT régulateur négatif de la germination, ce qui a pour conséquence de supprimer la consommation des lipides de réserve de l'embryon, et donc d'inhiber la germination (K., Lee and Seo, 2015). D'autre part, MYB96 induit la dormance de la graine en stimulant la biosynthèse d'ABA, de manière indépendante d'ABI4 (Lee *et al.*, 2015).

Enfin, MYB96 joue aussi un rôle dans la **résistance aux attaques d'agents pathogènes**. En effet, la signalisation de l'ABA contrôlée par MYB96 semble améliorer la résistance des plantes adultes en induisant la biosynthèse de SA (Seo and Park, 2010).

1.5.4. Rôle de MYB30 dans l'immunité

MYB30 fut identifié pour dans un crible différentiel d'une librairie de cDNA préparée à partir de cellules d'*Arabidopsis* inoculées avec la bactérie pathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (Lacomme and Roby, 1999). L'expression de *MYB30* est précoce, transitoire et spécifique après traitement avec différentes bactéries avirulentes, et précède la mise en place de la HR (Daniel *et al.*, 1999) (Figure 1.20). De plus, la surexpression de *MYB30* chez *Arabidopsis* ou le Tabac mène à une HR accélérée et intensifiée, une plus grande accumulation des marqueurs moléculaires de la HR, et une plus grande résistance aux agents pathogènes avirulents (Figure 1.20). À l'inverse, la diminution d'expression de *MYB30* via la surexpression d'une construction MYB30 en antisens mène à une forte diminution voire une suppression de la HR (Vailleau *et al.*, 2002). L'ensemble de ces données identifient donc MYB30 comme un **régulateur positif** de la voie de signalisation qui contrôle la **HR** en réponse à une attaque pathogène.

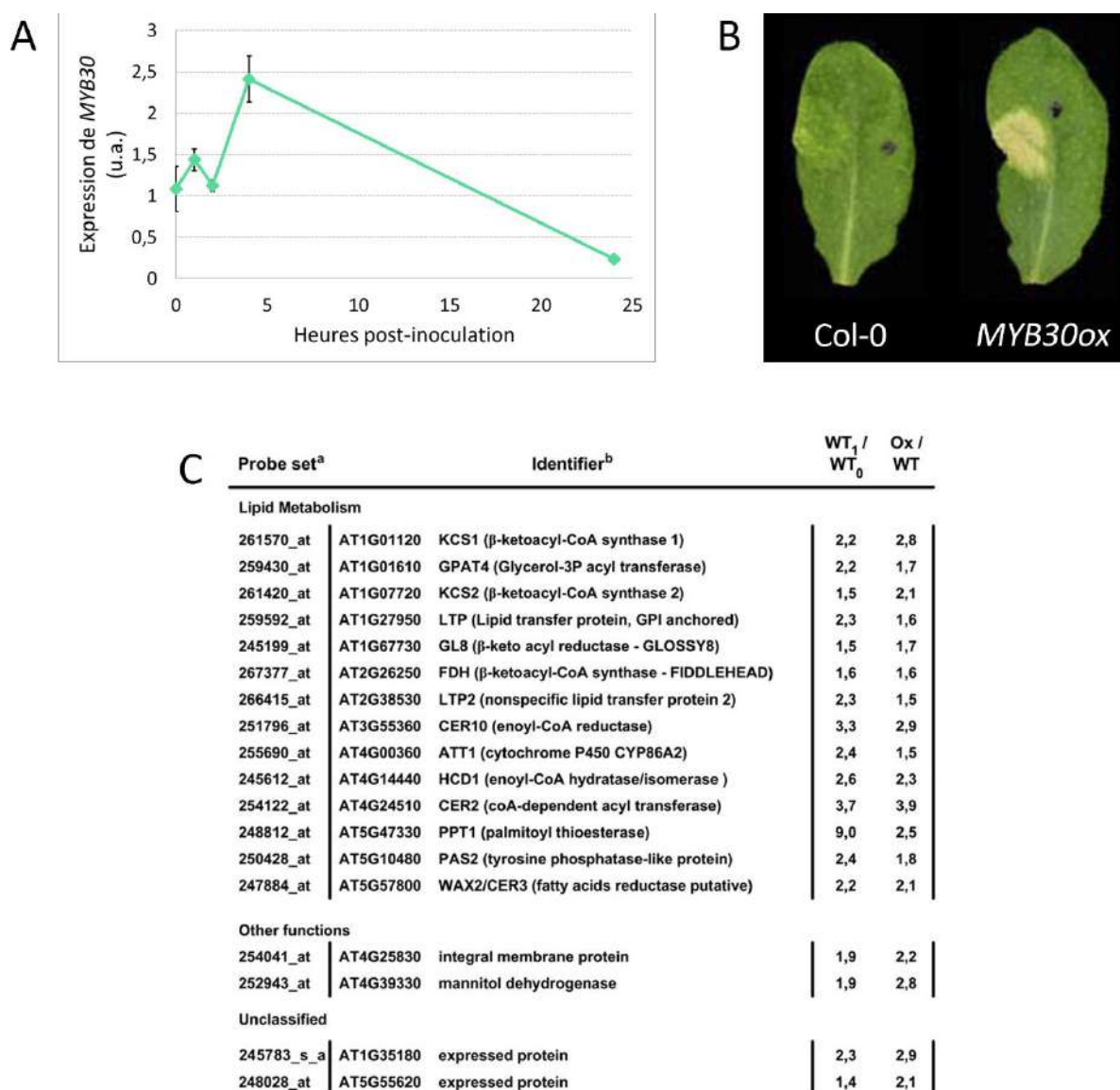


Figure 1.20. MYB30 régule positivement l'expression des gènes de synthèse des VLCFA et la mise en place de la HR

(A) Expression relative déterminée par Q-RT-PCR de *MYB30* chez des plantes Col-0 après inoculation avec *Pst DC3000 AvrRpm1* (5×10^7 cfu.ml⁻¹). Les valeurs d'expression ont été normalisées en utilisant le gène *SAND* comme standard interne. Les valeurs de moyenne et d'erreur-type ont été calculées à partir de trois expériences contenant chacune quatre réplicas (données non publiées). **(B)** Développement de la HR d'une plante sauvage d'*Arabidopsis* Col-0 et d'une lignée surexprimant MYB30 (*MYB30ox*) 4 jours après inoculation avec *Pst DC3000 AvrRpm1* à faible concentration. Les feuilles ont été infiltrées sur une surface d'environ 1cm² sur la moitié gauche (d'après Raffaele *et al.*, 2008). **(C)** Liste des 18 gènes identifiés comme cibles potentiels de MYB30. a: Numéro de sonde Affymetrix; b: Numéro de l'*Arabidopsis* Genome Initiative et fonction potentielle associée. La dernière colonne montre la différence relative d'expression du sauvage inoculé par rapport au sauvage à T0 (WT₁/WT₀) et de la lignée MYB30ox par rapport à la lignée sauvage, toutes deux inoculées avec Xcc 147 (Ox/WT). Les données d'expression sont obtenues après deux expériences indépendantes (d'après Raffaele *et al.*, 2008).

L'expression de *MYB30* en réponse à l'attaque d'agents pathogènes est dépendante de l'accumulation de **SA** (Raffaele *et al.*, 2006). La modulation de l'expression de MYB30 altère le niveau de SA et des gènes associés au SA chez *Arabidopsis*, et la mutation de

gènes responsables de l'accumulation du SA abolie la HR accélérée conférée par la surexpression de MYB30 (Raffaele *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent donc que MYB30 est impliqué dans une boucle d'amplification ou une cascade de signalisation qui module la synthèse de SA, phytohormone nécessaire à la mise en place de la mort cellulaire.

Une analyse transcriptomique révéla que les gènes cibles potentiels de MYB30 sont impliqués majoritairement dans la voie de biosynthèse des **VLCFA** (Raffaele *et al.*, 2008 ; [Figure 1.20](#)). En effet, l'expression ectopique de *MYB30* active les gènes codant pour les sous-unités du complexe FAE telles que *KCS1*, *KCS2*, *KCS10/FDH*, *KCR1/GL8*, *HCD1*, *PAS2*, *CER10*, et d'autres gènes de la voie de synthèse des cires comme *CER2* et *CER3*, mais aussi des gènes impliqués dans la synthèse de la cutine comme *GPAT4* et *ATT1/CYP86A2*. En accord avec ces données, cette étude montra que les feuilles des plantes d'*Arabidopsis* surexprimant *MYB30* accumulent plus de VLCFA que les plantes sauvages, et que cette augmentation est encore plus importante après inoculation avec un agent pathogène bactérien. D'autre part, la composition en cires épicuticulaires est légèrement altérée chez les feuilles des plantes surexprimant MYB30, qui montrent en particulier une augmentation de la quantité d'alcanes C29 et C31. De plus, le phénotype lié à la défense des plantes dérégulées pour l'expression de *MYB30* est dépendant de la voie de biosynthèse des VLCFA, renforçant l'idée que MYB30 module la signalisation menant à la mort cellulaire en accroissant la synthèse de VLCFA ou de leurs dérivés (Raffaele *et al.*, 2008). Les VLCFA peuvent servir de précurseurs aux sphingolipides et aux cires. La production de cires est altérée par la surexpression de *MYB30* mais pas par l'extinction de son expression, suggérant que des activateurs de la synthèse de cires pourraient compenser le manque d'expression de *MYB30*. En conclusion, MYB30 semblerait donc réguler la production des sphingolipides qui pourraient jouer le rôle de signaux de mort cellulaire lors des réponses immunitaires (Berkey *et al.*, 2012).

1.5.5. Rôles de MYB30 dans d'autres processus

En plus de son rôle de régulateur positif des réponses de défense, MYB30 est recruté pour la régulation d'autres processus de signalisation.

Les **brassinostéroïdes (BR)** jouent des rôles importants dans de nombreux processus développementaux et de croissance, mais aussi dans la résistance aux stress/maladies. BES1 (bri1-Ethylmethane Sulphonate suppressor 1) et BZR1 (brassinazole-resistant 1) sont deux FT impliqués dans la signalisation des BR qui régulent des centaines de gènes cibles impliqués dans cette voie de signalisation. Une analyse microarray et des expériences de *chromatin immunoprecipitation* (ChIP) ont permis d'identifier *MYB30* comme une cible directe de BES1 (Li *et al.*, 2009, p.30). Un traitement avec des BR induit l'expression de *MYB30* dans les plantules d'*Arabidopsis*, et les plantes mutées pour *MYB30* montrent une expression des gènes de réponse aux BR diminuée, corrélée avec des phénotypes de réponses aux BR atténués, indiquant que MYB30 active l'expression d'un lot de gènes cibles des BR. Enfin, MYB30 et BES1 sont capables d'interagir ensemble et se lient aux mêmes séquences sur leurs gènes cibles communs (Li *et al.*, 2009). L'ensemble

de ces résultats démontrent donc que MYB30, cible directe de BES1, amplifie la signalisation des BR en coopérant avec BES1 pour activer l'expression des gènes cibles des BR.

MYB30 est également impliqué dans la régulation de la signalisation de l'ABA. Zheng et collaborateurs ont montré que les plantes n'exprimant plus MYB30 étaient hypersensibles à l'ABA durant la germination et la croissance des plantules, tandis que les plantes qui surexpriment MYB30 sont insensibles à cette phytohormone (Zheng *et al.*, 2012 ; Figure 1.21). La protéine MYB30 est cible de SUMOylation par la protéine SUMO-ligase SIZ1, ce qui mène à sa stabilisation et affecte l'activation transcriptionnelle par MYB30 de plusieurs gènes de réponse à l'ABA (Zheng *et al.*, 2012). Ces résultats soulignent l'importance de la SUMOylation de MYB30 pour la régulation de la signalisation de l'ABA pendant la germination.

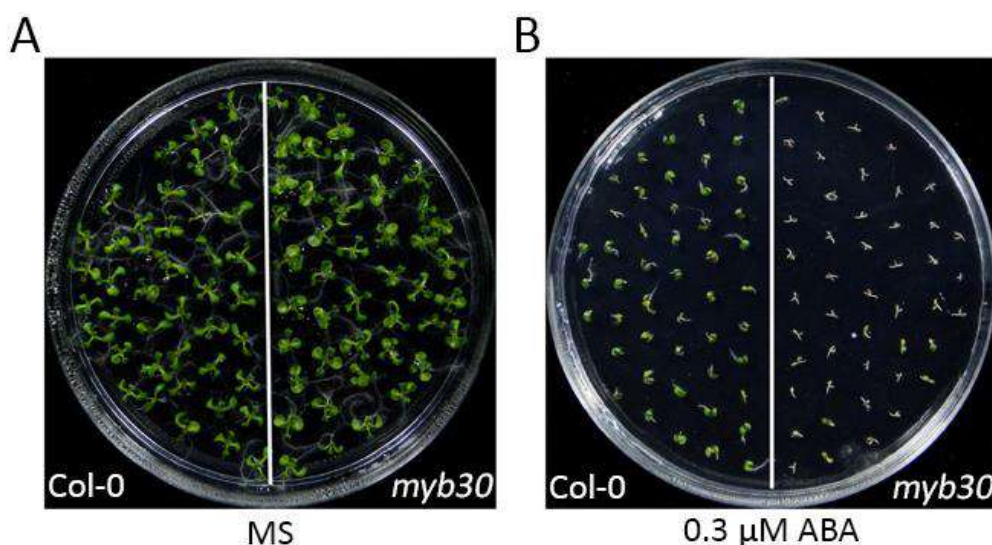


Figure 1.21. MYB30 est impliqué dans la réponse à l'ABA (d'après Zheng *et al.*, 2012)

Sensibilité à l'ABA de plantules sauvages Col-0 et mutantes *myb30*. Les photos ont été prises 8 jours après semis sur milieu MS sans (A) ou avec 0,3 µM d'ABA (B). La germination du mutant *myb30* est hypersensible à l'ABA.

D'autre part, la surexpression de MYB30 dans le phloème accélère la **floraison** des plantes d'*Arabidopsis*. Cette floraison précoce semble due à l'augmentation de l'expression du FT *FLOWERING LOCUS T* par MYB30 (Liu *et al.*, 2014). De façon intéressante, ce contrôle de la floraison par MYB30 semble indépendant des niveaux de SA (phytohormone capable d'accélérer la floraison) et de *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), un régulateur négatif de *FLOWERING LOCUS T* (Liu *et al.*, 2014). Ces données identifient donc MYB30 comme un régulateur de la floraison, et compte-tenu du rôle de MYB30 dans l'immunité, les auteurs de cette étude proposent MYB30 comme candidat pour contrôler le "cross-talk" entre perception des stress biotiques et temps de floraison.

MYB30 semble également participer à la tolérance à l'**hypoxie**. En effet, le mutant *myb30* montre une hypersensibilité à deux types de traitements hypoxiques, indiquant que MYB30 joue un rôle essentiel dans la réponse à ce stress. De plus, des plantes n'exprimant ni MYB30, ni *ACBP3* (gène codant pour une protéine de la famille des acyl-CoA-binding proteins, impliquées dans la perception des niveaux d'oxygène) montrent une

plus grande tolérance aux stress hypoxiques, d'une manière similaire aux plantes n'exprimant pas ACP3. De plus, ACP3 est capable de se lier aux VLCFA et d'altérer le contenu en lipides de la cellule. Ces résultats suggèrent donc qu'ACP3 agit en aval de MYB30 pour la signalisation à l'hypoxie, à travers le contrôle de la production des VLCFA (Xie *et al.*, 2015).

Très récemment, une étude a révélé que MYB30 régule les réponses aux **stress oxydatif et thermique** en contrôlant les taux de calcium cytosolique lors de ces stress. En effet, après traitement avec de l' H_2O_2 ou des températures élevées, les plantes n'exprimant plus MYB30 présentent des taux élevés de Ca^{2+} cytosolique, et une induction d'un certain nombre de gènes *ANNEXIN* (*ANN*), codant pour des protéines membranaires de liaison au Ca^{2+} qui modulent les signatures calciques cytosoliques. Il a notamment été démontré que la protéine MYB30 se fixe directement aux promoteurs des gènes *ANN1* et *ANN4* et réprime leurs expressions. Les taux anormaux de Ca^{2+} cytosoliques en réponse aux stress oxydatif et thermique chez les plantes *myb30* sont dépendants de l'activité des protéines ANN, démontrant que MYB30 régule les réponses à ces deux stress à travers la signalisation calcique, en partie dépendantes d'ANN1 et ANN4 (Liao *et al.*, 2017).

1.5.6. Régulation de MYB30

Les différentes études réalisées sur MYB30 au sein de notre équipe et par d'autres laboratoires ont mis en évidence une forte régulation de ce FT à travers des mécanismes de régulation transcriptionnelle, des interactions protéines-protéines et des modifications post-traductionnelles. Ce contrôle très précis de l'activité de MYB30 est cohérent avec son rôle de régulateur de la mort cellulaire, un processus énergétiquement coûteux pour la plante.

1.5.6.1. Régulation transcriptionnelle

Lors des premières études sur MYB30, une analyse RT-PCR a révélé qu'au cours du développement son transcrit n'était détectable que chez les jeunes plantules, mais ne l'était pas chez les plantes matures en absence d'inoculation (Daniel *et al.*, 1999). Puis, afin de mieux comprendre le rôle de MYB30 dans la défense, la génération des lignées d'*Arabidopsis* surexprimant MYB30 sous le contrôle d'un promoteur constitutif 35S a été entamée. Cependant, aucune lignée surexprimant fortement MYB30 n'a pu être obtenue, suggérant un mécanisme moléculaire régulant négativement son expression *in planta*. Une analyse plus approfondie révéla que l'expression de MYB30 était régulée négativement par un mécanisme de **silencing**, chez les jeunes plantules et chez les plantes adultes. À l'inverse, un mécanisme de *silencing* indirect pourrait être responsable de l'induction de l'expression de MYB30 après inoculation bactérienne, *via* la dégradation d'un régulateur négatif de son expression encore inconnu (Solène Froidure *et al.*, 2010)

1.5.6.2. Interacteurs protéiques

À la suite d'un crible double hybride chez la levure utilisant comme appât une version

de MYB30 déléetée de son domaine d'activation de la transcription (MYB30 Δ AD), dix-sept protéines ont été identifiées comme des interacteurs potentiels de MYB30.

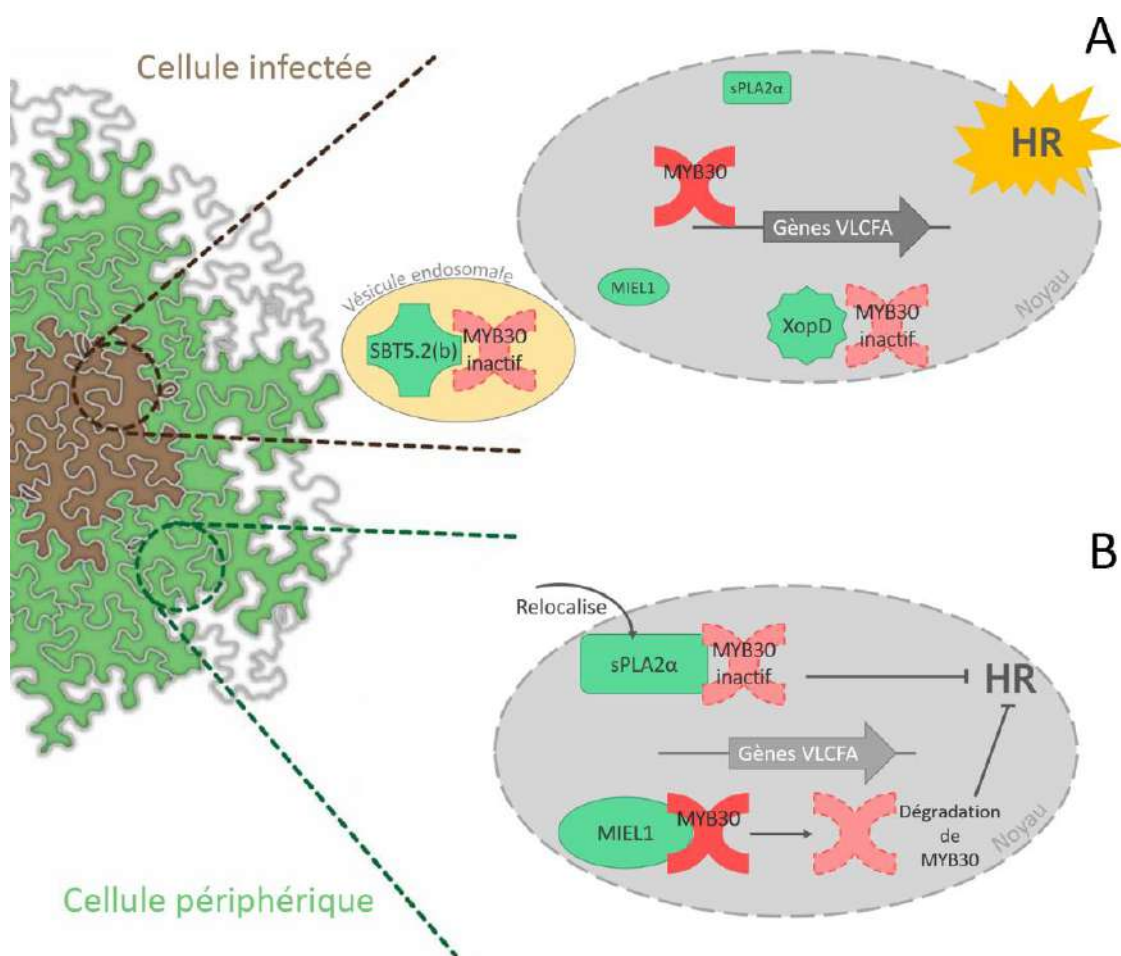


Figure 1.22. Modèle simplifié de la régulation simultanée de MYB30 par ses partenaires protéiques connus pendant la HR (adapté de Raffaele and Rivas, 2013)

L'action de MIEL1, SBT5.2(b), sPLA $_2$ - α et XopD sur le développement de la HR dépendant de MYB30 est présentée dans les cellules infectées (A) ou les cellules périphériques (B). Détails dans le texte.

Parmi elles **sPLA $_2$ - α** , une phospholipase A2 sécrétée, fut caractérisée plus en détail. En présence de MYB30, sPLA $_2$ - α est spécifiquement relocalisée depuis des vésicules cytoplasmiques vers le noyau de la cellule, où elle interagit avec le FT (S. Froidure *et al.*, 2010). Cette interaction protéique conduit à la répression de l'activité transcriptionnelle de MYB30 et à la régulation négative de la HR (Figure 1.22). De façon intéressante, l'adressage nucléaire de sPLA $_2$ - α , son interaction avec MYB30, la répression de l'activité de MYB30 et du développement de la HR semblent être indépendants de l'activité enzymatique de la phospholipase. Par conséquent, il a été proposé que sPLA $_2$ - α contrôle la réponse dépendante de MYB30 grâce à son interaction avec ce dernier, l'empêchant ainsi d'activer ses gènes cibles. De façon intéressante, l'expression de MYB30 est induite 4h après inoculation dans les cellules infectées mais pas dans les cellules entourant la zone d'infection, tandis que l'expression de sPLA $_2$ - α est la plus forte autour de 6h après

inoculation dans les cellules périphériques mais pas dans les cellules infectées (S. Froiture *et al.*, 2010). Cela suggère que sPLA₂- α pourrait contribuer à restreindre le développement de la HR à la zone infectée, empêchant ainsi la mort cellulaire de s'étendre à toute la feuille (Figure 1.22).

Récemment, une protéase atypique de la famille des subtilases, appelée **SBT5.2(b)** a été démontrée comme étant un régulateur négatif de l'activité de MYB30, indépendamment de son activité enzymatique (Serrano *et al.*, 2016). Le gène *SBT5.2* produit deux transcrits différents, codant pour une subtilase canonique sécrétée SBT5.2(a) et une protéine intracellulaire SBT5.2(b). Après inoculation bactérienne, l'expression de *SBT5.2(a)* est réprimée, tandis que celle de *SBT5.2(b)* est induite et suit un profil d'expression très similaire à celui de MYB30. SBT5.2(b) est localisée à la surface de vésicules endosomales où elle interagit avec MYB30 et l'y séquestre. Cette exclusion nucléaire de MYB30 conduit à la réduction de son activité transcriptionnelle et par conséquent à la suppression des défenses de la plante (Serrano *et al.*, 2016 ; Figure 1.22). Ce mode de régulation d'une subtilase était jusque-là inconnu et illustre la complexité des mécanismes de contrôle transcriptionnel impliqués dans les réactions immunitaires.

Des données générées par l'équipe montrent que l'expression de **MYB96** est induite après inoculation bactérienne. MYB96 interagit avec MYB30 dans le noyau et collabore avec ce dernier pour réguler positivement la HR (données non publiées). De manière intéressante, des données générées dans l'équipe d'accueil indiquent que MYB30 activerait l'expression de *MYB96* tandis ce dernier inhiberait l'activation transcriptionnelle de *MYB30*, suggérant une régulation complexe entre ces deux facteurs de transcription. Cette boucle de régulation, associée à l'interaction physique, et la possible compétition pour les mêmes gènes cibles témoignent d'une régulation précise et subtile du métabolisme des lipides par ces deux membres de la même sous-famille MYB (Figure 1.19).

Certains effecteurs d'agents pathogènes peuvent interagir avec des FT de la plante, afin de contourner les réponses immunitaires. C'est le cas de **XopD_{B100}**, une protéine de la souche B100 de la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), qui est adressée vers le noyau de la cellule végétale et cible MYB30. L'expression de XopD_{B100} mène à l'accumulation de MYB30 dans des vésicules nucléaires contenant XopD_{B100}, et l'interaction entre l'effecteur bactérien et le FT conduit à une réduction de l'expression des gènes liés à la production des VLCFA (gènes cibles de MYB30), et par conséquent à la suppression des réponses de défense de la plante lors d'une infection par XccB100 (Canonne *et al.*, 2011 ; Figure 1.22). Le domaine hélice-boucle-hélice (en anglais *helix-loop-helix*, ou HLH) de XopD_{B100} est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec MYB30 et la répression de son activité transcriptionnelle ainsi que la répression des défenses de la plante. De manière cohérente, la protéine XopD de la souche 8004 de Xcc (XopD₈₀₀₄), ne possédant pas de domaine HLH, est localisée de façon homogène dans le noyau de la cellule végétale, n'est pas capable d'interagir avec MYB30 et n'a aucun effet sur l'activité transcriptionnelle de MYB30 ou les réponses immunitaires contrôlées par ce dernier. Ensemble, ces données soulignent l'importance de MYB30 sur l'activité de la voie de production des VLCFA pour déclencher les réponses de défense de la plante.

1.5.6.3. Modifications post-traductionnelles (MPT)

De nombreuses MPT peuvent moduler l'activité des FT. MYB30 est sujet à plusieurs d'entre elles, qui seront décrites dans la prochaine section. L'ubiquitination est une MPT fréquente, impliquée dans de nombreux processus chez les plantes, et qui joue notamment un rôle crucial dans la régulation de la signalisation immunitaire. Dans la cascade d'ubiquitination, les E3-ligases sont les enzymes qui confèrent la spécificité de substrat et qui sont les mieux caractérisées. De nombreuses études montrent que les E3 Ub-ligases sont impliquées dans chacune des étapes de la réponse immunitaire, de la perception du pathogène à la reprogrammation transcriptionnelle, en passant par les voies de signalisation immunitaires. De plus, l'importance de leur rôle dans la défense est soulignée par le fait que certaines E3 Ub-ligases sont ciblées par des effecteurs microbiens. Un article de revue résumant ce rôle clé joué par les E3 Ub-ligases dans la résistance de la plante est présenté au début de cette section.



E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity

Vincent Duplan^{1,2} and Susana Rivas^{1,2} *

¹ INRA, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR441, Castanet-Tolosan, France

² CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR2594, Castanet-Tolosan, France

Edited by:

Pascal Genschik, Centre National de la Recherche Scientifique, France

Reviewed by:

Xun Xu, Beijing Genomics Institute, China

Li Yang, University of North Carolina Chapel Hill, USA

*Correspondence:

Susana Rivas, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR CNRS/INRA 2594/441, 24 Chemin de Borde Rouge-Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan cedex, France
e-mail: susana.rivas@toulouse.inra.fr

Reversible protein ubiquitination plays a crucial role during the regulation of plant immune signaling. E3 ubiquitin (Ub)-ligase enzymes, which are classified into different families depending on their structural and functional features, confer the specificity of substrate and are the best characterized components of the ubiquitination cascade. E3 Ub-ligases of different families have been shown to be involved in all steps of plant immune responses. Indeed, they have been involved in the first steps of pathogen perception, as they appear to modulate perception of pathogen-associated molecular patterns by pattern-recognition receptors at the plasma membrane and to regulate the accumulation of nucleotide-binding leucine-rich repeat-type intracellular immune receptors. In addition, E3 Ub-ligase proteins are also involved in the regulation of the signaling responses downstream of pathogen perception through targeting vesicle trafficking components or nuclear transcription factors, for instance. Finally, we also discuss the case of microbial effector proteins that are able to target host E3 Ub-ligases, or to act themselves as E3 Ub-ligases, in their attempt to subvert the host proteasome to promote disease.

Keywords: E3 ubiquitin-ligase, microbial effector, plant immunity, 26S proteasome, ubiquitination

INTRODUCTION

Reversible protein conjugation with ubiquitin (Ub), or ubiquitination, is a key regulatory mechanism that controls a variety of cellular processes in eukaryotic cells, including DNA repair, gene transcription, protein activation or receptor trafficking, although the best characterized function of Ub involves selective protein degradation through the 26S proteasome (Vierstra, 2009). Ub becomes covalently attached to lysine residues of intracellular targets via an ATP-dependent reaction cascade that involves the sequential action of three enzymes: E1 (Ub-activating), E2 (Ub-conjugating), and E3 (Ub-ligase). The importance of the Ub-related pathway is underlined by the finding that the *Arabidopsis* genome encodes more than 1600 genes (> 6% of the total genome) involved in Ub/26S proteasome system (UPS)-related functions. Most of these genes (> 1400) encode putative E3 Ub-ligases (Mazucotelli et al., 2006). E3 proteins are classified into four main subfamilies depending on their structural features and mechanism of action: HECT (Homologous to E6-associated protein C-Terminus), RING (Really Interesting New Gene), U-Box and CRL (Cullin-RING Ligases; Vierstra, 2009). HECT proteins form an Ub-E3 intermediate before transfer of Ub to the substrate (Downes et al., 2003). RING and U-box proteins are structurally related single polypeptides that, respectively, use zinc chelation and hydrogen bonds/salt bridges to transfer Ub from the Ub-E2 intermediate to the target (Stone et al., 2005; Yee and Goring, 2009). Ub-ligases containing a RING domain can act independently or as part of a multisubunit CRL complex such as the SCF (Skp1, Cullin, F-box)-type ligase. In this complex, substrate recognition is provided by the F-box protein, whereas the RING protein binds to the E2 (Hua and Vierstra, 2011). By contrast, some

RING-type Ub-ligases act independently and determine substrate specificity allowing the interaction between the E2 and the target protein by tethering them in close proximity (Vierstra, 2009).

Plants have developed a multi-layered defense system to ensure their survival in a microbe-rich environment. A first line of pathogen detection is activated after recognition of highly conserved PAMPs/MAMPs (pathogen-/microbe-associated molecular patterns) by specific plant PRRs (pattern-recognition receptors), leading to a form of basal resistance called PTI (PAMP-triggered immunity; Jones and Dangl, 2006). Thriving pathogens evolved to secrete virulence effectors that inactivate crucial PTI regulators thereby counteracting plant defenses. In turn, plants gained the ability to recognize these effectors through resistance (R) proteins, for the most part intracellular NB-LRR (nucleotide-binding-leucine-rich repeat) immune sensors, that lead to a more efficient form of resistance called ETI (effector-triggered immunity; Jones and Dangl, 2006). This specific resistance is frequently associated to development of the hypersensitive response (HR), a form of programmed cell death at the infection site that prevents pathogen spreading (Coll et al., 2011).

In plants, the UPS pathway, and more particularly E3 Ub-ligase proteins, have been shown to be involved in responses to a variety of stimuli (Vierstra, 2009; Robert-Seilaniantz et al., 2011). Since the finding that the SCF complex-interacting protein SGT1 (Suppressor of G2 allele of *skp1*) is an essential component of R gene-triggered disease resistance provided a first connection between the UPS and plant immune signaling (Azevedo et al., 2002), evidence that E3 Ub-ligase proteins act as regulators of plant immunity has increasingly accumulated (Trujillo and Shirasu, 2010; Marino et al., 2012). Indeed, modulation of the expression

of E3 Ub-ligase-encoding genes has been reported following elicitor treatment or inoculation with different pathogens. Moreover, misregulation of E3 Ub-ligase gene expression, using overexpressing, RNA interference (RNAi) and/or mutant lines, results in modulation of plant defense responses following pathogen inoculation [reviewed in (Marino et al., 2012)]. Therefore, it has become increasingly evident that plant E3 Ub-ligase proteins play important roles in the regulation of immune signaling, although the proteins targeted by Ub-ligases are only known in a limited number of cases, and our current knowledge of the involved molecular mechanisms is thus only partial. Here we review positive and negative roles played by E3 Ub-ligases during the regulation of various steps of plant immunity, from pathogen recognition to downstream signaling during both PTI and ETI responses. Due to space limitations, we focus on recent reports about E3 Ub-ligases for which a target protein has been identified during the plant response to bacterial or fungal pathogens, since these particular examples provide insight into the cellular processes involved in regulation of immune signaling. For an overview on UPS-related pathways in response to viral infection we refer the reader to a recent review (Alcaide-Loridan and Jupin, 2012). We also discuss the case of microbial effectors that, to promote disease, either target host E3 Ub-ligases or act as Ub-ligases inside plant cells (Figure 1).

PLANT E3 UB-LIGASES INVOLVED IN REGULATION OF PATHOGEN PERCEPTION

Several E3 ligase proteins have been identified as modulators of the first steps of pathogen recognition by plant cells, as they appear to be able to target both PRR and NB-LRR proteins in order to prevent unnecessary activation of defense signaling. In rice (*Oryza sativa*), the RING-type E3 Ub-ligase XB3 interacts with the receptor-like kinase (RLK) protein XA21, which confers resistance to bacterial blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo; Wang et al., 2006). XB3 has been shown to be required for XA21 accumulation and XA21-mediated resistance to Xoo, suggesting that it most likely targets a protein that modulates accumulation of XA21 (Wang et al., 2006). XA21 is able to phosphorylate XB3 but the molecular mechanism underlining activation of defense responses by XB3 remains to be elucidated. Overexpression of members of the XB3 family from rice, *Arabidopsis* and citrus in *Nicotiana benthamiana* induces cell death and this effect is dependent on XB3 catalytic activity, suggesting an evolutionarily conserved role for the XB3 protein family in regulating plant programmed cell death (Huang et al., 2013).

In *Arabidopsis*, the U-box E3 ligase Plant U-Box12 (PUB12) and PUB13 have been involved in attenuation of PTI responses triggered by perception of flagellin, or its active peptide derivative flg22, by the PRRs Flagellin Sensing2 (FLS2) and its co-receptor BAK1. In response to flg22, PUB12 and PUB13 form a BAK1-dependent complex with FLS2 and are able to polyubiquitinate FLS2, but not BAK1 (Lu et al., 2011). BAK1 phosphorylates PUB12 and PUB13 and this phosphorylation is enhanced by flg22 and by the FLS2/BAK1-associated kinase BIK1 (Lu et al., 2011). flg22-dependent signaling is enhanced in *pub12* or *pub13* mutant plants and, in agreement with PUB12 and PUB13 promoting FLS2 degradation, *pub12 pub13* double mutant plants displayed increased

resistance to bacterial infection. These data are consistent with the fact that FLS2 undergoes flg22-induced endocytosis and subsequent degradation (Robatzek et al., 2006; Gohre et al., 2008; Beck et al., 2012; Choi et al., 2013). However, whether stabilization of FLS2 in *pub12pub13* plants reflects FLS2 accumulation at the plasma membrane or within an endosomal compartment remains to be determined. A recent report showed that FLS2 degradation occurs in a flg22 time- and dose-dependent manner, which may play a significant role in turning over ligand-occupied FLS2, but the role of PUB12 and PUB13 in this process was not determined in this study (Smith et al., 2013).

Similar to PRR proteins, intracellular NB-LRR immune receptors are also targeted by E3 Ub-ligases, which appear to control R protein accumulation at multiple levels. First, in *Arabidopsis*, the F-box motif E3 Ub-ligase CPR1 interacts with and down-regulates the accumulation of the NB-LRR R proteins Suppressor of *npr1-1* Constitutive1 (SNC1) and Resistant to *P. syringae*2 (RPS2), resulting in attenuation of immune signaling (Cheng et al., 2011; Gou et al., 2012). Second, accumulation of SNC1 and RPS4, an additional NB-LRR immune receptor, are also negatively regulated by Suppressor of *rps4-RLD1* (SRFR1), a tetratricopeptide repeat protein (Kim et al., 2010; Li et al., 2010). Since (i) SNC1 levels increased in CPR1-overexpressing plants treated with the proteasome inhibitor MG132 (Gou et al., 2012); (ii) SRFR1 interacts with SGT1; and (iii) increased SNC1 and RPS4 accumulation was also observed in *sgt1* mutant plants (Li et al., 2010), stability of SNC1 and RPS4 is likely regulated by SRFR1 through SGT1 interaction with the SCF complex, revealing an additional molecular mechanism to prevent autoimmunity. Third, mutation of *MOS12* (*modifier of snc1-12*), that encodes an *Arabidopsis* Arg-rich protein homologous to human cyclin L, resulted in altered SNC1 and RPS4 splicing patterns and protein levels (Xu et al., 2012). Interestingly, MOS12 interacts with the nuclear U-Box E3 ligases MAC3A and MAC3B, which are required for full R protein-mediated resistance, suggesting that MOS12, MAC3A, and MAC3B contribute to the fine-tuning of R gene expression, in a process that appears to be critical for directing appropriate defense outputs (Monaghan et al., 2009; Xu et al., 2012). Finally, a recent report showed an intriguing link between cell cycle regulation and defense signaling (Bao et al., 2013). Omission of the Second Division (OSD1) and its homolog UV-B-Insensitive 4 (UVI4) are two negative regulators of the multisubunit E3 Ub-ligase APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) that regulates cell cycle progression in *Arabidopsis*. Overexpression of either OSD1 or UVI4 leads to downregulation of APC/C activity, overaccumulation of the APC/C degradation target CYCB1;1, upregulation of several R genes, including SNC1, and spontaneous cell death and enhanced disease resistance to virulent bacteria (Bao et al., 2013). These data provide further evidence of the intricate control exerted on immune receptor levels in order to regulate defense activation.

PLANT E3 UB-LIGASES INVOLVED IN REGULATION OF DEFENSE-RELATED SIGNALING

Pathogen perception by PRRs stimulates a cascade of signaling events including changes in ion fluxes across the plasma membrane, production of reactive oxygen species (ROS),

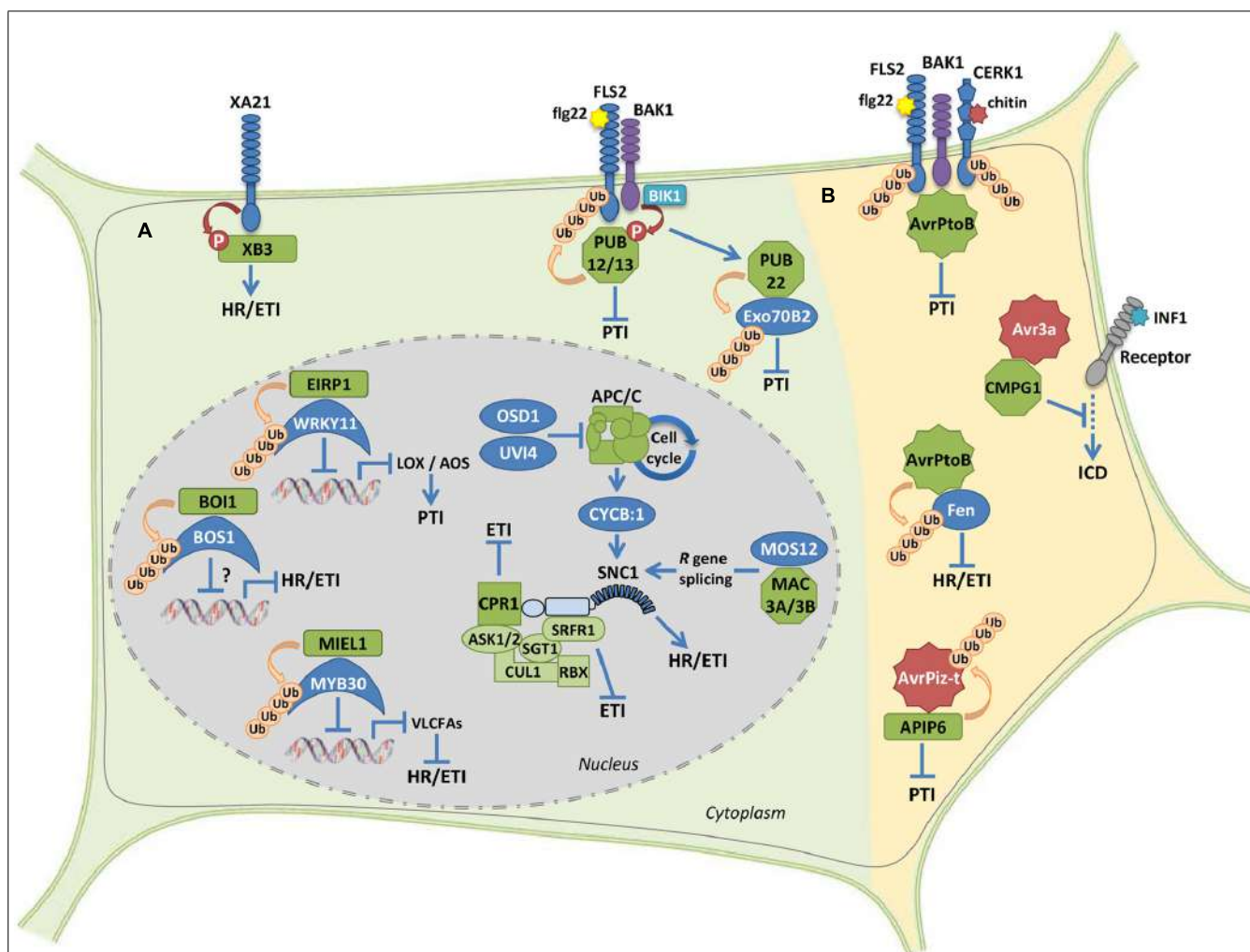


FIGURE 1 | Ub-ligase proteins during the regulation of plant immune signaling. (A) Examples of positive and negative regulatory roles on plant immunity by host E3 Ub-ligases. The RING-type protein XB3 is required for the accumulation of the receptor protein XA21 and promotes downstream HR and defense responses. U-box proteins PUB12 and PUB13 attenuate flg22-mediated PTI signaling. The U-box protein PUB22 targets the exocyst complex subunit Exo70B2, which leads to attenuation of PTI signaling. Accumulation of the intracellular immune receptor SNC1 appears to be controlled by the SCF complex through the interaction with both the F-box CPR1 and the SGT1-interacting protein SRFR1. Modulation of SNC1 levels by the multisubunit cell cycle-related E3 ligase APC/C or the U-box proteins MAC3A and MAC3B provide additional molecular mechanisms to control immunity. The interaction between the RING-type E3 Ub-ligase EIRP1, and the TF WRKY11 results in suppressed transcriptional activation of WRKY11 target genes AOS and LOX1, thereby enhancing PTI. The RING E3 ligase MIEL1 interacts with the MYB TF MYB30, which results in weakened

transcriptional activation of VLCFA-related genes and therefore suppressed HR and defense responses. The RING protein BOI1 interacts with and ubiquitinates the MYB TF BOS1 that is required for pathogen resistance. However, the effect of BOI1 on BOS1 accumulation and transcriptional activation remains unknown. **(B)** Microbial effector proteins acting as or interacting with E3 ligase proteins in the host. The bacterial effector AvrPtoB is able to suppress both PTI and ETI signaling through its interaction with FLS2/CERK1 PRRs and the cytoplasmic kinase Fen. The oomycete effector AVR3a suppresses INF1-induced cell death by interacting with and stabilizing the host U-box E3 ligase CMPG1. The fungal effector protein AvrPiz-t targets the RING E3 ligase APIP6, which in turn is able to ubiquitinate AvrPiz-t, resulting in suppressed PTI. RING-, F-box- and U-box-type E3 Ub-ligases are, respectively, represented by rectangles, squares, and octagons. All proteins displaying E3 ligase activity are represented in green. Effectors are represented by stars. See the text for details.

induction of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), modulation of host gene transcription and callose deposition at the plant cell wall. Amplitude and duration of these signaling responses must be tightly regulated to ensure an appropriate response. In addition to their role in internalization or degradation of receptors to attenuate downstream signaling, E3 Ub-ligase proteins also regulate the accumulation of plant components involved in defense-related signaling.

Similar to PUB12 and PUB13, PUB22 acts in concert with PUB23 and PUB24 to negatively regulate PTI responses in *Ara-bidopsis* (Trujillo et al., 2008). Following elicitation with various PAMPs, *pub22/pub23/pub24* triple mutants displayed enhanced early signaling responses, indicating that these three PUB proteins target components involved in defense signaling triggered by different PRRs (Trujillo et al., 2008). Indeed, the exocyst complex subunit Exo70B2 that is involved in vesicle tethering during exocytosis,

has been identified as a cellular target of PUB22 (Stegmann et al., 2012). PUB22 is stabilized in response to flg22 treatment (potentially by inhibition of its autocatalytic ubiquitination activity), leading to Exo70B2 ubiquitination and proteasomal degradation. Exo70B2 is required for both immediate (ROS production, MAPK activation) and later responses (PTI marker gene expression, root growth inhibition) triggered by several PAMPs, indicative of a role in signaling. Indeed, *exo70B2* mutant plants displayed enhanced susceptibility to pathogens (Stegmann et al., 2012). Together, these data suggest a mechanism by which Exo70B2 levels are regulated by quick changes in PUB22 turnover in response to PAMPs and identify a first component of vesicle trafficking required for regulation of plant PTI signaling. In view of these data, it has been proposed that Exo70B2 may contribute to recycling of plasma membrane proteins involved in PAMP-triggered signaling, including NADPH oxidases, ion channels or RLKs such as FLS2. Exo70B2 degradation by PUB22 would thus attenuate the recycling pathway redirecting positive signaling components into the vacuolar degradation pathway and downregulating signaling (Stegmann et al., 2012). As previously discussed, PUB12/PUB13-mediated ubiquitination of FLS2 is expected to modulate its intracellular trafficking (Lu et al., 2011). Since degradation of integral membrane proteins is mediated by the vacuole, signal attenuation is probably simultaneously regulated at various levels of vesicle trafficking.

In Chinese wild grapevine (*Vitis pseudoreticulata*), EIRP1 is an active E3 Ub-ligase whose RING domain is necessary for its activity and also mediates the interaction with the WRKY nuclear transcription factor (TF) VpWRKY11 (Yu et al., 2013). Similar to *EIRP1*, expression of *VpWRKY11* was rapidly induced following fungal infection. *VpWRKY11* activated the expression of AOS (*Allene Oxide Synthase*) and LOX2 (*Lipoxygenase2*), two JA-responsive genes that function as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis* (Journot-Catalino et al., 2006). Additionally, in agreement with the observation that co-expression with EIRP1 results in proteasomal degradation of VpWRKY11, AOS and LOX2 expression was, respectively, repressed and induced in EIRP1-overexpressing and RNAi plants. Moreover, EIRP1 overexpression in *Arabidopsis* conferred enhanced resistance to fungal and bacterial pathogens, which correlated with reduced expression of *WRKY11*, AOS, and LOX2 (Yu et al., 2013). Together, these data identify a RING-type Ub-ligase that plays a positive role in activation of resistance by targeting a TF that acts as a negative regulator of plant defenses.

In contrast, the *Arabidopsis* RING-type Ub-ligase MIEL1 acts as a negative regulator of plant resistance (Marino et al., 2013). Indeed, MIEL1 interacts with the MYB TF MYB30, which activates plant defense responses by up-regulating the expression of genes involved in the production of very long chain fatty acids (VLCFAs; Raffaele et al., 2008). The MYB30-MIEL1 nuclear interaction leads to MYB30 proteasomal degradation, reduced expression of VLCFA-related MYB30 target gene expression and, therefore, attenuation of plant immune responses (Marino et al., 2013). *MIEL1* expression is rapidly repressed in inoculated cells, suggesting that (i) in the absence of the pathogen, MIEL1 may negatively regulate plant defense activation through degradation of MYB30 and that (ii) after

pathogen inoculation, repression of *MIEL1* expression may release MYB30 negative regulation, triggering defense (Marino et al., 2013).

BOI1 is an additional nuclear RING-type Ub-ligase that interacts with and ubiquitinates the MYB TF BOS1, which confers resistance to several pathogens in *Arabidopsis* (Mengiste et al., 2003; Luo et al., 2010). This finding suggests that BOS1 may be a target of BOI1. However, no effect of BOI1 on BOS1 transcriptional activity has been reported and both *bos1* mutant and BOI1 RNAi *Arabidopsis* plants (in which the BOS1 protein is expected to accumulate) display enhanced susceptibility to fungal infection (Luo et al., 2010). Therefore, whether BOI1 is able to directly regulate BOS1 protein accumulation remains to be determined.

MANIPULATION OF HOST E3 UB-LIGASE PROTEINS BY MICROBIAL EFFECTORS

The important role played by E3 Ub-ligases during the establishment of plant immune responses to pathogen attack is highlighted by the discovery of microbial effector proteins that evolved the ability to interfere with these host UPS components to promote disease. For example, the AvrPiz-t effector from the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* is translocated into rice cells, where it is able to mediate suppression of PAMP-induced ROS production, inducing susceptibility to *M. oryzae* (Park et al., 2012). AvrPiz-t appears to inhibit the Ub-ligase activity of APIP6, a rice RING-type Ub-ligase that is also able to ubiquitinate AvrPiz-t *in vitro* (Park et al., 2012). Interestingly, AvrPiz-t and APIP6 are both degraded when transiently coexpressed in *N. benthamiana*. Since APIP6 positively regulates flg22-induced ROS generation, induction of defense-related gene expression, and rice resistance to *M. oryzae*, targeting of APIP6 by AvrPiz-t results in suppression of rice PTI responses (Park et al., 2012).

The effector AVR3a from the oomycete *Phytophthora infestans* prevents development of cell death induced by *P. infestans* elicitor INF1. The finding that AVR3a targets and stabilizes the U-box-type Ub-ligase CMPG1 revealed the molecular mechanism behind AVR3a negative regulation of ICD (INF1-triggered Cell Death; Bos et al., 2010). CMPG1 Ub-ligase activity is required for ICD as well as for cell death following elicitor perception at the plasma membrane (Gonzalez-Lamothe et al., 2006; Gilroy et al., 2011). Considering that AVR3a is essential for *P. infestans* virulence, stabilization of CMPG1 by AVR3a suggests that this effector is able to suppress ICD during the biotrophic phase of infection by modifying CMPG1 activity, impeding normal proteasomal degradation of both CMPG1 and its host targets (Bos et al., 2010).

In addition to microbial effectors that are able to target host E3 Ub-ligase proteins, examples of effectors that present E3 Ub-ligase-related domains have also been reported in a diversity of pathogenic microbes including bacteria, fungi, oomycetes, viruses and nematodes (Marino et al., 2012). The best characterized example of microbial E3 ligases is the AvrPtoB effector from *Pseudomonas syringae* that presents a C-terminal domain with remarkable structural homology with RING- and U-box-type Ub-ligases (Janjusevic et al., 2006). AvrPtoB is a modular effector able to suppress PTI signaling. Indeed, AvrPtoB N-terminal

domain is able to interact with the PRRs FLS2 and the chitin receptor CERK1, whereas its C-terminal Ub-ligase domain mediates PRR proteasomal degradation (Gohre et al., 2008; Gimenez-Ibanez et al., 2009). AvrPtoB is additionally able to target the co-receptor protein BAK1 (Shan et al., 2008) and to interfere with MAPK activation downstream of FLS2 (He et al., 2006), although independently of AvrPtoB Ub-ligase activity. Remarkably, AvrPtoB is also able to suppress ETI signaling. Indeed, AvrPtoB interacts with and mediates proteasomal degradation of Fen, a tomato protein kinase that activates plant immunity in response to *P. syringae* carrying Ub-ligase deficient forms of AvrPtoB, as well as cell death responses when overexpressed in *N. benthamiana* (Rosebrock et al., 2007).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Evidence of the involvement of the UPS pathway in the regulation of plant immunity is rapidly mounting. E3 Ub-ligase proteins are the best characterized UPS components playing a role in immune signaling at multiple levels. Nevertheless, based on induction of their expression following elicitation, E1 and E2 enzymes have also been suggested to contribute to plant disease resistance although the molecular mechanisms by which they regulate this process remain poorly characterized (Marino et al., 2012). Interestingly, a recent report provides a first example of the direct involvement of Ub-conjugating proteins in the regulation of plant immunity. In tomato, Fen-interacting protein 3 (Fni3) is a homolog of the *Arabidopsis* E2 enzyme Ubc13. Through interaction with its cofactor *S. lycopersicum* Uev (Suv), which is an inactive Ub-conjugating enzyme variant, Fni3 catalyzes Lys-63-linked ubiquitination, a non-proteolytic regulatory signal (Mural et al., 2013). Fni3 interacts with Fen but does not affect Fen stability. Fni3 Ub-conjugating activity and interaction with Fen are required for cell death triggered by Fen overexpression in *N. benthamiana* and by several R protein/effector pairs (Mural et al., 2013). Together these results suggest that, in addition to conventional Lys-48-linked ubiquitination that mainly serves as a signal for proteasomal degradation of substrate proteins, other ubiquitination forms are important regulators of plant immune signaling. Consistent with this idea, Lys-63-linked ubiquitination has also been shown to be a target of manipulation by plant pathogens, as the PthA effector from the bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is able to target Ubc13 and Uev in citrus (Domingues et al., 2010).

In conclusion, further characterization of additional UPS components as well as of the distinct fates of ubiquitination targets should contribute to dissecting the complex regulation of plant immune signaling by the UPS.

ACKNOWLEDGMENT

Our work is supported by the French Laboratory of Excellence project "TULIP" (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

REFERENCES

- Alcaide-Loridan, C., and Jupin, I. (2012). Ubiquitin and plant viruses, let's play together! *Plant Physiol.* 160, 72–82. doi: 10.1104/pp.112.201905
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* 295, 2073–2076. doi: 10.1126/science.1067554
- Bao, Z., Yang, H., and Hua, J. (2013). Perturbation of cell cycle regulation triggers plant immune response via activation of disease resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 2407–2412. doi: 10.1073/pnas.1217024110
- 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. doi: 10.1105/tpc.112.100263
- Bos, J. I., Armstrong, M. R., Gilroy, E. M., Boevink, P. C., Hein, I., Taylor, R. M., et al. (2010). *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 9909–9914. doi: 10.1073/pnas.0914408107
- Cheng, Y. T., Li, Y., Huang, S., Huang, Y., Dong, X., Zhang, Y., et al. (2011). Stability of plant immune-receptor resistance proteins is controlled by SKP1-CULLIN1-F-box (SCF)-mediated protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 14694–14699. doi: 10.1073/pnas.1105685108
- Choi, S. W., Tamaki, T., Ebine, K., Uemura, T., Ueda, T., and Nakano, A. (2013). RABA members act in distinct steps of subcellular trafficking of the Flagellin Sensing2 receptor. *Plant Cell* 25, 1174–1187. doi: 10.1105/tpc.112.108803
- Coll, N. S., Epple, P., and Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.* 18, 1247–1256. doi: 10.1038/cdd.2011.37
- Domingues, M. N., De Souza, T. A., Cernadas, R. A., de Oliveira, M. L., Docena, C., Farah, C. S., et al. (2010). The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. *Mol. Plant Pathol.* 11, 663–675. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00636.x
- Downes, B. P., Stupar, R. M., Gingerich, D. J., and Vierstra, R. D. (2003). The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in *Arabidopsis*: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant J.* 35, 729–742. doi: 10.1046/j.1365-3113.2003.01844.x
- Gilroy, E. M., Taylor, R. M., Hein, I., Boevink, P., Sadanandom, A., and Birch, P. R. (2011). CMPG1-dependent cell death follows perception of diverse pathogen elicitors at the host plasma membrane and is suppressed by *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a. *New Phytol.* 190, 653–666. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03643.x
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D. R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., and Rathjen, J. P. (2009). AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr. Biol.* 19, 423–429. doi: 10.1016/j.cub.2009.01.054
- Gohre, V., Spallek, T., Haweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., et al. (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr. Biol.* 18, 1824–1832. doi: 10.1016/j.cub.2008.10.063
- Gonzalez-Lamothe, R., Tsitsigiannis, D. I., Ludwig, A. A., Panicot, M., Shirasu, K., and Jones, J. D. (2006). The U-box protein CMPG1 is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato. *Plant Cell* 18, 1067–1083. doi: 10.1105/tpc.106.040998
- Gou, M., Shi, Z., Zhu, Y., Bao, Z., Wang, G., and Hua, J. (2012). The F-box protein CPR1/CPR30 negatively regulates R protein SNC1 accumulation. *Plant J.* 69, 411–420. doi: 10.1111/j.1365-3113.2011.04799.x
- He, P., Shan, L., Lin, N. C., Martin, G. B., Kemmerling, B., Nurnberger, T., et al. (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* 125, 563–575. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.047
- Hua, Z., and Vierstra, R. D. (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 299–334. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112256
- Huang, X., Liu, X., Chen, X., Snyder, A., and Song, W. Y. (2013). Members of the XB3 family from diverse plant species induce programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE* 8:e63868. doi: 10.1371/journal.pone.0063868
- Janjusevic, R., Abramovitch, R. B., Martin, G. B., and Stebbins, C. E. (2006). A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 311, 222–226. doi: 10.1126/science.1120131
- Jones, J. D., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi: 10.1038/nature05286
- Journot-Catalino, N., Somssich, I. E., Roby, D., and Kroj, T. (2006). The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18, 3289–3302. doi: 10.1105/tpc.106.044149

- Kim, S. H., Gao, F., Bhattacharjee, S., Adiasor, J. A., Nam, J. C., and Gassmann, W. (2010). The *Arabidopsis* resistance-like gene SNC1 is activated by mutations in SRRF1 and contributes to resistance to the bacterial effector AvrRps4. *PLoS Pathog.* 6:e1001172. doi: 10.1371/journal.ppat.1001172
- Li, Y., Li, S., Bi, D., Cheng, Y. T., Li, X., and Zhang, Y. (2010). SRRF1 negatively regulates plant NB-LRR resistance protein accumulation to prevent autoimmunity. *PLoS Pathog.* 6:e1001111. doi: 10.1371/journal.ppat.1001111
- Lu, D., Lin, W., Gao, X., Wu, S., Cheng, C., Avila, J., et al. (2011). Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science* 332, 1439–1442. doi: 10.1126/science.1204903
- Luo, H., Laluk, K., Lai, Z., Veronese, P., Song, F., and Mengiste, T. (2010). The *Arabidopsis* Botrytis Susceptible1 Interactor defines a subclass of RING E3 ligases that regulate pathogen and stress responses. *Plant Physiol.* 154, 1766–1782. doi: 10.1104/pp.110.163915
- Marino, D., Froidure, S., Canonne, J., Ben Khaled, S., Khafif, M., Pouzet, C., et al. (2013). *Arabidopsis* ubiquitin ligase MIEL1 mediates degradation of the transcription factor MYB30 weakening plant defence. *Nat. Commun.* 4, 1476. doi: 10.1038/ncomms2479
- Marino, D., Peeters, N., and Rivas, S. (2012). Ubiquitination during plant immune signaling. *Plant Physiol.* 160, 15–27. doi: 10.1104/pp.112.199281
- Mazzucotelli, E., Belloni, S., Marone, D., De Leonardi, A., Guerra, D., Di Fonzo, N., et al. (2006). The E3 ubiquitin ligase gene family in plants: regulation by degradation. *Curr. Genomics* 7, 509–522. doi: 10.2174/138920206779315728
- Mengiste, T., Chen, X., Salmeron, J., and Dietrich, R. (2003). The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 2551–2565. doi: 10.1105/tpc.014167
- Monaghan, J., Xu, F., Gao, M., Zhao, Q., Palma, K., Long, C., et al. (2009). Two Prp19-like U-box proteins in the MOS4-associated complex play redundant roles in plant innate immunity. *PLoS Pathog.* 5:e1000526. doi: 10.1371/journal.ppat.1000526
- Mural, R. V., Liu, Y., Rosebrock, T. R., Brady, J. J., Hamera, S., Connor, R. A., et al. (2013). The tomato Fni3 lysine-63-specific ubiquitin-conjugating enzyme and suv ubiquitin e2 variant positively regulate plant immunity. *Plant Cell* 25, 3615–3631. doi: 10.1105/tpc.113.117093
- Park, C. H., Chen, S., Shirsekar, G., Zhou, B., Khang, C. H., Songkumarn, P., et al. (2012). The *Magnaporthe oryzae* Effector AvrPiz-t Targets the RING E3 Ubiquitin Ligase APIP6 to Suppress Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Rice. *Plant Cell* 24, 4748–4762. doi: 10.1105/tpc.112.105429
- Raffaële, S., Vailleau, F., Leger, A., Joubes, J., Miersch, O., Huard, C., et al. (2008). A MYB transcription factor regulates Very-Long-Chain Fatty Acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 752–767. doi: 10.1105/tpc.107.054858
- Robatzek, S., Chinchilla, D., and Boller, T. (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20, 537–542. doi: 10.1101/gad.366506
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 317–343. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114447
- Rosebrock, T. R., Zeng, L., Brady, J. J., Abramovitch, R. B., Xiao, F., and Martin, G. B. (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* 448, 370–374. doi: 10.1038/nature05966
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S. C., Nurnberger, T., et al. (2008). Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe* 4, 17–27. doi: 10.1016/j.chom.2008.05.017
- Smith, J. M., Salamango, D. J., Leslie, M. E., Collins, C. A., and Heese, A. (2013). Sensitivity to flg22 is modulated by ligand-induced degradation and de novo synthesis of the endogenous flagellin-receptor FLS2. *Plant Physiol.* 164, 440–454. doi: 10.1104/pp.113.229179
- Stegmann, M., Anderson, R. G., Ichimura, K., Pecenkova, T., Reuter, P., Zarsky, V., et al. (2012). The ubiquitin ligase PUB22 targets a subunit of the exocyst complex required for PAMP-triggered responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 4703–4716. doi: 10.1105/tpc.112.104463
- Stone, S. L., Hauksdottir, H., Troy, A., Herschleb, J., Kraft, E., and Callis, J. (2005). Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137, 13–30. doi: 10.1104/pp.104.052423
- Trujillo, M., Ichimura, K., Casais, C., and Shirasu, K. (2008). Negative regulation of PAMP-triggered immunity by an E3 ubiquitin ligase triplet in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 18, 1396–1401. doi: 10.1016/j.cub.2008.07.085
- Trujillo, M., and Shirasu, K. (2010). Ubiquitination in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 402–408. doi: 10.1016/j.pbi.2010.04.002
- Vierstra, R. D. (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 385–397. doi: 10.1038/nrm2688
- Wang, Y. S., Pi, L. Y., Chen, X., Chakrabarty, P. K., Jiang, J., De Leon, A. L., et al. (2006). Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. *Plant Cell* 18, 3635–3646. doi: 10.1105/tpc.106.046730
- Xu, F., Xu, S., Wiermer, M., Zhang, Y., and Li, X. (2012). The cyclin L homolog MOS12 and the MOS4-associated complex are required for proper splicing of plant resistance genes. *Plant J.* 70, 916–928. doi: 10.1111/j.1365-3113.2012.04906.x
- Yee, D., and Goring, D. R. (2009). The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *J. Exp. Bot.* 60, 1109–1121. doi: 10.1093/jxb/ern369
- Yu, Y., Xu, W., Wang, J., Wang, L., Yao, W., Yang, Y., et al. (2013). The Chinese wild grapevine (*Vitis pseudoreticulata*) E3 ubiquitin ligase Erysiphe necator-induced RING finger protein 1 (EIRP1) activates plant defense responses by inducing proteolysis of the VpWRKY11 transcription factor. *New Phytol.* 200, 834–846. doi: 10.1111/nph.12418

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.

Received: 13 December 2013; paper pending published: 14 January 2014; accepted: 28 January 2014; published online: 13 February 2014.

Citation: Duplan V and Rivas S (2014) E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. *Front. Plant Sci.* 5:42. doi: 10.3389/fpls.2014.00042

This article was submitted to Plant Genetics and Genomics, a section of the journal *Frontiers in Plant Science*.

Copyright © 2014 Duplan and Rivas. 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.

- Ubiquitination

Comme indiqué dans l'article de revue présenté précédemment, l'E3 Ubiquitine Ligase **MIEL1** (MYB30-INTERACTING E3 LIGASE1) est un autre régulateur négatif de l'activité de MYB30 qui fut caractérisé dans notre équipe. MIEL1 interagit avec MYB30 dans la levure, *in vitro* et *in planta* (Marino *et al.*, 2013). MIEL1 est capable d'ubiquitiner MYB30 *in vitro* et *in vivo*. Chez *Arabidopsis* MIEL1 et MYB30 interagissent dans le noyau, ce qui entraîne la dégradation de MYB30 par le protéasome, une expression réduite des gènes cibles de MYB30, et par conséquent une atténuation des réponses immunitaires (Marino *et al.*, 2013 ; [Figure 1.22](#)). L'expression de *MIEL1* est rapidement réprimée après inoculation dans les cellules infectées, suggérant que (i) en l'absence de pathogène, MIEL1 pourrait réguler négativement l'activation des défenses de la plante à travers la dégradation de MYB30 et que (ii) après inoculation, la répression de l'expression de *MIEL1* pourrait libérer MYB30 de sa régulation négative, augmentant alors l'intensité de la HR et limitant la propagation de la bactérie. De plus, cette dégradation de MYB30 par l'action de MIEL1 pourrait contribuer à la restriction spatiale de la HR aux cellules inoculées puisque l'expression de *MIEL1* reste constante dans les cellules périphériques de la zone d'infection (Marino *et al.*, 2013 ; [Figure 1.22](#)).

De manière intéressante, une étude récente a montré que MIEL1 est également capable d'interagir et de dégrader MYB96. Plus précisément dans la graine, en présence d'ABA, la stabilité de l'E3 ligase est réduite, MYB96 n'est donc plus réprimé et peut alors activer les voies de signalisation à l'ABA conduisant à la régulation négative de la germination (Lee and Seo, 2016).

MIEL1 fait partie d'une sous-famille multigénique de quatre membres (Stone *et al.*, 2005). Des données générées au sein de l'équipe d'accueil montrent que les autres membres de cette sous-famille (appelés **MIEL2**, **MIEL3** et **MIEL4**) sont également capables d'interagir avec MYB30 (données non publiées). Les mutants simples *miel2*, *miel3* ou *miel4* sont plus résistants aux pathogènes et présentent une HR intensifiée. Par ailleurs, chez ces lignées, l'expression de certains gènes cibles de MYB30 est accentuée (données non publiées). Ces données suggèrent qu'à l'instar de MIEL1, les autres protéines MIEL semblent réguler négativement les réponses de défense contrôlées par MYB30. Cependant, certains points restent à démontrer comme l'ubiquitination de MYB30 par MIEL2-4 et la dégradation par le protéasome suite à ces éventuelles MPT, ou encore définir le degré de redondance entre ces quatre E3 ligases pour le contrôle de MYB30.

- SUMOylation

Comme détaillé plus haut, la modification post-traductionnelle de MYB30 par SUMOylation a également été reportée (voir section 1.5.5 "Rôles de MYB30 dans d'autres processus"). Cette MPT a d'abord été démontrée par reconstitution de la cascade de SUMOylation chez *E. coli*, en utilisant MYB30 comme substrat, et montra que la lysine K283 était

le site de SUMOylation principal (Okada *et al.*, 2009). La SUMOylation de MYB30 en K283 par l'E3 SUMO ligase **SIZ1** fut ensuite confirmée dans les protoplastes d'*Arabidopsis* et il fut prouvé que cette MPT est requise pour le fonctionnement de MYB30 en réponse à l'ABA (Zheng *et al.*, 2012). Cependant, le rôle de cette SUMOylation sur les réponses de défense contrôlées par MYB30 reste à étudier.

- **S-nitrosylation**

Durant la HR, les cellules produisent de l'acide nitrique (**NO**). L'effet du NO sur l'activité de MYB30 a été étudié, et les travaux menés ont révélé que le domaine de liaison à l'ADN de MYB30 était S-nitrosylé *in vitro*, et que cette MPT conduisait à l'inhibition de sa capacité de liaison à l'ADN (Tavares *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que le NO pourrait également contribuer à la régulation négative de l'activité de MYB30 lors du processus de HR.

- **Phosphorylation**

Enfin, la région C-terminale de MYB30 est particulièrement riche en sites de **phosphorylation**. Des données générées au sein de l'équipe ont suggéré que MYB30 est phosphorylé *in vivo* (Rivas S., données non publiées), mais l'influence d'éventuelles phosphorylations sur les rôles biologiques de MYB30 reste encore à déterminer.

L'ensemble de ces données suggère que les différentes combinaisons d'interactions ou de modifications post-traductionnelles de MYB30 pourraient agir comme un code-barre, qui serait important pour la régulation de ce facteur de transcription impliqué dans de nombreux processus biologiques (Benayoun and Veitia, 2009).

1.6. Contexte scientifique du projet de thèse

1.6.1. Un rôle pour GSO1 et GSO2 dans l'immunité?

Les deux récepteurs kinases GSO1 et GSO2 ont récemment été identifiés comme faisant partie d'une voie génétique qui contrôle la formation d'une cuticule embryonnaire intégrée durant le développement de la graine (voir section 1.2.2.2 "La voie ECF"). De manière intéressante, les plus proches homologues de GSO1 et GSO2 sont PEPR1 et PEPR1, deux RLK impliqués dans les réponses immunitaires (Krol *et al.*, 2010, p.201). D'autre part, les défauts de formation de l'embryon et de la graine des mutants *gso1 gso2* sont fortement similaires à ceux observés chez le mutant *mpk6* (López-Bucio *et al.*, 2014). MPK6 est un régulateur connu des défenses de la plante impliqué dans les événements de signalisation en aval de la reconnaissance de l'agent pathogène par la cellule végétale (voir sections 1.4.1 et 1.4.2). Ces données suggèrent fortement qu'au-delà de leur rôle dans le renforcement de la cuticule embryonnaire, **GSO1 et GSO2 pourraient être impliqués dans la mise en place des réactions de défense de la plante.**

1.6.2. Un rôle pour MYB30 dans la formation de la cuticule embryonnaire?

Des données disponibles en ligne montrent que lors du cycle de vie de la plante, et en

absence de pathogène, *MYB30* est spécifiquement exprimé lors des premières étapes du développement de la graine (Figure 1.23A). En accord avec ces données transcriptomiques montrant l'expression de *MYB30* dans la graine, Zheng et collaborateurs ont montré un rôle de *MYB30* dans la germination de la graine dépendante de l'ABA ainsi qu'au cours du développement des jeunes plantules (Zheng *et al.*, 2012).

L'expression de *MYB30* au cours de l'embryogenèse a été confirmée lors d'expériences préliminaires réalisées par C. Balagué et M.C. Auriac au sein de l'équipe de Dominique Roby (LIPM, Toulouse). En effet, des lignées d'*Arabidopsis* transformées avec le gène rapporteur β -glucuronidase (*GUS*) fusionné au promoteur de *MYB30* dans le fond génétique *Ws-4*, montrent un signal *GUS* dans l'embryon en développement (Figure 1.23B).

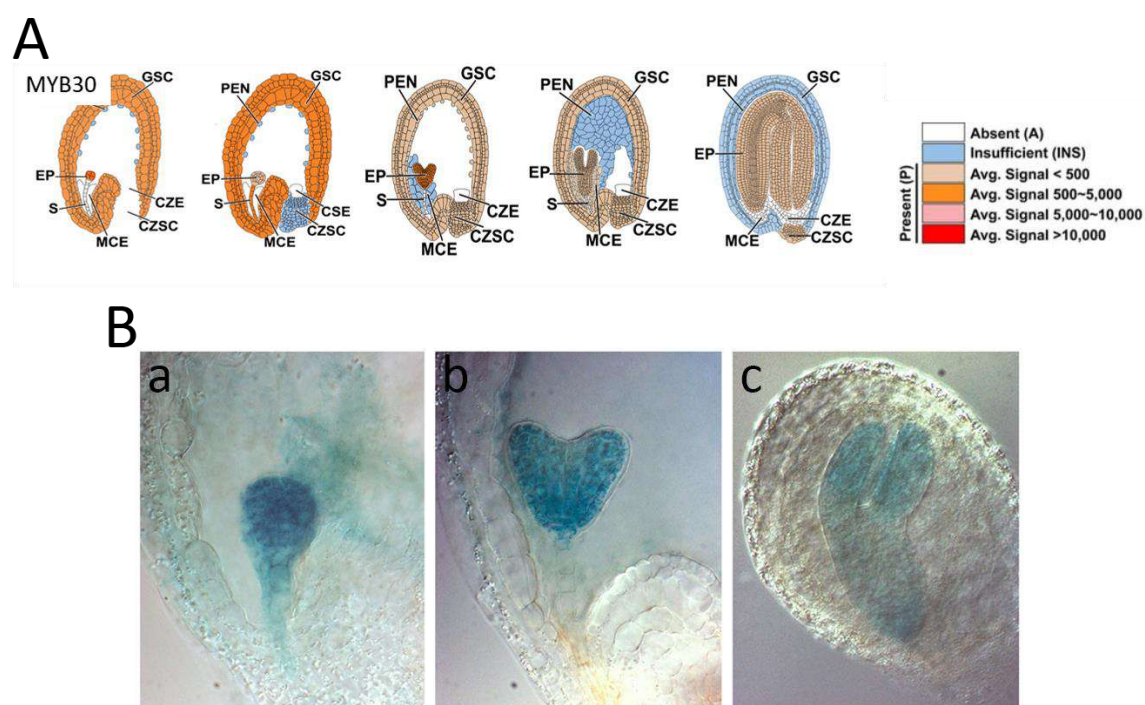


Figure 1.23. *MYB30* est exprimé au cours de l'embryogenèse

(A) Expression de *MYB30* dans les différents tissus et au cours du développement de la graine d'après seedgenenetwork.net (Belmonte *et al.*, 2013). Les couleurs correspondent à l'intensité de signal moyen des réplicats biologiques, comme indiqué à droite. CZE : vésicule de l'albumen chalazal ; CZSC : chalaze ; EP : Embryon ; GSC : Téguments ; MCE : albumen mycropytaire ; PEN : albumen périphérique ; S : suspenseur (B) Coloration *GUS* de plantes d'*Arabidopsis* transgéniques *MYB30p:GUS* dans le fond génétique *Ws-4*. Le profil d'expression *GUS* a été déterminé à différents stades de développement. a: stade globulaire; b: stade cœur; c: stade cotylédons courbés. (C. Balagué, M.C. Auriac)

MYB30 serait donc exprimé dans la graine aux mêmes stades que *GSO1* et *GSO2*, impliqués dans la formation de la cuticule embryonnaire. D'autre part, *MYB30* est capable d'induire l'expression de gènes du complexe FAE et joue un rôle dans la production des VLCFA (précurseurs des sphingolipides et des composés cuticulaires) et de certains composés des cires épicuticulaires dans le contexte de l'attaque par un agent pathogène chez la plante adulte (voir section 1.5.4 "Rôle de *MYB30* dans l'immunité"). De façon intéressante, la majorité de ces gènes cibles de *MYB30* sont également exprimés pendant l'embryogenèse et certains d'entre eux montrent un profil d'expression très proche à celui

de MYB30 (Figure 1.24). Sur la base de ces données, nous avons formulé l'hypothèse d'un nouveau rôle pour MYB30 dans la formation de la cuticule embryonnaire, plaçant ce FT à l'interface entre le développement et la défense de la plante.



Figure 1.24. GSO1, GSO2 et de nombreux gènes cibles de MYB30 dans la plante adulte impliqués dans la biosynthèse de la cuticule sont exprimés au cours de l'embryogenèse

Profils d'expression pendant le développement de la graine des gènes *GSO1*, *GSO2* et des gènes cibles de MYB30 identifiés dans Raffaele *et al.*, 2008. Données micro-array d'après seedgenenetwork.net (Belmonte *et al.*, 2013). CZE : vésicule de l'albumen chalazal ; CZSC : chalaze ; EP : Embryon ; GSC : Téguments ; MCE : albumen mycropytaire ; PEN : albumen périphérique ; S : suspenseur.

1.7. Objectifs du projet de thèse

Sur la base des données présentées précédemment, mon projet de thèse a visé à explorer la relation encore mal connue entre des voies de signalisation impliquées dans le développement et les réponses immunitaires de la plante. Pour cela, le projet a été divisé en deux axes principaux:

Dans le **premier axe**, l'objectif était tout d'abord de déterminer si certains composants de la voie ECF (GSO1, GSO2 et ALE1) jouaient également un rôle dans les réponses immunitaires chez *Arabidopsis*.

Le **second axe** visait à caractériser le rôle de MYB30 dans la formation de la cuticule embryonnaire, et à déterminer s'il y a une relation entre MYB30, GSO1 et GSO2 dans ce processus développemental.

Chapitre 2

Une voie de signalisation
inter-compartimentale
reliée à la défense régule
l'intégrité de la cuticule
embryonnaire chez
Arabidopsis

Ce premier chapitre de la thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de recherche de Gwyneth Ingram (RDP, Lyon). Dans ce travail récemment soumis pour publication, les aspects concernant le développement de la graine ont été réalisés à Lyon tandis que le but de notre équipe a été d'explorer le rôle jusqu'à présent inconnu de GSO1 et GSO2 dans l'immunité. Ces travaux ont permis à l'équipe lyonnaise de décrire pour la première fois le processus de déposition de la cuticule de novo, et de montrer que ce processus nécessite une voie de signalisation impliquant la subtilase ALE1, les RLK GSO1 et GSO2, ainsi que la protéine kinase MPK6, connue pour son rôle dans la défense. De plus, cette voie régule l'expression de gènes de défense chez la graine, et en accord avec cela, le travail réalisé dans notre équipe a montré que GSO1 et GSO2 sont des régulateurs positifs des réponses immunitaires dans la plante adulte. En conclusion, nous proposons qu'une voie de signalisation de défense ait pu être recrutée dans la graine afin de servir à la formation d'une cuticule embryonnaire intacte.

FOR PEER REVIEW - CONFIDENTIAL

A defence-related inter-compartmental signalling pathway regulates embryonic cuticle integrity in Arabidopsis

Tracking no: 31-07-2017-RA-eLife-30908

Gwyneth Ingram (Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA), Audrey Creff (Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA), Lysiane Brocard (CNRS/ University of Bordeaux), Céline Vicedo (Université de Toulouse, INRA, CNRS), Vincent Duplan (Université de Toulouse, INRA, CNRS), Jérôme Joubès (CNRS/ University of Bordeaux), Ludvine Taconnat (Université Paris Saclay), Nicolas Doll (Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA), Stephanie Pascal (CNRS/ University of Bordeaux), Roberta Galletti (Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA), Steven Moussu (Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA), Susana Rivas (Université de Toulouse, INRA, CNRS), and Frederic Domergue (CNRS/ University of Bordeaux)

Abstract:

The embryonic cuticle is necessary for normal seed development and seedling establishment in Arabidopsis. Although mutants with defective embryonic cuticles have been identified, neither the deposition of cuticle material, nor its regulation, has been described during embryogenesis. Here we show that cuticle deposition initiates de novo in patches on globular embryos, and that patch coalescence to form a continuous cuticle requires inter-compartmental signalling involving the endosperm-specific subtilisin protease ALE1, the receptor kinases GSO1 and GSO2 and the defence-related MPK6 protein. Transcriptome analysis shows that this pathway regulates defence-related gene expression in seeds. Consistent with these findings we show that GSO1 and GSO2 play an unsuspected role in plant defence against bacterial pathogens. We propose that a defence-related signalling pathway has been hijacked in Arabidopsis seeds through the recruitment of endosperm-specific components. This pathway ensures the formation of an intact cuticle around the developing embryo via an "auto-immune" type interaction.

Impact statement: A defence related signalling pathway has been hijacked to mediate cross-talk between the Arabidopsis endosperm and embryo that is required to ensure the apoplastic separation of these two seed compartments by an intact embryonic cuticle.

Competing interests: No competing interests declared

Author contributions:

Gwyneth Ingram: Conceptualization; Formal analysis; Supervision; Funding acquisition; Methodology; Writing—original draft; Project administration; Writing—review and editing Audrey Creff: Data curation; Formal analysis; Validation; Investigation; Visualization; Methodology Lysiane Brocard: Investigation; Visualization; Methodology Céline Vicedo: Validation; Methodology Vincent Duplan: Formal analysis; Investigation; Methodology Jérôme Joubès: Formal analysis; Validation; Investigation; Methodology Ludvine Taconnat: Data curation; Formal analysis; Investigation Nicolas Doll: Formal analysis; Investigation; Visualization; Methodology Stephanie Pascal: Investigation; Methodology Roberta Galletti: Investigation Steven Moussu: Investigation Susana Rivas: Formal analysis; Supervision Frederic Domergue: Formal analysis; Supervision; Investigation; Methodology

Funding:

Agence Nationale de la Recherche (ANR): Gwyneth Ingram, ANR-13-BSV2-0002; H2020 | H2020 Priority Excellent Science | H2020 European Research Council (ERC): Roberta Galletti, 307387 The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Datasets:

Datasets Generated: Reporting Standards: N/A

Ethics:

Human Subjects: No Animal Subjects: No

Author Affiliation:

Gwyneth Ingram (Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA, France) Audrey Creff (Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA, France) Lysiane

Brocard(Plant Imaging Platform of Bordeaux Imaging Center, UMS 3420,CNRS/ University of Bordeaux,France) Céline Vicedo(LIPM,Université de Toulouse, INRA, CNRS,France) Vincent Duplan(LIPM,Université de Toulouse, INRA, CNRS,France) Jérôme Joubès(Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR5200,CNRS/ University of Bordeaux,France) Ludivine Taconnat(IPS2,Université Paris Saclay,France) Nicolas Doll(Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes,Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA,France) Stephanie Pasca(Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR5200,CNRS/ University of Bordeaux,France) Roberta Galetti(Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes,Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA,France) Steven Moussu(Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes,Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA,France) Susana Rivas(LIPM,Université de Toulouse, INRA, CNRS,France) Frederic Domergue(Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR5200,CNRS/ University of Bordeaux,France)

Dual-use research: No

Permissions: Have you reproduced or modified any part of an article that has been previously published or submitted to another journal? No

A defence-related inter-compartmental signalling pathway regulates embryonic cuticle integrity in Arabidopsis

**Audrey Creff¹, Lysiane Brocard², Vincent Duplan³, Jérôme Joubès^{4,5}, Céline Vicedo³,
Ludivine Taconnat⁶, Nicolas Doll¹, Stephanie Pascal^{4,5}, Roberta Galletti¹, Steven
Moussu¹, Susana Rivas^{3a}, Frédéric Domergue^{4,5a}, and Gwyneth Ingram^{1*}**

¹ Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, Université de Lyon, CNRS (UMR 5667), INRA (UMR 0879), UCB Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, F-69342 Lyon, France

² CNRS/ University of Bordeaux, Plant Imaging Platform of Bordeaux Imaging Center, UMS 3420, F-33000 Bordeaux, France

³ LIPM, Université de Toulouse, INRA, CNRS, Castanet-Tolosan, France .

⁴ Université de Bordeaux, Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR5200, F-33000 Bordeaux, France.

⁵ CNRS, Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR5200, F-33000 Bordeaux, France.

⁶ Institut of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), UMR 9213/UMR1403, CNRS, INRA, Université Paris-Sud, Université d'Evry, Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Bâtiment 630, 91405 Orsay, France

* Author for correspondence (Gwyneth.Ingram@ens-lyon.fr)

^a Authors contributed equally to the manuscript

SUMMARY

The embryonic cuticle is necessary for normal seed development and seedling establishment in *Arabidopsis*. Although mutants with defective embryonic cuticles have been identified, neither the deposition of cuticle material, nor its regulation, has been described during embryogenesis. Here we show that cuticle deposition initiates *de novo* in patches on globular embryos, and that successful patch coalescence to form a continuous cuticle requires inter-compartmental signalling involving the endosperm-specific subtilisin protease ALE1, the receptor kinases GSO1 and GSO2 and the defence-related MPK6 protein. Transcriptome analysis shows that this pathway regulates defence-related gene expression in seeds. Consistent with these findings we show that GSO1 and GSO2 play a hitherto unsuspected role in plant defence against bacterial pathogens. We propose that a defence-related signalling pathway has been hijacked in some angiosperm seeds through the recruitment of endosperm-specific components. This pathway ensures the formation of an intact and functional cuticle around the developing embryo *via* an “auto-immune” type interaction.

INTRODUCTION

The *Arabidopsis* seed is a complex structure composed of three genetically distinct compartments, the maternally-derived seed coat, the embryo, and the endosperm. After fertilization the expansion of the endosperm drives the growth of the seed. However, during later developmental stages the endosperm breaks down, leaving space for the growing embryo. By the end of seed development, only a single endosperm cell layer envelops the embryonic tissues (reviewed in [1]).

The endosperm is an angiosperm innovation, thought to have arisen through the sexualisation of the central cell of the female gametophyte [2]. The ancestors of angiosperms

probably had seeds more similar to those of gymnosperms, in which tissues of the female gametophyte proliferate independently of egg cell fertilization to produce a nutrient rich storage tissue. However, the endosperm plays not only a nutritional role, but also a role in regulating embryo development. For example, the peptide CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED8 (CLE8) may act non-cell autonomously to regulate early Arabidopsis embryogenesis [3]. Recently, maternally-expressed peptides present in the central cell pre-fertilization, and subsequently in the early EMBRYO SURROUNDING REGION (ESR), were shown to regulate Arabidopsis suspensor development. Genetic analysis suggests that this regulation could be mediated by a pathway involving the Receptor-Like Cytoplasmic Kinase SHORT SUSPENSOR [4, 5], although the receptor involved remains unidentified.

In previous work we showed that the ESR-specific subtilisin protease Abnormal LEaf-shape1 (ALE1) acts in the same genetic pathway as two embryonically-expressed receptor kinases, GASSHO1 [(GSO1) also known as SCHENGEN3 [6]] and GASSHO2 (GSO2), to control the formation of the embryonic cuticle in developing seeds [7-10]. Our results indicate that a seed specific inter-tissue signalling event is necessary for the formation of a functional embryonic cuticle [7]. The results of genetic studies have led us to speculate that the role of this pathway is to ensure the robust elimination of apoplastic continuity between the developing embryo and the surrounding endosperm thus gating molecular movement between the two compartments [11, 12].

The cuticle is the outermost layer of the aerial parts of the plant. It is a highly complex structure mainly composed of a lipid polymer (cutin) and waxes, either associated with the polymer (intracuticular waxes) or deposited on the top of it (epicuticular waxes) (recently reviewed in [13, 14]). Cutin and waxes are composed of complex mixtures of hydroxylated and

very long-chain fatty acid derivatives, respectively. Cuticle structure and composition are highly regulated not only at the tissue level, but also in response to environmental stimuli such as drought, radiation and pollution [13, 14]. In addition, several reports have highlighted the important role played by the cuticle in biotic interactions, and particularly in protecting plants from attack by bacterial pathogens (reviewed in [13, 15, 16]).

In *Arabidopsis* although little, if any, evidence exists for the presence of cutin-like substances in the wall between the mature egg cell and the central cell, by the end of embryogenesis the hypocotyl and cotyledons of the embryo are covered with a continuous cuticle which renders the germinating seedling impermeable to hydrophilic dyes, and resistant to water loss [17]. Cuticle biogenesis is considered to be a unique property of epidermal cells. During plant development, epidermal cells are generated by anticlinal divisions of pre-existing epidermal cells so that each cell inherits an intact external cuticularised cell wall. In this respect the embryonic cuticle is atypical as it is deposited *de novo* at the interface between the developing embryo and endosperm. Although mutants with defective embryonic cuticles have been described [7-10, 17], only very fragmentary evidence about when the embryonic cuticle appears is present in the literature. Furthermore, the structure of the embryonic cuticle, its composition, the mechanisms via which it is deposited and its function during seed development remain unexplored. In this study we aimed to elucidate how the embryonic cuticle is formed, and to investigate how the ALE1 GSO1 GSO2 signalling pathway impacts its biosynthesis and deposition.

RESULTS

Expression of genes involved in cuticle deposition initiates during early embryogenesis.

An inspection of available *in silico* data [18-20] showed that many genes encoding enzymes thought to be involved in cutin biosynthesis are expressed during early embryogenesis (Supplementary Figure 1). *In situ* hybridisations confirmed that genes known to affect cuticle

production, (*LACS2* [21, 22], *FIDDLEHEAD/KCS10* [23-26], *LACERATA* [27] and *BODYGUARD* [28]) have a clear epidermis-specific expression from the mid globular stage onwards (Figure 1, Supplemental Figure 2). The expression of *LTPG1* [29] and *ABCG11* [30], which encode proteins essential for the export of cutin and waxes to the epidermal surface, was also detected from early stages of embryogenesis onwards in the outer-most cells of the embryo (Figure 1, Supplementary Figure 2).

In agreement with published and *in silico* data [9] (Supplementary Figure 1) *GSO1* and *GSO2* were expressed in the embryo from early developmental stages (Figure 1). In addition, their expression was mainly restricted to the embryonic epidermis. *GSO1* expression in the embryonic epidermis was further confirmed using plants expressing a functional genomic *GSO1*-mVENUS fusion under the control of the *GSO1* promoter (*pGSO1:GSO1-mVENUS*) [6] (Supplementary Figure 3). This construction fully complements the toluidine blue phenotype of *gso1-1 gso2-1* double mutant seedlings, and strongly reduces the misshapen-seed phenotype of *gso1-1 gso2-1* mutant seeds when introduced into the *gso1-1 gso2-1* mutant background (Supplementary Figure 3). The expression of cuticle biosynthesis genes was analysed by *in situ* hybridization in *gso1-1 gso2-1* double mutant seeds (which show a stronger cuticle phenotype than *ale1-4* mutants [7]). In agreement with previous results showing that epidermal identity is not affected in *gso1-1 gso2-1* mutants[12], no reduction in the expression of any of the cuticle biogenesis genes analysed was detected in this background (Figure 1 and Supplementary Figure 2).

Loss of GSO1/GSO2 and ALE1 function affects cuticle integrity

The cutin content of seedling cotyledons was assessed. A slight loss in cutin load was detected in *gso1-1 gso2-1*, but not in *ale1-4* cotyledons compared to wild-type. In contrast a very clear reduction in cutin load was observed in control plants lacking the acyltransferases

GPAT4 and GPAT8 required for cutin biosynthesis, as has previously been reported in rosette leaves [31] (Figure 2a). Surprisingly, we found that etiolated *gpat4 gpat8* seedlings showed a similar toluidine blue permeability to *ale1-4* seedlings and a considerably reduced permeability compared to *gso1-1 gso1-2* double mutants, suggesting that the *gpat4 gpat8* cuticle, although quantitatively strongly deficient in cutin monomers remains partially functional (Figure 2b). Taken together with gene expression analysis, these results suggest that the ALE1, GSO1 and GSO2-mediated signalling pathway primarily impacts cuticle organisation rather than the quantity of cuticle components produced by epidermal cells.

The process of embryonic cuticle deposition was investigated in more detail in wild-type (Col-0) seeds (Figure 3a-d). At the two-cell stage the embryo was surrounded by a thick cell wall but no electron dense material was detected at the embryo surface. At the mid-late globular stage, a cutin-like electron-dense material was detected in patches. From heart stage onwards, a continuous layer of electron-dense cutin-like material was detected at the surface of the outer epidermal cell wall in both embryonic cotyledons and hypocotyls. Embryonic cuticle production therefore involves the *de novo* deposition and subsequent coalescence of “patches” of cuticular material at the surface of epidermal cells.

In *gso1-1 gso2-1* mutants the cuticle still showed discontinuities at the heart and walking stick stage (Figure 3e-f, Supplementary Figure 4). In this background the cuticle also appeared thicker, but less condensed than that of wild-type embryos. The outer epidermal cell wall was also abnormally thick at later stages. Similar discontinuities were observed, although at a lower frequency, in the *ale1-4* background at the heart stage as described previously [10], but were less frequent at later stages (Figure 3g-h). These results are consistent with our hypothesis that the ALE1 GSO1 GSO2 pathway is necessary for generating a continuous cuticle layer and further suggest that it controls “gap closure” during embryonic cuticle maturation.

GSO1 GSO2 and ALE1 regulate overlapping gene sets and promote the expression of defence related genes during seed development.

Transcriptional analysis of intact siliques from *gso1-1 gso2-1* mutants *ale1-4* mutants and wild-type plants was carried out at globular and heart stage. The results are provided in Figure 4a and b, Supplementary Table 1, and Supplementary Figures 5 and 6. Globally the number of differentially down-regulated genes in the mutant backgrounds compared to wild-type was higher than the number of up-regulated genes (Supplementary Table 1). A moderate overlap between genes showing higher expression in *ale1-4* and *gso1-1 gso2-1* mutants than wild-type controls was observed (Supplementary Figure 5, Supplementary Table 1). In contrast more than three quarters of the genes showing reduced expression in the *gso1-1 gso2-1* background also showed reduced expression in *ale1-4* mutants (Figure 4a and Supplementary Table 1), corroborating genetic evidence that ALE1, GSO1 and GSO2 act in the same genetic pathway [7]. Because *ALE1* appears to be expressed exclusively in the ESR region of the endosperm [7, 8, 10], genes mis-regulated in both mutant backgrounds likely contain *bona fide* targets (direct and indirect) of the ALE1 GSO1 GSO2 pathway, despite the fact that the expression of *GSO1* and *GSO2* is not restricted to the seed [6, 9, 19].

Genes up-regulated in both mutant backgrounds showed a moderate overrepresentation in GO terms associated with responses to abiotic stress (Supplementary Figure 5). In contrast, genes down-regulated in both backgrounds, particularly at the heart stage, showed a very striking overrepresentation for GO terms linked to defence responses (Figure 4b, Supplementary Figure 6). Mis-regulation of 19 of these genes was validated using additional independent biological samples by qRT-PCR (Supplementary Figure 7). Globally the expression levels of these genes in seeds were low, and attempts to carry out *in situ* hybridisation were inconclusive. However for one target, *SWI3A* [32], expression in the developing embryo predicted from *in silico* data was confirmed, and shown to be

convincingly reduced in embryos of the *gso1-1 gso2-1* double mutant (Supplementary Figure 8). Thus, consistent with the embryonic expression of *GSO1* and *GSO2*, some of the transcriptional regulation downstream of ALE1 GSO1 GSO2 signalling occurs in the embryo. Expression of *ALE1* was not reduced in *gso1-1 gso2-1* mutants (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 7), suggesting that ALE1 is not a downstream target of GSO1 GSO2-mediated signalling, and could therefore either act upstream or in parallel to GSO1 and GSO2 in mediating embryonic responses necessary for the establishment of an intact embryonic cuticle.

MPK6 acts in the ALE1 GSO1 GSO2 signalling pathway.

The GSO1 and GSO2 receptor kinases belong to family XI of the Leucine-Rich Repeat (LRR)-RLKs [33, 34], and are closely related to the “danger” (PEP) peptide receptors PEPR1 and PEPR2 [35, 36], which are involved in the amplification of defence responses triggered by pathogen-associated molecular pattern (PAMP) perception [37]. As previously reported [38], aberrantly shaped seeds, resembling those of *ale1-4* mutants, are found in *Arabidopsis mpk6-2* mutants lacking the MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE6 (MPK6) protein, which acts downstream of PEPR signalling. In addition a proportion of *mpk6-2* mutant seeds are very small, and had a tendency to rupture (Supplementary Figure 9) [38]. A proportion of *mpk6-2* seedlings showed abnormal permeability to the hydrophobic dye toluidine blue, consistent with the presence of cuticle defects (Figure 4c). Triple *mpk6-2 gso1-1 gso2-1* and double *ale1-4 mpk6-2* mutants were therefore generated to investigate the genetic interactions of *ALE1*, *GSO1* and *GSO2* with *MPK6*. Fertility in *ale1-4 mpk6-2* double mutants was similar to that in *mpk6-2* mutants, while triple *mpk6-2 gso1-1 gso2-1* mutant plants were viable but produced very few seeds.

In terms of seed shape and seedling cuticle permeability phenotypes triple *mpk6-2 gso1-1 gso2-1* mutants had phenotypes identical to those observed in *gso1-1 gso2-1* double mutants (Figure 4c, Supplementary Figure 9). The frequency of “twisted” seeds (including ruptured seeds), and toluidine blue stained seedlings was non-additive in *ale1-4 mpk6-2* double mutant plants, consistent with *ALE1*, *GSO1*, *GSO2* and *MPK6* acting in the same genetic pathway to control seedling permeability (Figure 4c and Supplementary Figure 9).

MPK6 is involved in a plethora of reproductive and non-reproductive developmental processes and shows functional redundancy with other MPK proteins ([38-49]) meaning that global transcriptome analysis in the *mpk6-2* background would likely be uninformative for this study. We therefore directly tested a subset of genes mis-regulated in *gso1-1 gso2-1* and *ale1-4* mutants for misregulation in *mpk6-2* mutants at three stages of embryo development. Five out of eight genes tested showed reduced expression in *mpk6-2* either at all three stages (*SWI3A*, *WRKY70* and *NIMIN1*), or in two out of three developmental stages tested (*SIB1* and *NIMIN2*) (Supplementary Figure 10). Interestingly three genes showing strong down-regulation in the *gso1-1 gso2-1* mutants (*WRKY33*, *WRKY46* and *WRKY53*) did not show a reduction in expression in the *mpk6-2* mutant background (Supplementary Figure 10) indicating that their transcriptional regulation downstream of GSO1 and GSO2-mediated signalling could depend on other signalling components. The expression of *ALE1*, *GSO1* and *GSO2* was not altered in *mpk6-2* mutants (Supplementary Figure 10).

To further confirm that MPK6 acts downstream of GSO1 and GSO2, we analysed MPK phosphorylation in developing seeds from Col-0 and *gso1-1 gso2-1* double mutants. In seedlings, phosphorylation of MPK6 (and additional MPKs) can only be detected after elicitation (for example with the flg22 peptide). The response to flg22 is not attenuated in *gso1/gso2* mutant seedlings (Supplementary Figure 11a and 12a). In contrast, MPK6 phosphorylation (but not phosphorylation of other MPKs) could be detected in un-elicited

seeds (Supplementary Figure 11b). Following quantification, we found that the degree of phosphorylation of MPK6 was reduced by approximately 50% in *gso1-1 gso2-1* double mutant seeds compared to wild-type, suggesting that a significant proportion of MPK6 phosphorylation in seeds likely depends on the activity of GSO1 and GSO2 (Figure 4d and Supplementary Figure 11b). Intriguingly, in seeds, a band corresponding to a second phosphorylated MPK was detected exclusively in *mpk6-2* mutants, suggesting that the relatively weak *mpk6* phenotype could be due to compensation by an as yet unidentified MPK [50].

MPK6 activity is required in the embryo to maintain cuticle integrity.

The strong expression of GSO1 and GSO2 in the embryonic epidermis, suggests that the activity of GSO1 and GSO2 in cuticle formation is required in the embryo. To further confirm the spatial requirement for GSO1/GSO2-dependent signalling in the seed, we complemented the *mpk6-2* mutant either with the *MPK6* cDNA expressed under the ubiquitously expressed *RPS5A* promoter, or under the endosperm specific *RGP3* promoter [51, 52]. We were unable to complement either the misshapen seed/seed bursting phenotypes or the toluidine blue permeability phenotypes of *mpk6-2* mutants by expressing *MPK6* in the endosperm, but obtained full complementation of all phenotypes in plants expressing *MPK6* under the *RPS5A* promoter (Supplementary Figures 13 and 14). We conclude that the seedling permeability phenotype of *mpk6-2* mutants is most likely due to signalling defects in the embryo. Seed bursting defects could be caused by lack of MPK6 in the testa, although this remains to be investigated in more detail.

A role for GSO1/2 in resistance to pathogens

The idea that GSO1 and GSO2 could play a role in defence signalling was then evaluated using inoculation assays with the virulent bacterial strain *Pseudomonas syringae*

pv. *tomato* (*Pst*) DC3000. Syringe-infiltration delivers bacteria directly into intercellular spaces, and thus susceptibility is unlikely to be due to defects in cuticle integrity. However, to exclude the possibility that susceptibility of *gso1-1gso2-1* mutants was due to defects in the cuticle of adult plants, cutin and wax loads in adult leaves used for pathogen test was analysed and no differences were observed compared to wild-type controls (Figure 5a and Supplementary Figures 15). Furthermore, TEM analysis of these leaves revealed no obvious defects in cuticle continuity (Supplementary Figure 16).

The role played by GSO1 and GSO2 in defence signalling was confirmed by the observation that *gso1-1 gso2-1* mutant plants showed enhanced susceptibility to the virulent bacterial strain *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 (Figure 5b). Moreover, *gso1-1 gso2-1* plants were also highly susceptible to infection with the avirulent strain *Pst* DC3000 *AvrRpm1*, which correlated with an impaired hypersensitive response (HR) as compared to wild-type plants (Figure 5c,d). In contrast, *ale1-4* mutant plants, which were also tested, showed no enhanced susceptibility to either pathogen, and similar HR levels to Col-0 plants after inoculation with avirulent *Pst* DC3000 *AvrRpm1*, consistent with the restriction of *ALE1* expression to the developing seed.

Expression of pathogen-induced defence marker genes was found to be significantly reduced in *gso1-1 gso2-1* double mutants after inoculation compared to wild-type plants, consistent with reduced defence-related transcriptional changes in this background (Figure 5e, Supplementary Figure 16). In addition, reduced expression of the *PR1* marker gene correlated with weaker accumulation of the PR1 protein, confirming impaired defence signalling in the *gso1-1 gso2-1* background (Figure 5f).

In order to determine the individual contribution of GSO1 and GSO2 to the Arabidopsis defence response, *gso1-1* and *gso2-1* single mutant plants were next inoculated with *Pst* DC3000 and *Pst* DC3000 *AvrRpm1*. While bacterial growth rates in the *gso2* mutant

were not significantly different from those of wild-type plants after inoculation with either virulent or avirulent bacteria, the *gso1* mutant showed intermediate levels of bacterial growth between Col-0 and the double mutant *gso1-1 gso2-1* after inoculation with *Pst* DC3000 *AvrRpm1* (Figure 5g,h). Notably, *gso1-1 gso2-1* plants expressing the functional GSO1-mVENUS construct shown in Supplementary Figure 3 displayed similar bacterial growth rates than wild-type or *gso2-1* mutant plants confirming the prominent role of GSO1 in Arabidopsis antibacterial defence (Figure 5h).

DISCUSSION

In this study, in agreement with the similarity between GSO1/2 and PEPR1/2 proteins, we found that the Arabidopsis MPK6, which has been shown to act downstream of PEPR signalling [53], shows constitutive phosphorylation in developing seeds, and that this phosphorylation is partially dependent upon GSO1 and GSO2. In addition, we showed that GSO1 and GSO2 are required for the expression of a set of defence-related genes during early seed development. Consistent with these data we found that in adult rosette leaves GSO1 and GSO2 are jointly required both for the expression of PR1 protein and for mounting an efficient defence response against virulent and avirulent strains of *Pseudomonas*. Taken together, our results suggest that a functional GSO1/GSO2-dependent defence-related signalling pathway is active in developing seeds. This scenario is distinct from previously reported situations in which single pathway components, such as the co-receptor BAK1, play distinct roles in developmental and defence-related signalling cascades through interaction with multiple receptors [54, 55]. However, the role of the transcriptional targets of GSO1/GSO2 signalling in seeds remains to be elucidated.

Our work also shows that GSO1/GSO2, ALE1 and MPK6 act in a genetic pathway involved in ensuring embryonic cuticle integrity. We show for the first time that embryonic

cuticle biogenesis involves the coalescence of discontinuous patches of cutin-like material that appear on the embryo surface at the globular stage, and that *gso1-1 gso2-1* and *ale1-4* mutants are incapable of completing “gap closure” during this process. Interestingly, GSO1 (also known as SCHENGEN3 [6]) was recently shown to be involved in ensuring the continuity of another apoplastic diffusion barrier, the Casparian strip, which prevents the apoplastic movement of solutes from the cortex to the stele of the root [6]. GSO1 may therefore form part of a general mechanism employed by plants for monitoring the “integrity” of apoplastic barriers formed during plant development. The role of GSO1 and GSO2 in the closure of gaps in the nascent cuticle, and indeed the role of GSO1 in Casparian strip biogenesis, implies spatial regulation of their activity at the subcellular level. Cytoplasmic signalling components (which might not be uncovered by transcriptome analysis) are therefore likely to be of critical importance in GSO1 GSO2 signalling in the embryonic epidermis. Local production of apoplastic Reactive Oxygen Species (ROS) and/or calcium influxes could represent one such mechanism, and indeed localized ROS production has been implicated in Casparian strip formation [6, 56]. Similarly, pathogen attack induces not only transcriptional regulation but also rapid cellular responses such as the production of ROS and the influx of calcium [57, 58]. However although a plausible model has proposed that ROS release could mediate Casparian strip polymerisation through polymerisation of monolignols [56], it is less obvious how ROS could directly affect the biosynthesis of an aliphatic cutin-based barrier, although a possible role for ROS in linking the cuticle to the cell wall has been evoked [59]. Another, potentially linked, possibility is that GSO1/GSO2 activity in the embryo could spatially direct the secretion of either cuticle components or enzymes and cell wall components necessary for their integration into the cutin polymer, in a system analogous to the rapid and highly localized deposition of callose observed upon hyphal penetration into

epidermal cells (reviewed in [60, 61]). However, observing these processes *in situ*, within the living seeds, would require developments in microscopy which are not yet available.

Our work highlights two important questions which merit further discussion. A first important question is whether the GSO1/GSO2 signalling pathway could play a more general role in protecting seeds against pathogen attack. Cuticle integrity in adult plants has been shown to be required for resistance to *Pseudomonas* pathovars [62, 63]. The action of the ALE1 GSO1/GSO2 signalling pathway in ensuring embryonic cuticle integrity is therefore likely to have a significant influence on embryo and seedling susceptibility to bacterial pathogens. We have also shown that GSO1/GSO2, ALE1 and MPK6 are necessary for the expression of known defence marker genes in seeds. Cuticle permeability phenotypes have neither been reported in the literature for mutants affected in the defence markers identified in our transcriptome studies, nor found in our own studies (unpublished results). This, taken with the fact that GSO1 and GSO2 are required for resistance to bacterial pathogens post-germination and in the apparent absence of cuticle defects, raises the question of whether the ALE1 GSO1/GSO2 signalling pathway could act at a more global level either to protect developing seeds from the ingress of bacterial pathogens (thus affecting vertical pathogen transmission), or to “prime” embryos against pathogen attack upon germination. Exploring this possibility would necessitate functionally separating susceptibility caused by cuticle defects from lack of immune priming, and will be technically very challenging, but could ultimately inform strategies aiming to reduce vertical transmission of plant pathogens.

The second question concerns how signalling via GSO1 and GSO2 is triggered in the seed in the absence of pathogens. In this study we confirmed previous genetic data showing that ALE1 functions in the same pathway as GSO1 and GSO2. We previously proposed that the function of ALE1, GSO1 and GSO2 in ensuring the apoplastic separation of the embryo and endosperm became necessary in angiosperms due to developmental constraints imposed

by the sexualisation of the female gametophyte, which led to the simultaneous development of the embryo and surrounding nutritive tissues post fertilization, rather than their sequential development [11, 12]. *ALE1* expression is endosperm specific and, as previously suggested [64], the recruitment of *ALE1* to a function in reinforcing the embryonic cuticle may have occurred during the emergence of the angiosperm lineage. It is thus possible that ALE1 acts to produce an as yet unidentified ligand for the GSO1 and GSO2 receptors. Interestingly, two sulfated peptides, CIF1 and CIF2, which can act as ligands for GSO1 during Casparian strip formation have recently been identified [65, 66]. Testing the role of these molecules in developing seeds will be an obvious priority. However Nakayama and colleagues specifically reported that no cuticle defects (as gauged by cotyledon fusion phenotypes) were observed in *cif1 cif2* double mutants and the possibility that other signalling molecules could be involved in ensuring embryonic cuticle integrity therefore cannot be excluded.

Subtilases have been shown to be involved in defence responses and immune priming in plants [67, 68]. In such a scenario the function of ALE1 in the seed could be analogous to the “immune priming” function previously reported for the subtilase SBT3.3 [68]. We therefore propose that endosperm-localised factors (like ALE1) may have been recruited in order to hijack a defence-signalling pathway involving the ancestor(s) of GSO1 and GSO2, and trigger an “auto-immune” type response in the embryo to ensure cuticle integrity. The identification of further pathway components, and in particular the substrates of ALE1 and ligands of GSO1 and GSO2 in seeds, will help to confirm this hypothesis.

Materials and Methods

Plant material. The *pGSO1*:GSO1-mVENUS line was kindly donated by Professor Niko Geldner (Unil-Sorge, University of Lausanne). The *mpk6-2* (SALK_073907) mutant and the *mpk3-1* (SALK-151594) were kindly provided by Dr Roberta Galletti.

Growth conditions and plant treatments. Unless otherwise specified, plants were grown for 10 d in sterile conditions on Murashige and Skoog (MS) agar plates with 0.5% sucrose, 1 month under short-day conditions (19°C, 8h light / 17°C, 16h dark) and then transferred to standard long-day conditions (21°C, 16h light/8h dark) for one more month. To stage material, newly opened flowers were marked each day for two weeks. For bacterial growth assays, plants were grown under controlled conditions in a growth chamber at 21°C, with a 9-hours light period and a light intensity of 190 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. For MPK6 activation analysis, seedlings were grown for 10 d in MS liquid medium supplemented with 0.5% sucrose in 100 μm cell strainers submerged in 6-well plates (5ml of medium per well). Cell strainers were transferred to new plates containing MS sucrose 0.5% supplemented with 100 nM or 1 nM flg22 or water and incubated for 15 and 60 minutes at room temperature. For cutin analysis of seedlings, seeds were sterilized, plated on MS medium supplemented with 0.7 % agar, 0.7 % sucrose and 2.5 mM MES-KOH, pH 5.7, and stratified in the dark for 3 days at 4°C. Plates were then transferred to a controlled environment growth chamber at 22°C and with continuous light, and seedlings were grown for 5 days before harvesting the cotyledons. For toluidine blue staining, sterilized seeds were spread uniformly on 15 cm MS plates with 0.5% sucrose and 0.4% Phytigel (Sigma) (pH 5.8) and stratified for 2 days in the dark at 4°C. After stratification seeds were transferred to a growth chamber and incubated for 6h under continuous light followed by 4 days in the dark.

***In situ* hybridization.** DNA templates for the probes used in *in situ* hybridizations were amplified using the primers listed in Supplementary Table 2. Digoxigenin-labelled RNA probes were produced and hybridized to tissue sections following standard procedures. In brief, siliques were opened, fixed overnight in ice-cold PBS containing 4% paraformaldehyde, dehydrated through an ethanol series, embedded in Paraplast Plus (Mc Cormick Scientific) and sectioned (8 μm). Immobilized sections were dewaxed and hydrated, treated with 2x

saline sodium citrate (20 min), digested for 15 min at 37°C with proteinase K (20 mg/ml) in 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA), treated for 2 min with 0.2% glycine in PBS, rinsed, postfixed with 4% paraformaldehyde in PBS (10 min, 4°C), rinsed, treated with 0.25% w/v acetic anhydride in 100mM triethanolamine (pH 8.0 with HCl) for 10 min, rinsed and dehydrated. Sections were then hybridized under coverslips overnight at 50°C with RNA probes (produced using DIG RNA labelling kit (Roche)) diluted in DIG easy Hyb solution (Roche) following the manufacturer's instructions. Following hybridization, the slides were extensively washed in 0.1x saline sodium citrate and 0.5% SDS at 50 °C (3 h), blocked for 1 hour in 1% blocking solution (Roche) in TBS and for 30 minutes in BSA solution (1% BSA, 0.3% Triton-X-100, 100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂), and then incubated in a 1/3000 dilution of in alkaline phosphatase-conjugated antidigoxigenin antibody (Roche) in BSA solution for 2 h at RT. Sections were extensively washed in BSA solution, rinsed and treated overnight in the dark with a buffered NBT/BCIP solution. Samples were rinsed in water before air drying and mounting in Entellan (Sigma).

Microscopy. Embryos were imaged by gently bursting seeds between slide and cover-slip in water and imaging using a dipping lens with a long working distance. Confocal imaging was carried out on a Zeiss LSM700 and on a Leica TCS SP8. Light microscopy imaging was carried out using a Zeiss axioimager 2.

Cutin analysis. Cuticle composition and content was analyzed as previously described [69, 70].

TEM analysis. For transmission electron microscopy analysis, seeds were removed from siliques by removal of the replum tissue with attached seeds. Seeds were high-pressure frozen with a Leica EM-PACT-1 system. Three seeds were inserted into a flat copper carrier, fast-frozen, and cryosubstituted into the Leica AFS1 device. The different freeze-substitution steps

were as follows: 54 h at -90°C in acetone solution containing 0.2% glutaraldehyde, 1% osmium tetroxide, and 0.1% uranyl acetate. The temperature was then raised with a step of $2^{\circ}\text{C}/\text{h}$ before remaining for 8 hours at -60°C . The temperature was raised again to -30°C for 8h00 before being increased to 4°C . Samples were washed three times for 10 min in 100% acetone before embedding in Spurr's resin, which was performed progressively (8 h in 25% Spurr's resin in acetone, 24 h in 50% Spurr's resin in acetone, 24 h in 75% Spurr's resin in acetone, and two times for 12 h in 100% Spurr's resin). Polymerization was performed at 70°C for 18 h.

Leaves were sectioned and fixed in paraformaldehyde, 3.2% glutaraldehyde 2.5% in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) under vacuum for 1 h and overnight at 4°C , rinsed, postfixed in 1% OsO_4 in phosphate buffer for 1h30, rinsed, stained with tannic acid (1% in water) for 30 min, rinsed, dehydrated through an ethanol series and impregnated in increasing concentrations of SPURR's resin over a period of 4 days before being polymerized at 70°C for 18 h.

Samples were sectioned (65 nm sections) and imaged at 120 kV using an FEI TEM tecnai Spirit with 4 k x 4 k eagle ccd.

Generation of micro-array data. Microarray analysis was carried out at a Transcriptomic Platform, POPS, at the Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2, Orsay, France), using a CATMAv7 array based on AGILENT technology [71]. The CATMAv7 array for the *Arabidopsis thaliana* genome was made using gene annotations included in FLAGdb++, an integrative database of plant genomes (<http://urgv.evry.inra.fr/FLAGdb>, [72]). The single high density CATMAv7 microarray slide contains four chambers, each containing 149 916 primers. Each 60 bp primer is present in triplicate in each chamber for robust analysis, and as both strands. The array contains 35 754 probes (in triplicate) corresponding to genes annotated in TAIRv8 (among which 476 probes correspond to mitochondrial and chloroplast

genes), 1289 probes corresponding to EUGENE software predictions, 658 probes to miRNA/MIRs and 240 control probes.

3 independent biological replicates were produced. For each biological repetition and each point, RNA samples were obtained by pooling RNAs from staged siliques containing embryos at the pre-globular to globular, or the young to late heart stage. Total RNA was extracted using the SpectrumTM Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) according to the suppliers' instructions. For each comparison, one technical replicate with fluorochrome reversal was performed for each biological replicate (i.e. four hybridizations per comparison). The labelling of cRNAs with Cy3-dUTP or Cy5-dUTP was performed as described in the Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling manual (© Agilent Technologies, Inc.). The hybridization and washing steps were performed according to the Agilent Microarray Hybridization Chamber User Guide instructions ((© Agilent Technologies, Inc.). Two micron scanning was performed with InnoScan900 scanner (Innopsys^R, Carbonne, FRANCE) and raw data were extracted using Mapix^R software (Innopsys^R, Carbonne, FRANCE).

Statistical Analysis of Microarray Data. Experiments were designed with the statistics group of the Unité de Recherche en Génomique Végétale. For each array, the raw data comprised the logarithm of median feature pixel intensity at wavelengths 635 nm (red) and 532 nm (green). For each array, a global intensity-dependent normalization using the loess procedure [73] was performed to correct the dye bias. The differential analysis was based on log-ratio averaging over the duplicate probes and over the technical replicates. Hence the number of available data points for each gene equals the number of biological replicates and is used to calculate the moderated t-test [74]. Analysis was carried out using the R software (<http://www.R-project.org>). Under the null hypothesis, no evidence that the specific variances

vary between probes was highlighted by Limma and consequently the moderated t-statistic was assumed to follow a standard normal distribution. To control the false discovery rate, adjusted p-values found using the optimized FDR approach [75] were calculated. We considered as being differentially expressed, the probes with an adjusted p-value ≤ 0.05 . The function SqueezeVar of the library Limma was used to smooth the specific variances by computing empirical Bayes posterior means. The library kerfdr was used to calculate the adjusted p-values.

Data Deposition. Microarray data from this article were deposited at Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), accession no. GSE68048) and at CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/>; Project: AU14-04_INASEED) according to the “Minimum Information About a Microarray Experiment” standards.

Quantitative gene expression analysis in seeds. Intact siliques were frozen in liquid nitrogen and total RNA was extracted using the Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma). Total RNAs were digested with Turbo DNA-free DNase I (Ambion) according to the manufacturer’s instructions. RNA was reverse transcribed using the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) according to the manufacturer’s protocol. PCR reactions were performed in an optical 384-well plate in the QuantStudio 6 Flex System (Applied Biosystems), using FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche), in a final volume of 10 μ l, according to the manufacturer’s instructions. The following standard thermal profile was used for all PCR reactions: 95 °C for 10 min, 40 cycles of 95 °C for 10 s, and 60 °C for 30 s. Data were analysed using the QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System Software (Applied Biosystems). As a reference, primers for the EIF4A cDNA were used. PCR efficiency (E) was estimated from the data obtained from standard curve amplification using

the equation $E=10^{-1/\text{slope}}$. Expression levels are presented as $E^{-\Delta Ct}$, where $\Delta Ct=Ct_{GOI}-Ct_{EIF4A}$. Primers are listed in Supplementary Table 2.

Toluidine blue staining. The lids of plates containing etiolated seedlings were removed and plates were immediately flooded with staining solution [0.05% (w/v) Toluidine Blue + 0.4% (v/v) Tween-20] for 2 minutes. The staining solution was poured off and plates were immediately rinsed gently by flooding under a running tap until the water stream was no longer visibly blue (1-2 minutes). Seedlings were photographed under a Leica MZ12 stereomicroscope.

Protein extraction and MPK6 activation analysis. Seedlings or seeds were quickly frozen in liquid nitrogen and proteins were extracted in buffer containing 50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 10% glycerol, 0.1% tween 20, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, 1x protease inhibitor cocktail P9599 (Sigma-Aldrich), and 1x MS-Safe protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Equal amounts of proteins (20 µg for seedlings and 10 µg for seeds) were resolved on 10% polyacrylamide gels and transferred onto a nylon membrane (Schleicher & Schuell). For seedlings primary antibodies against phospho-p44/42 MAP kinase (Cell Signaling Technologies) and then against MPK6 (Sigma-Aldrich) were used with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit as secondary antibody. Signal detection was performed using the SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate kit (Pierce). For seeds primary antibodies against phospho-p44/42 MAP kinase and then against MPK6 were used with IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H + L), and the bound complex was detected using the Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor; Lincoln, NE). The images were analysed and quantified with ImageJ. Background was subtracted for each band.

Bacterial inoculation assays. 4-week-old plants were kept at high humidity for 12 h before inoculation. The abaxial side of leaves was injected with a bacterial suspension of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 or *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 carrying the avirulence gene *AvrRpm1* using a blunt syringe. For determination of *in planta* bacterial growth, a bacterial density of 5×10^5 cfu/ml in 10 mM MgCl_2 was used. Leaves samples were harvested 0 and 3 days post-inoculation and ground on sterile water. A 1:1000 dilution for each sample was plated on King's B selective medium and incubated at 28°C for 2 days. Data statistical analysis was performed using Statgraphics Centurion XV.II Professional Software (Statpoint Technologies). Normality of residues was verified by the Kolmogorov–Smirnov test. The effect of the genotype was tested by ANOVA ($P < 0.01$) and subsequent LSD post-hoc test.

For gene expression analyses, plants were inoculated with a bacterial suspension of *Pst* DC3000 *AvrRpm1* (5×10^7 cfu/ml in 10 mM MgCl_2). Leaf samples were harvested at the indicated time points post-inoculation and stored at -80°C until being processed. Material for RNA analysis was ground in liquid nitrogen and total RNA was isolated using the Nucleospin RNA plant kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturers' recommendations. Reverse transcription was performed using 1.5 µg of total RNA. Real-time quantitative PCR was performed on a Light Cycler 480 II machine (Roche Diagnostics, Meylan, France), using Roche reagents. Primers used for Q-RT-PCR are provided as Supporting Information. Relative expression was calculated as the ΔCp between each gene and the average of internal controls [*SAND family* (At2g28390)]. Average ΔCp was calculated from 3 experimental replicates and related to the value of each gene at time 0, which is set at 1.

To analyse the accumulation of the PR1 protein, plants were inoculated with a suspension of *Pst* DC3000 *AvrRpm1* (5×10^7 cfu/ml in 10 mM MgCl_2). Samples were harvested 0, 24 and 48 hours after inoculation and ground in liquid nitrogen. Protein extracts were prepared by

boiling for 5 minutes in Laemmli buffer and centrifuged at 14,000g for 10 min. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose by wet electroblotting. Transferred proteins were visualized by Ponceau S red staining. Antibodies used for Western blotting were anti-PR1 rabbit polyclonal (Agrisera, 1:2,500) and goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz, 1:3,000). Proteins were visualized using the Immobilon kit (Millipore) under standard conditions.

Acknowledgements

We would like to thank Professor N. Geldner for providing seeds, and A. Lacroix, J. Berger, H. Leyral and I. Desbouchages for assistance with plant growth and logistics. AC was funded by a grant from the French National Research Agency (ANR-13-BSV2-0002, INASEED). VD was funded by a grant from the French Ministry of National Education and Research. SM was supported by a doctoral grant from the Rhône-Alpes region. RG was supported by a European Research Council Starting Grant (Phymorph #307387). Work at the LIPM was supported by the INRA SPE department (AAP2014) and the French Laboratory of Excellence project “TULIP” (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02). Microscopy and lipid analyses were respectively performed at the Bordeaux Imaging Center (which is a member of the national infrastructure France BioImaging), and the Metabolome Facility of the Functional Genomic Center of Bordeaux (which is supported by the grant MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010).

Author contributions

Experiments were carried out by AC, LB, VD, JJ, CV, LT, ND, SP, SM and FD. Results were analysed by all authors. GI, SR, FD, JJ and RG designed experiments and supervised the work. GI wrote the paper with contributions from all authors.

The authors declare that they have no competing financial interests.

Figure Legends

Figure 1

Genes involved in cuticle biosynthesis are co-expressed with *GSO1* and *GSO2* during embryogenesis, but their expression is not dependent upon *GSO1* and *GSO2*. Analysis of the expression of genes involved in cuticle biosynthesis in wild-type (Col-0) and *gso1-1 gso2-1* seeds containing late globular/triangle, heart and early torpedo stage embryos (left to right).

Figure 2

Cuticle permeability defects in *ale1-4* and *gso1-1 gso2-1* seedlings do not correlate with changes in cutin load. (a) Cotyledons grown *in vitro* for 5 days under continuous light were collected, delipidated and their cutin content and composition was analyzed as described in the Material and Method section. ω OH and DCA stand respectively for omega-hydroxy acid and α,ω -dicarboxylic acid. Mean values are shown in $\mu\text{g}/\text{mg}$ of delipidated dry residue (DR) $\pm$ SD of three replicates. Statistical differences were determined according to a Student's *t* test : *** denotes $p < 0.0001$, ** denotes $p < 0.001$ and * denotes $p < 0.01$. (b) Cuticle permeability to toluidine blue in etiolated seedlings from the genotypes tested in (a).

Figure 3

Embryonic cuticle biogenesis involves a process of patch coalescence which is defective in *ale1-4* and *gso1-1 gso2-1* mutants. Analysis of embryonic cuticle deposition in wild-type (a-d), *gso1-1 gso2-1* (e-f) and *ale1-4* (g,h) embryos at 2 cell (a), mid globular (b), mid heart (c,e,g) and walking stick (d,f,h) stages of embryogenesis. White arrows show the external face of the embryonic cuticle. Scale bar = 500nm.

Figure 4

ALE1, GSO1 and GSO2 positively regulate the expression of defence-related genes in seeds via a signalling pathway involving MPK6 activation. (a) Summary of overlaps between gene sets showing reduced expression in *ale1-4* and *gso1-1 gso2-1* mutants at the globular and heart stages of development. (b) GO term analysis of genes down-regulated in both *ale1-4* and *gso1 gso2* mutants at the heart stage (c) Seedling cuticle permeability phenotypes of *mpk6-2* and *ale1-4* and *gso1-1 gso2-1* mutants and in double and triple mutant combinations. (d) Degree of phosphorylation of MPK6 in Col-0 and *gso1-1 gso2-1* mutant seeds. Error bars represent SD of 4 replicates. A representative western blot is shown in Supplemental Figure 11b.

Figure 5

GSO1 and GSO2 positively regulate Arabidopsis resistance and HR in response to bacterial inoculation. (a) Cuticle analysis of mature leaves from wild-type, *ale1-4* and *gso1-1 gso2-1* plants (detailed analysis shown in Supplementary Figure 12). (b,c) Bacterial growth in the indicated Arabidopsis lines, 0 (white bars) and 3 days (grey bars) after inoculation with (b) *Pst* DC3000 (5×10^5 cfu/ml) or (c) *Pst* DC3000 *AvrRpm1* (5×10^5 cfu/ml). Mean bacterial densities were calculated from with the indicated number of individual plants (4 leaves/plant). Lowercase letters indicate significant differences based on the tests described in the *Methods* section. (d) Symptoms developed by the indicated Arabidopsis lines 24 hpi with *Pst AvrRpm1* (5×10^7 cfu/ml). Pictures are representative of five independent experiments in which 10 plants of each line were infiltrated. (e) Gene expression in Arabidopsis Col-0 and *gso1-1 gso2-1* lines before (white bars) and at the indicated times after (gray bars) inoculation with *Pst AvrRpm1* (5×10^7 cfu/ml). Expression values of the individual genes were normalized using the *SAND* family as an internal standard and related to the value in Col-0 at time 0, which is set at 100%. Mean and SEM values were calculated from 3 experiments with 4 replicates. Statistical differences were determined according to a Student's *t* test : *** denotes

$p < 0.00005$, ** denotes $p < 0.0005$ and * denotes $p < 0.01$. (f) Accumulation levels of the PR1 protein (top panel) as revealed by Western blot with anti-PR1 antibodies following inoculation of the indicated Arabidopsis lines, 0, 24 and 48 hours after inoculation (hpi) with *Pst* DC3000 (5×10^7 cfu/ml). Ponceau S staining (bottom panel) confirms equal loading. Molecular mass markers in kiloDaltons are indicated on the right. (g,h) Bacterial growth in the indicated Arabidopsis lines 3 days after inoculation with (g) *Pst* DC3000 (5×10^5 cfu/ml) or (h) *Pst* DC3000 *AvrRpm1* (5×10^5 cfu/ml). Mean bacterial densities were calculated from the indicated number of individual plants (4 leaves/plant). Lowercase letters indicate significant differences based on the tests described in the *Methods* section.

References

1. Ingram, G.C. (2010). Family life at close quarters: communication and constraint in angiosperm seed development. *Protoplasma* 247, 195-214.
2. Baroux, C., Spillane, C., and Grossniklaus, U. (2002). Evolutionary origins of the endosperm in flowering plants. *Genome Biol* 3, reviews1026.
3. Fiume, E., and Fletcher, J.C. (2012). Regulation of Arabidopsis embryo and endosperm development by the polypeptide signaling molecule CLE8. *Plant Cell* 24, 1000-1012.
4. Costa, L.M., Marshall, E., Tesfaye, M., Silverstein, K.A., Mori, M., Umetsu, Y., Otterbach, S.L., Papareddy, R., Dickinson, H.G., Boutiller, K., et al. (2014). Central cell-derived peptides regulate early embryo patterning in flowering plants. *Science* 344, 168-172.
5. Bayer, M., Nawy, T., Giglione, C., Galli, M., Meinel, T., and Lukowitz, W. (2009). Paternal control of embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Science* 323, 1485-1488.
6. Pfister, A., Barberon, M., Alassimone, J., Kalmbach, L., Lee, Y., Vermeer, J.E., Yamazaki, M., Li, G., Maurel, C., Takano, J., et al. (2014). A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *Elife* 3, e03115.
7. Xing, Q., Creff, A., Waters, A., Tanaka, H., Goodrich, J., and Ingram, G.C. (2013). ZHOUP1 controls embryonic cuticle formation via a signalling pathway involving the subtilisin protease ABNORMAL LEAF-SHAPE1 and the receptor kinases GASSHO1 and GASSHO2. *Development* 140, 770-779.
8. Yang, S., Johnston, N., Talideh, E., Mitchell, S., Jeffree, C., Goodrich, J., and Ingram, G. (2008). The endosperm-specific ZHOUP1 gene of Arabidopsis thaliana regulates endosperm breakdown and embryonic epidermal development. *Development* 135, 3501-3509.
9. Tsuwamoto, R., Fukuoka, H., and Takahata, Y. (2008). GASSHO1 and GASSHO2 encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in Arabidopsis embryos. *Plant J* 54, 30-42.
10. Tanaka, H., Onouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Machida, C., and Machida, Y. (2001). A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in Arabidopsis embryos and juvenile plants. *Development* 128, 4681-4689.
11. Moussu, S., San-Bento, R., Galletti, R., Creff, A., Farcot, E., and Ingram, G. (2013). Embryonic cuticle establishment: the great (apoplastic) divide. *Plant Signal Behav* 8, e27491.
12. San-Bento, R., Farcot, E., Galletti, R., Creff, A., and Ingram, G. (2014). Epidermal identity is maintained by cell-cell communication via a universally active feedback loop in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 77, 46-58.
13. Bernard, A., and Joubes, J. (2012). Arabidopsis cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation. *Prog Lipid Res* 52, 110-129.
14. Fich, E.A., Segerson, N.A., and Rose, J.K. (2016). The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles. *Annu Rev Plant Biol*.

15. Javelle, M., Vernoud, V., Rogowsky, P.M., and Ingram, G.C. (2011). Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytol* **189**, 17-39.
16. Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F., and Metraux, J.P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Front Plant Sci* **5**, 274.
17. Tanaka, T., Tanaka, H., Machida, C., Watanabe, M., and Machida, Y. (2004). A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in *Arabidopsis*. *Plant J* **37**, 139-146.
18. Le, B.H., Cheng, C., Bui, A.Q., Wagmaister, J.A., Henry, K.F., Pelletier, J., Kwong, L., Belmonte, M., Kirkbride, R., Horvath, S., et al. (2010). Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8063-8070.
19. Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**, e718.
20. Belmonte, M.F., Kirkbride, R.C., Stone, S.L., Pelletier, J.M., Bui, A.Q., Yeung, E.C., Hashimoto, M., Fei, J., Harada, C.M., Munoz, M.D., et al. (2013). Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the *Arabidopsis* seed. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E435-444.
21. Lu, S., Song, T., Kosma, D.K., Parsons, E.P., Rowland, O., and Jenks, M.A. (2009). *Arabidopsis* CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-CoA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant J* **59**, 553-564.
22. Schnurr, J., Shockey, J., and Browse, J. (2004). The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 629-642.
23. Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., Baud, S., Bird, D., Debono, A., Durrett, T.P., et al. (2013). Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book* **11**, e0161.
24. Beisson, F., Li-Beisson, Y., and Pollard, M. (2012). Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 329-337.
25. Pruitt, R.E., Vielle-Calzada, J.P., Ploense, S.E., Grossniklaus, U., and Lolle, S.J. (2000). FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1311-1316.
26. Yephremov, A., Wisman, E., Huijser, P., Huijser, C., Wellesen, K., and Saedler, H. (1999). Characterization of the FIDDLEHEAD gene of *Arabidopsis* reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *The Plant Cell* **11**, 2187-2201.
27. Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H., and Yephremov, A. (2001). Functional analysis of the LACERATA gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid omega -hydroxylation in development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9694-9699.
28. Kurdyukov, S., Faust, A., Nawrath, C., Bar, S., Voisin, D., Efremova, N., Franke, R., Schreiber, L., Saedler, H., Metraux, J.P., et al. (2006). The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 321-339.
29. Debono, A., Yeats, T.H., Rose, J.K., Bird, D., Jetter, R., Kunst, L., and Samuels, L. (2009). *Arabidopsis* LTPG Is a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Required for Export of Lipids to the Plant Surface. *Plant Cell*.
30. Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., Kunst, L., Wu, X., Yephremov, A., and Samuels, L. (2007). Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J* **52**, 485-498.
31. Li, Y., Beisson, F., Koo, A.J., Molina, I., Pollard, M., and Ohlrogge, J. (2007). Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18339-18344.
32. Sarnowski, T.J., Rios, G., Jasik, J., Swiezewski, S., Kaczanowski, S., Li, Y., Kwiatkowska, A., Pawlikowska, K., Kozbial, M., Kozbial, P., et al. (2005). SWI3 subunits of putative SWI/SNF

- chromatin-remodeling complexes play distinct roles during Arabidopsis development. *Plant Cell* 17, 2454-2472.
33. Shiu, S.H., and Bleecker, A.B. (2001). Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10763-10768.
 34. Shiu, S.H., and Bleecker, A.B. (2003). Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* 132, 530-543.
 35. Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A.C., Tax, F.E., and Ryan, C.A. (2010). PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 22, 508-522.
 36. Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., Postel, S., Arents, M., Jeworutzki, E., Al-Rasheid, K.A., et al. (2010). Perception of the Arabidopsis danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *J Biol Chem* 285, 13471-13479.
 37. Yamaguchi, Y., and Huffaker, A. (2011). Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 14, 351-357.
 38. Lopez-Bucio, J.S., Dubrovsky, J.G., Raya-Gonzalez, J., Ugartechea-Chirino, Y., Lopez-Bucio, J., de Luna-Valdez, L.A., Ramos-Vega, M., Leon, P., and Guevara-Garcia, A.A. (2014). Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J Exp Bot* 65, 169-183.
 39. Zhang, Y., Wang, P., Shao, W., Zhu, J.K., and Dong, J. (2015). The BASL polarity protein controls a MAPK signaling feedback loop in asymmetric cell division. *Dev Cell* 33, 136-149.
 40. Sethi, V., Raghuram, B., Sinha, A.K., and Chattopadhyay, S. (2014). A mitogen-activated protein kinase cascade module, MKK3-MPK6 and MYC2, is involved in blue light-mediated seedling development in Arabidopsis. *Plant Cell* 26, 3343-3357.
 41. Smekalova, V., Luptovciak, I., Komis, G., Samajova, O., Ovecka, M., Dosekčilová, A., Takac, T., Vadovic, P., Novak, O., Pechan, T., et al. (2014). Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in Arabidopsis post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytol* 203, 1175-1193.
 42. Guan, Y., Meng, X., Khanna, R., LaMontagne, E., Liu, Y., and Zhang, S. (2014). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in Arabidopsis. *PLoS Genet* 10, e1004384.
 43. Guan, Y., Lu, J., Xu, J., McClure, B., and Zhang, S. (2014). Two Mitogen-Activated Protein Kinases, MPK3 and MPK6, Are Required for Funicular Guidance of Pollen Tubes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 165, 528-533.
 44. Jewaria, P.K., Hara, T., Tanaka, H., Kondo, T., Betsuyaku, S., Sawa, S., Sakagami, Y., Aimoto, S., and Kakimoto, T. (2013). Differential effects of the peptides Stomagen, EPF1 and EPF2 on activation of MAP kinase MPK6 and the SPCH protein level. *Plant Cell Physiol* 54, 1253-1262.
 45. Khan, M., Rozhon, W., Bigeard, J., Pflieger, D., Husar, S., Pitzschke, A., Teige, M., Jonak, C., Hirt, H., and Poppenberger, B. (2013). Brassinosteroid-regulated GSK3/Shaggy-like kinases phosphorylate mitogen-activated protein (MAP) kinase kinases, which control stomata development in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* 288, 7519-7527.
 46. Meng, X., Wang, H., He, Y., Liu, Y., Walker, J.C., Torii, K.U., and Zhang, S. (2012). A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates Arabidopsis inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. *Plant Cell* 24, 4948-4960.
 47. Muller, J., Beck, M., Mettbach, U., Komis, G., Hause, G., Menzel, D., and Samaj, J. (2010). Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant J* 61, 234-248.
 48. Cho, S.K., Larue, C.T., Chevalier, D., Wang, H., Jinn, T.L., Zhang, S., and Walker, J.C. (2008). Regulation of floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15629-15634.

49. Wang, H., Liu, Y., Bruffett, K., Lee, J., Hause, G., Walker, J.C., and Zhang, S. (2008). Haplo-insufficiency of MPK3 in MPK6 mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in Arabidopsis ovule development. *Plant Cell* 20, 602-613.
50. Ren, D., Liu, Y., Yang, K.Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., and Zhang, S. (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5638-5643.
51. Moussu, S.A., Doll, N.M., Chamot, S., Brocard, L., Creff, A., Fourquin, C., Widiez, T., Nimchuk, Z.L., and Ingram, G.C. (2017). ZHOUP1 and KERBEROS Mediate Embryo/Endosperm Separation by Promoting the Formation of an Extra-Cuticular Sheath at the Embryo Surface. *Plant Cell*.
52. Denay, G., Creff, A., Moussu, S., Wagnon, P., Thevenin, J., Gerentes, M.F., Chambrier, P., Dubreucq, B., and Ingram, G. (2014). Endosperm breakdown in Arabidopsis requires heterodimers of the basic helix-loop-helix proteins ZHOUP1 and INDUCER OF CBP EXPRESSION 1. *Development* 141, 1222-1227.
53. Bartels, S., Lori, M., Mbengue, M., van Verk, M., Klauser, D., Hander, T., Boni, R., Robatzek, S., and Boller, T. (2013). The family of Peps and their precursors in Arabidopsis: differential expression and localization but similar induction of pattern-triggered immune responses. *J Exp Bot* 64, 5309-5321.
54. Postel, S., Kufner, I., Beuter, C., Mazzotta, S., Schwedt, A., Borlotti, A., Halter, T., Kemmerling, B., and Nurnberger, T. (2010). The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in Arabidopsis development and immunity. *Eur J Cell Biol* 89, 169-174.
55. Kim, B.H., Kim, S.Y., and Nam, K.H. (2013). Assessing the diverse functions of BAK1 and its homologs in arabidopsis, beyond BR signaling and PTI responses. *Molecules and cells* 35, 7-16.
56. Lee, Y., Rubio, M.C., Alassimone, J., and Geldner, N. (2013). A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell* 153, 402-412.
57. Steinhorst, L., and Kudla, J. (2013). Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiol* 163, 471-485.
58. Kadota, Y., Shirasu, K., and Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiol* 56, 1472-1480.
59. Dominguez, E., Heredia-Guerrero, J.A., and Heredia, A. (2015). Plant cutin genesis: unanswered questions. *Trends Plant Sci* 20, 551-558.
60. Ellinger, D., and Voigt, C.A. (2014). Callose biosynthesis in Arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Annals of botany* 114, 1349-1358.
61. Voigt, C.A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Front Plant Sci* 5, 168.
62. Tang, D., Simonich, M.T., and Innes, R.W. (2007). Mutations in LACS2, a long-chain acyl-coenzyme A synthetase, enhance susceptibility to avirulent *Pseudomonas syringae* but confer resistance to *Botrytis cinerea* in Arabidopsis. *Plant Physiology* 144, 1093-1103.
63. Xiao, F., Goodwin, S.M., Xiao, Y., Sun, Z., Baker, D., Tang, X., Jenks, M.A., and Zhou, J.M. (2004). Arabidopsis CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO J* 23, 2903-2913.
64. Waters, A., Creff, A., Goodrich, J., and Ingram, G. (2013). "What we've got here is failure to communicate": Zou mutants and endosperm cell death in seed development. *Plant Signal Behav* 8.
65. Doblas, V.G., Smakowska-Luzan, E., Fujita, S., Alassimone, J., Barberon, M., Madalinski, M., Belkhadir, Y., and Geldner, N. (2017). Root diffusion barrier control by a vasculature-derived peptide binding to the SGN3 receptor. *Science* 355, 280-284.
66. Nakayama, T., Shinohara, H., Tanaka, M., Baba, K., Ogawa-Ohnishi, M., and Matsubayashi, Y. (2017). A peptide hormone required for Casparian strip diffusion barrier formation in Arabidopsis roots. *Science* 355, 284-286.

67. Pearce, G., Yamaguchi, Y., Barona, G., and Ryan, C.A. (2010). A subtilisin-like protein from soybean contains an embedded, cryptic signal that activates defense-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 14921-14925.
68. Ramirez, V., Lopez, A., Mauch-Mani, B., Gil, M.J., and Vera, P. (2013). An extracellular subtilase switch for immune priming in Arabidopsis. *PLoS Pathog* *9*, e1003445.
69. Domergue, F., Vishwanath, S.J., Joubes, J., Ono, J., Lee, J.A., Bourdon, M., Alhattab, R., Lowe, C., Pascal, S., Lessire, R., et al. (2010). Three Arabidopsis fatty acyl-coenzyme A reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition. *Plant Physiol* *153*, 1539-1554.
70. Bourdenx, B., Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Leger, A., Roby, D., Pervent, M., Vile, D., Haslam, R.P., Napier, J.A., et al. (2011). Overexpression of Arabidopsis ECERIFERUM1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol* *156*, 29-45.
71. Gagnot, S., Tamby, J.P., Martin-Magniette, M.L., Bitton, F., Taconnat, L., Balzergue, S., Aubourg, S., Renou, J.P., Lecharny, A., and Brunaud, V. (2008). CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV-CATMA platform. *Nucleic Acids Res* *36*, D986-990.
72. Derozier, S., Samson, F., Tamby, J.P., Guichard, C., Brunaud, V., Grevet, P., Gagnot, S., Label, P., Leple, J.C., Lecharny, A., et al. (2011). Exploration of plant genomes in the FLAGdb++ environment. *Plant Methods* *7*, 8.
73. Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* *30*, e15.
74. Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* *3*, Article3.
75. Storey, J.D., and Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 9440-9445.

Figure 1

Col-0

gso1 gso2

late globular/
triangle stage

heart stage

early torpedo
stage

late globular/
triangle stage

heart stage

early torpedo
stage

LACS2

FDH

LTPG1

GSO1

GSO2

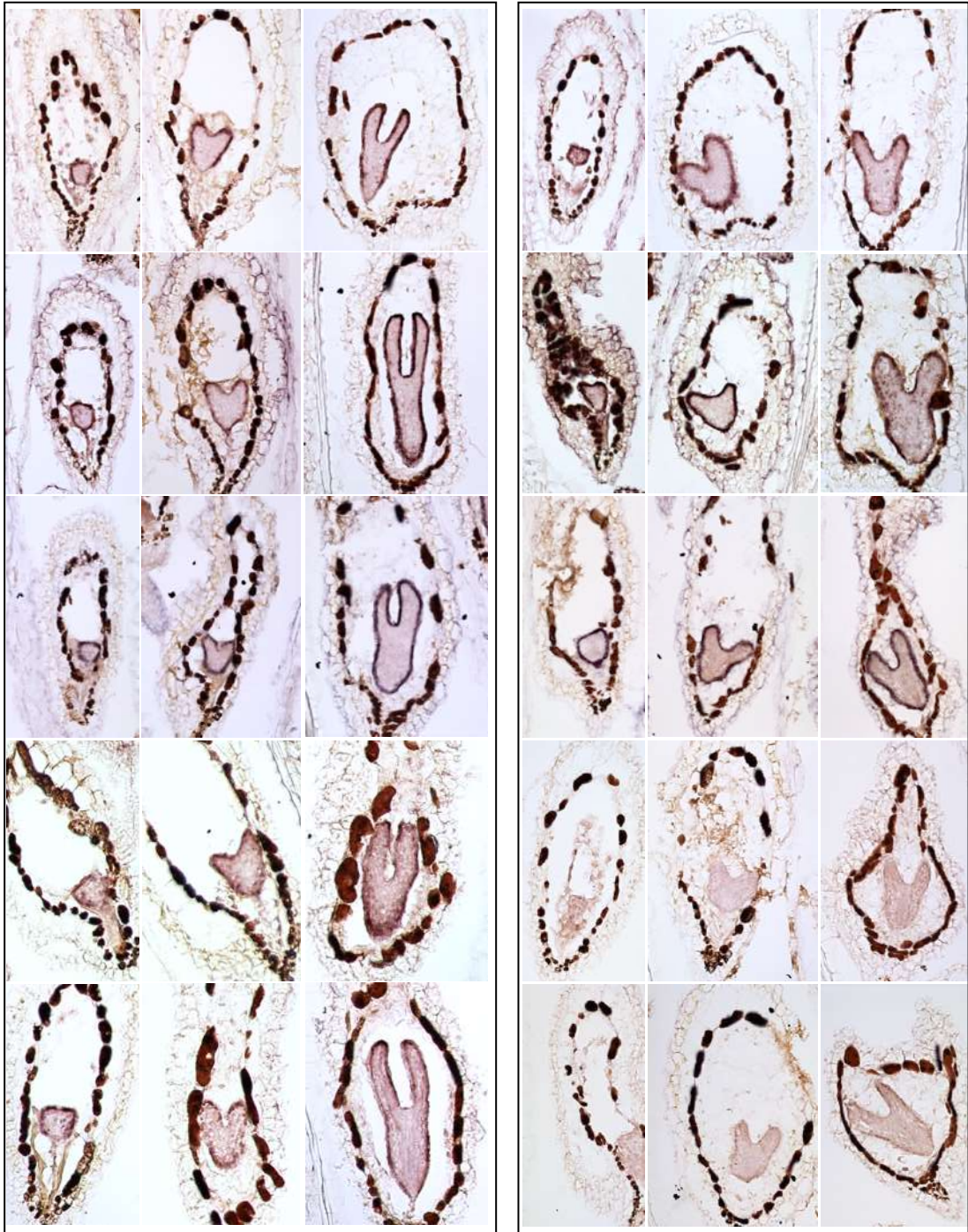


Figure 2

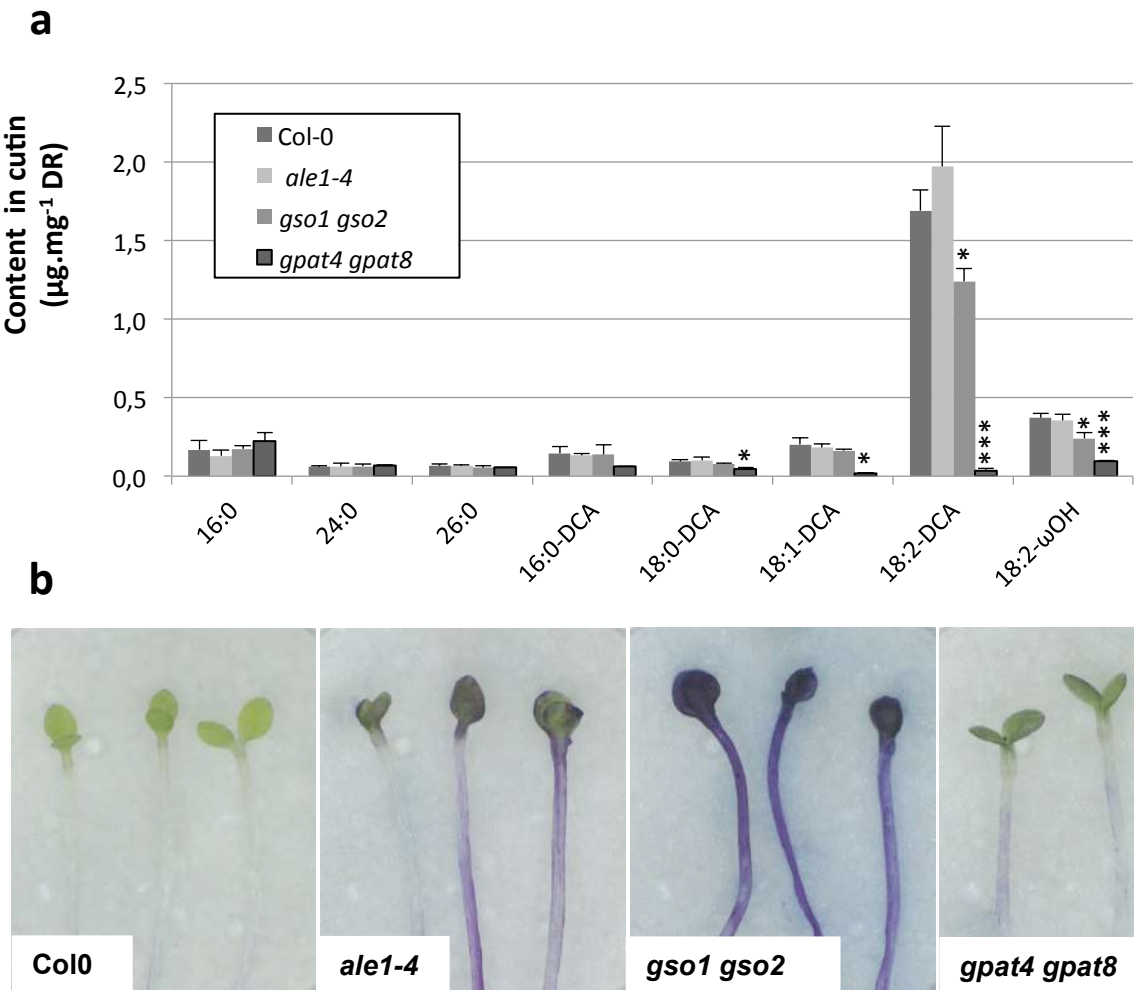


Figure 3

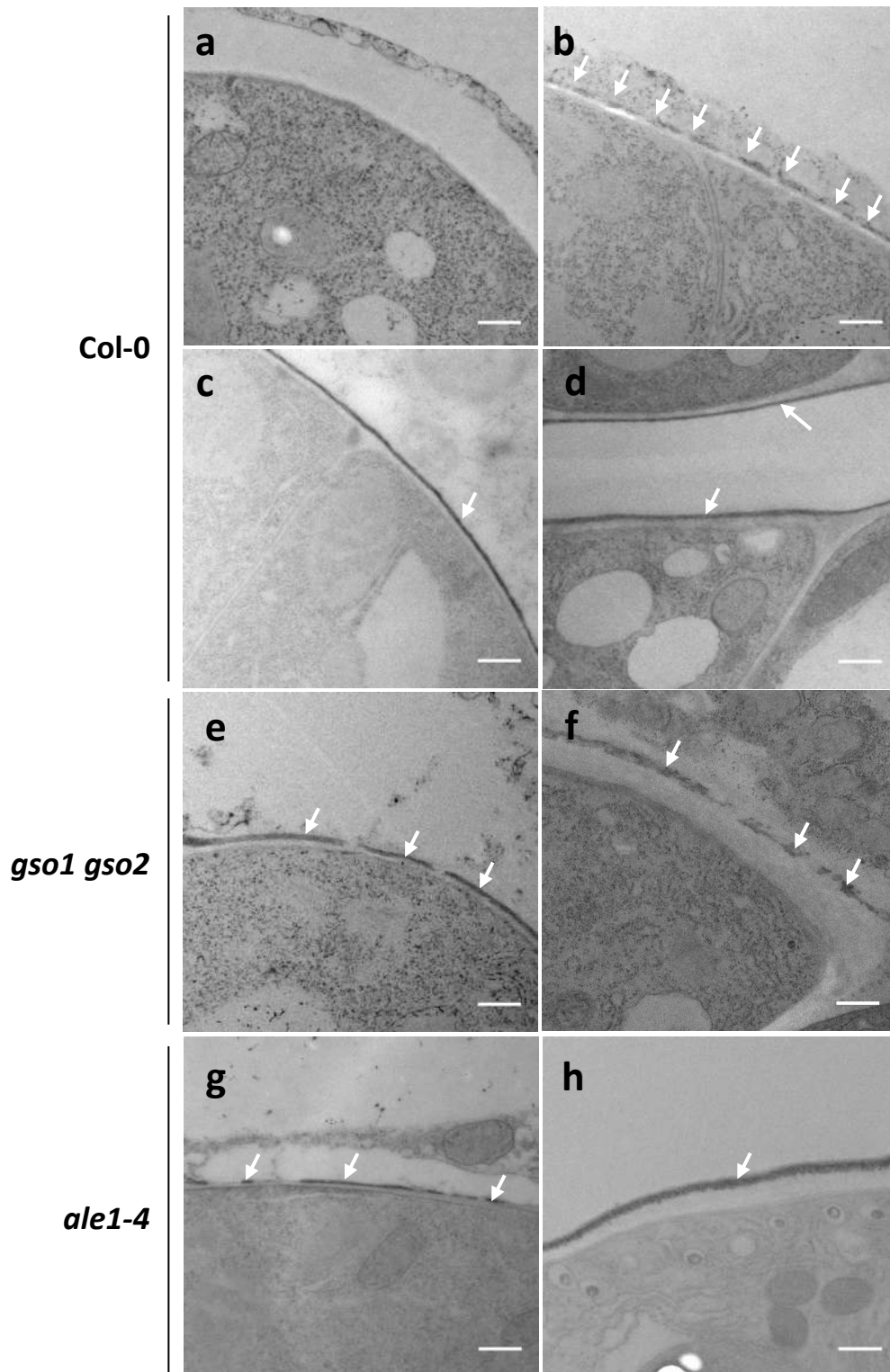


Figure 4

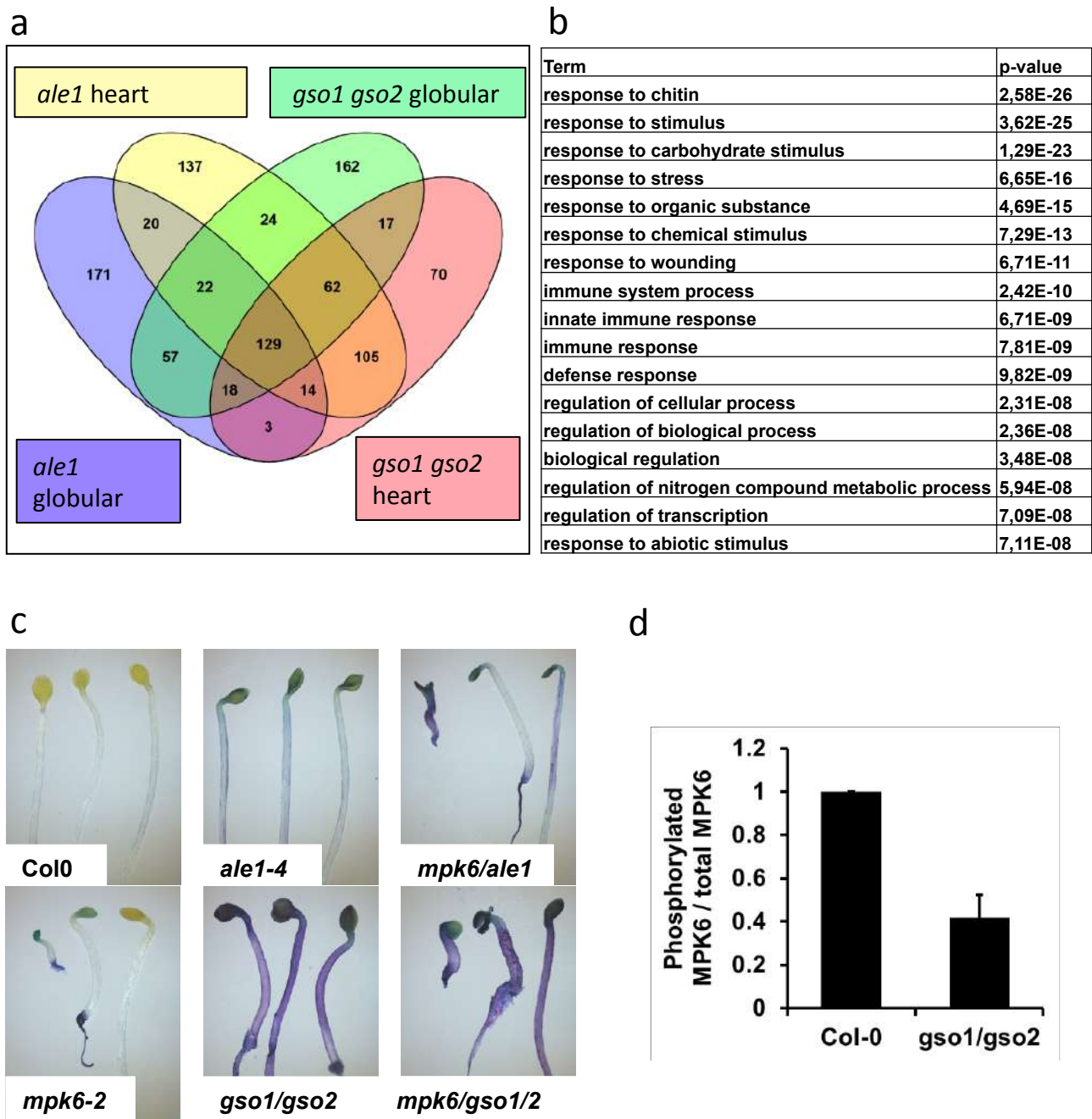
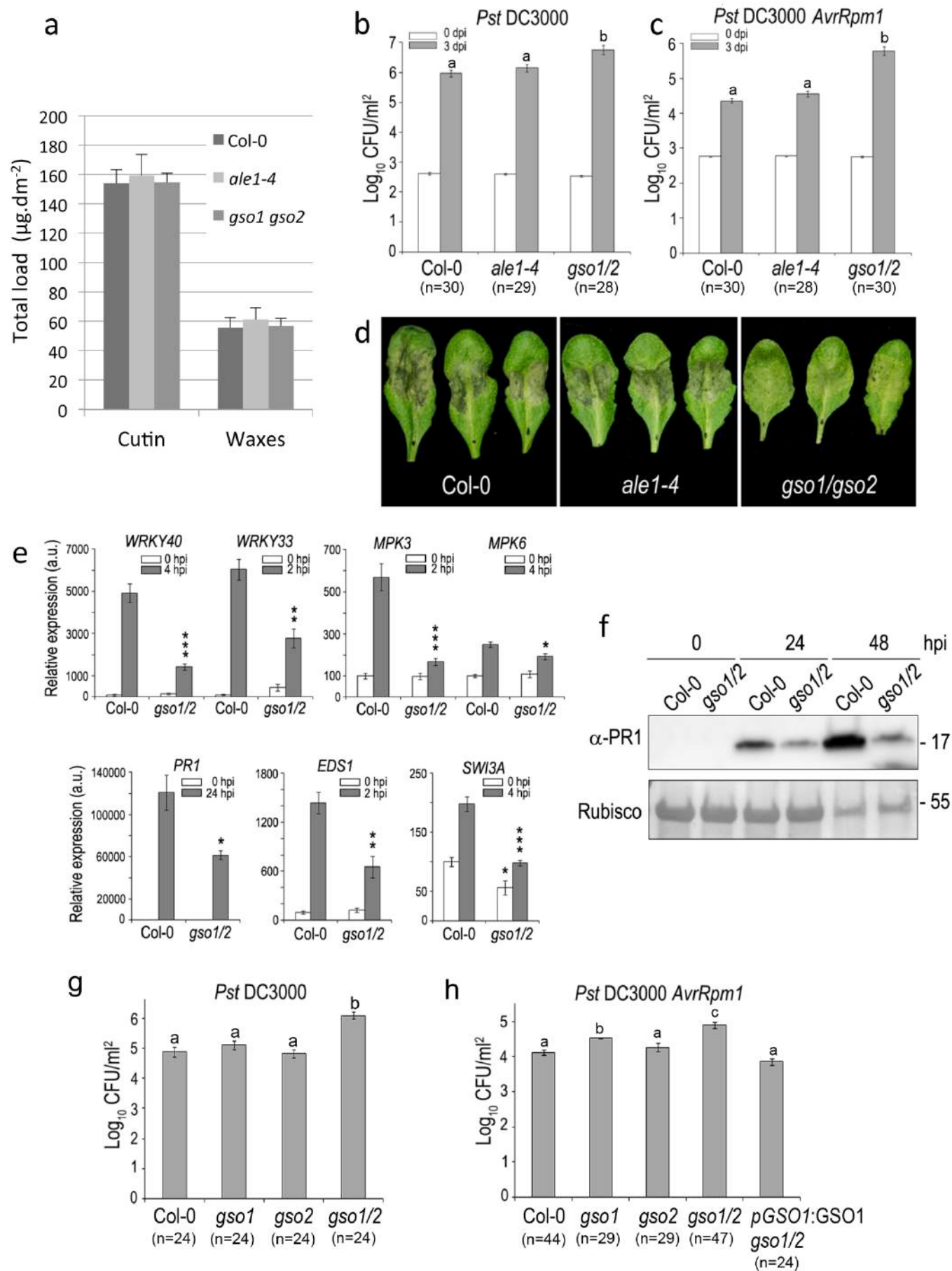
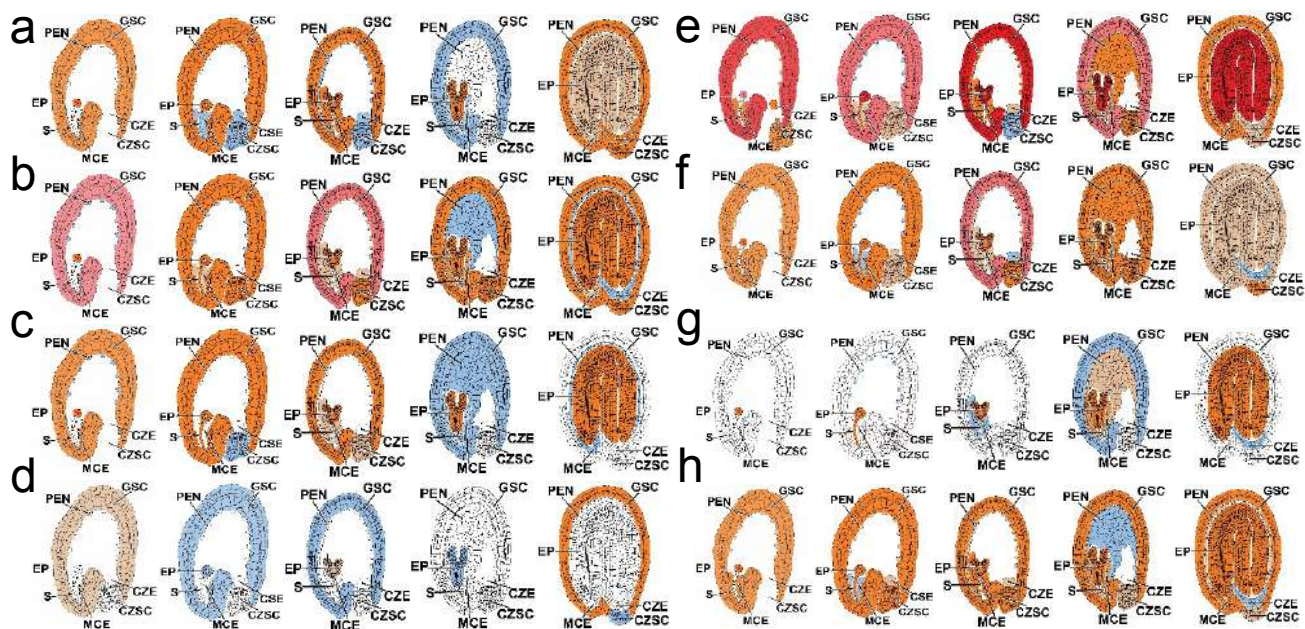


Figure 5

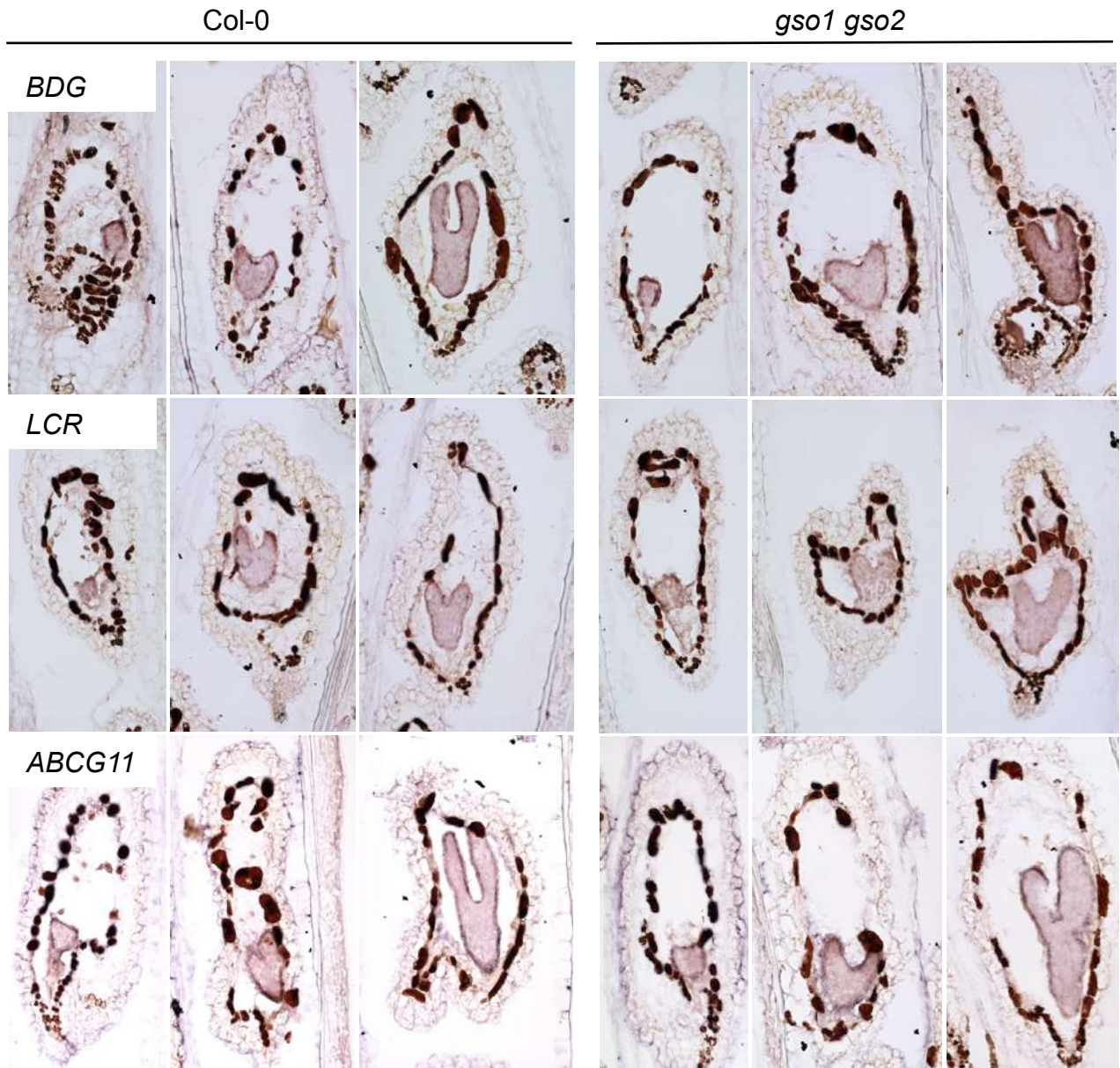


Supplementary Figure 1 (Related to Figure 1)



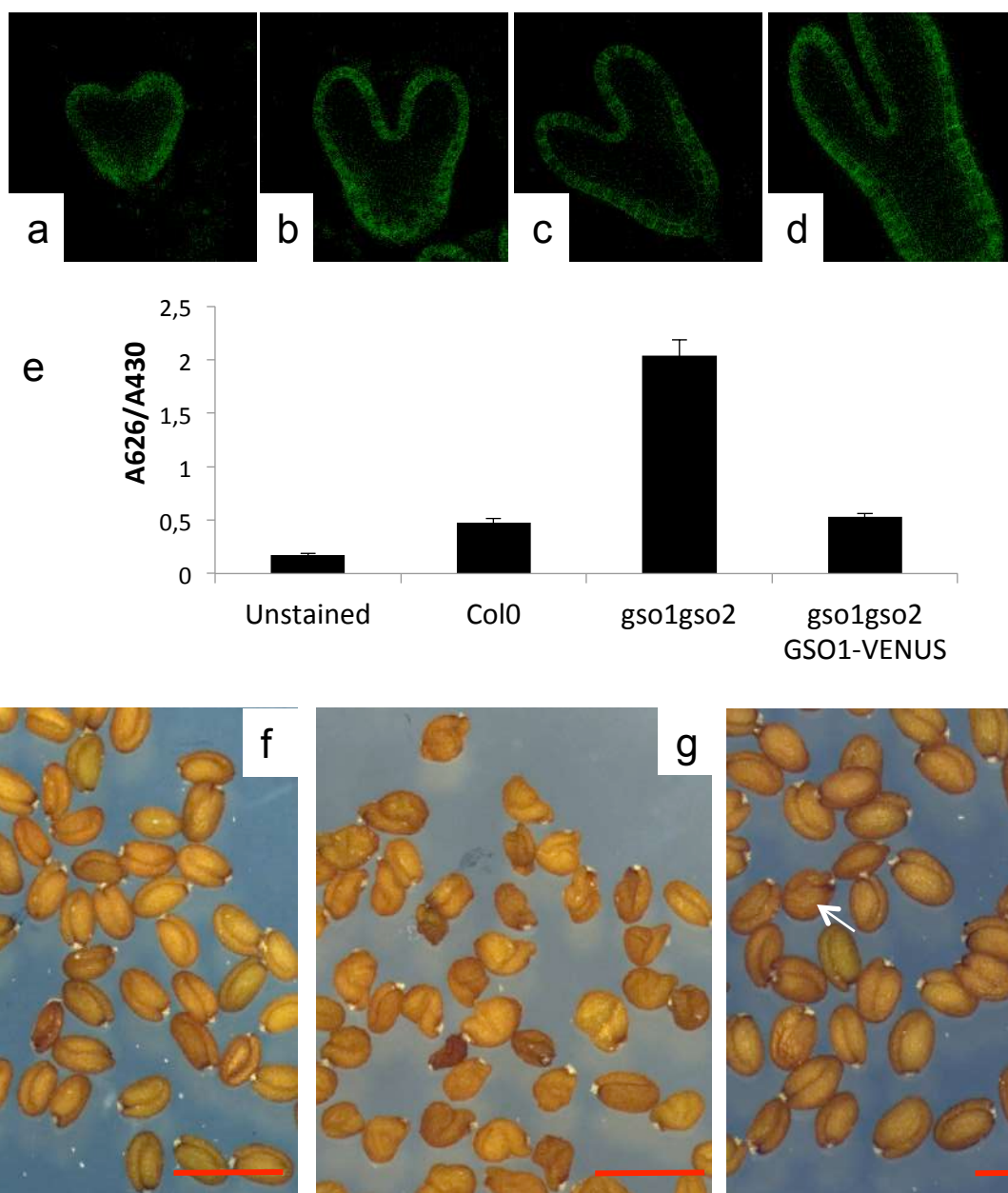
Genes involved in cuticle biosynthesis are expressed early during embryo development and are co-expressed with *GSO1* and *GSO2*. Expression data for *LACS2* (a), *FDH* (b), *BDG* (c), *LCR* (d), *LTPG1* (e), *ABCG11* (f), *GSO1* (g) and *GSO2* (h) downloaded from the Seed Gene Network resource (<http://seedgenenetwork.net/>).

Supplementary Figure 2 (Related to Figure 1)



Genes involved in cuticle biosynthesis are co-expressed with *GSO1* and *GSO2* in the embryonic epidermis during embryogenesis, but their expression is not dependent upon *GSO1* and *GSO2*. Analysis of the expression of genes involved in cuticle biosynthesis in wild-type (*Col-0*) and *gso1-1 gso2-1* seeds containing late globular/triangle, heart and early torpedo stage embryos (left to right).

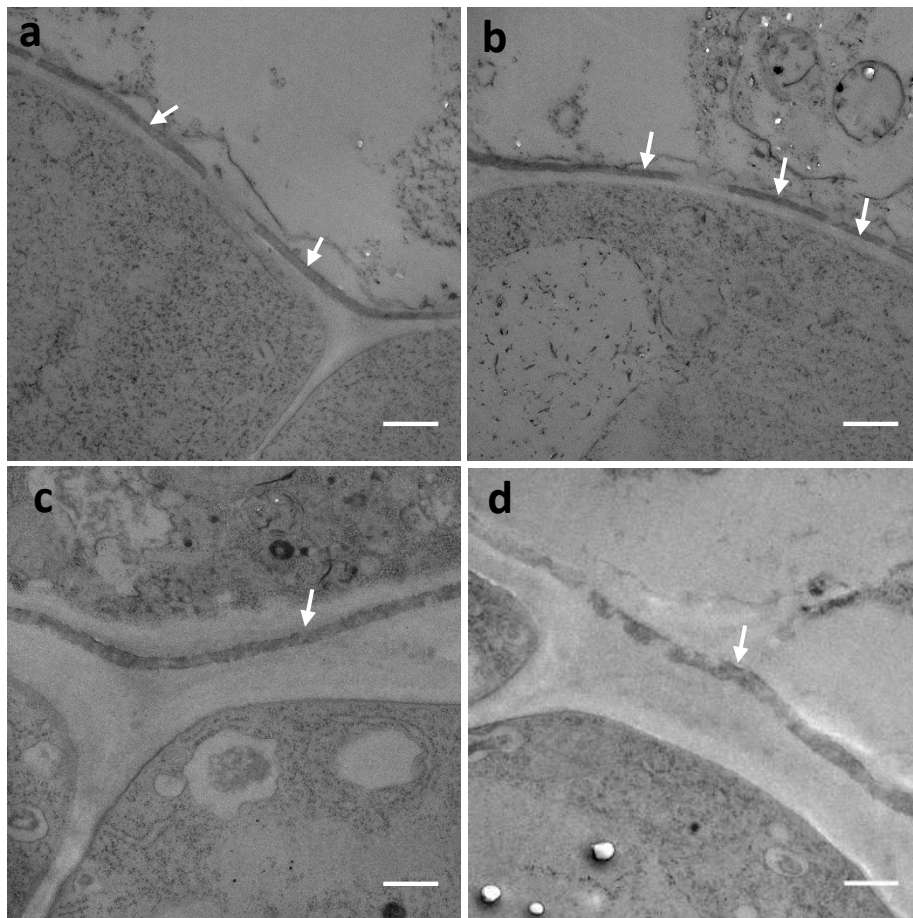
Supplementary Figure 3 (Related to Figure 1)



Localisation and functionality of the *pGSO1:GSO1-mVENUS* transgene in developing embryos.

Confocal images of GSO1-mVENUS at early heart, mid heart, late heart and early torpedo stages of development (**a-d**). (**e**) The *pGSO1:GSO1-mVENUS* transgene complements seedling cuticle defects in *gso1-1 gso2-1* double mutants. Quantification of seedling toluidine blue permeability was carried out as described in Moussu et al., 2017. Error bars represent standard errors from three biological replicates. (**f-h**) The *pGSO1-GSO1:mVENUS* transgene complements seed shape defects in *gso1-1 gso2-1* double mutants. Seed populations from wild-type (**f**), *gso1-1 gso2-1* double mutants (**g**) and *gso1-1 gso2-1* double mutants carrying the The *pGSO1:GSO1-mVENUS* transgene (**h**). Occasional misshapen shaped seeds are observed in the complemented line (white arrows), compared with 100% misshapen seeds in the un-complemented double mutant. Scale bar = 1mm.

Supplementary Figure 4 (Related to Figure 3)



***gso1-1 gso2-1* mutant embryos produce a diffuse and discontinuous cuticle.** Analysis of embryonic cuticle deposition in *gso1-1 gso2-1* at the *mid heart* (**a-b**) and *walking stick* (**c-d**) stages of embryogenesis. White arrows show external face of embryonic cuticle. Scale bar = 500nm.

Supplementary Figure 5 (Related to Figure 4)

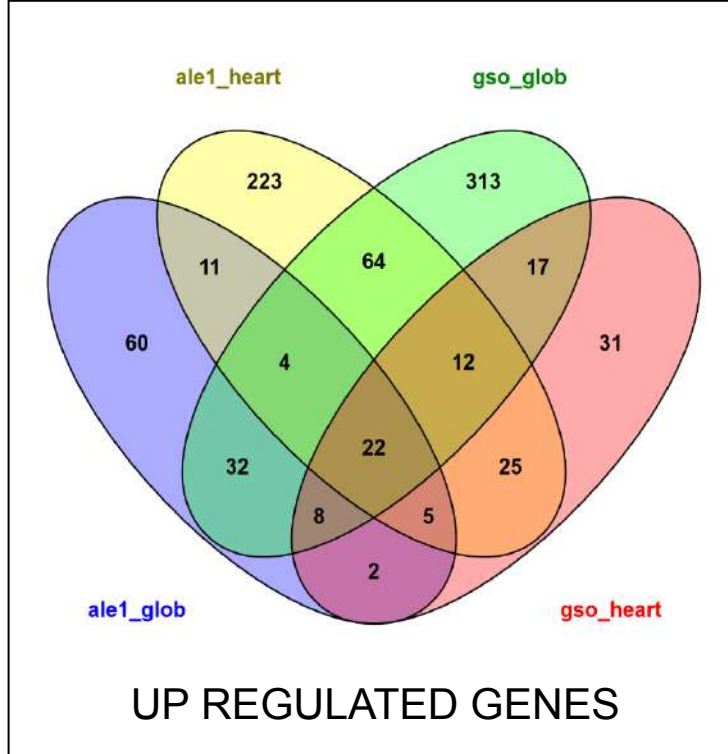
a

	Term	Observed Frequency	Expected Frequency	p-value
GO:0009415	response to water	12 out of 59 genes, 20.3%	211 out of 24961 genes, 0.8%	3.06E-11
GO:0009414	response to water deprivation	11 out of 59 genes, 18.6%	202 out of 24961 genes, 0.8%	2.72E-10
GO:0009266	response to temperature stimulus	13 out of 59 genes, 22%	399 out of 24961 genes, 1.6%	7.81E-10
GO:0006950	response to stress	24 out of 59 genes, 40.7%	2104 out of 24961 genes, 8.4%	8.90E-10
GO:0009628	response to abiotic stimulus	20 out of 59 genes, 33.9%	1360 out of 24961 genes, 5.4%	8.90E-10
GO:0009409	response to cold	9 out of 59 genes, 15.3%	269 out of 24961 genes, 1.1%	6.20E-07
GO:0050896	response to stimulus	26 out of 59 genes, 44.1%	3689 out of 24961 genes, 14.8%	2.10E-06
GO:0009631	cold acclimation	4 out of 59 genes, 6.8%	21 out of 24961 genes, 0.1%	9.01E-06
GO:0006970	response to osmotic stress	9 out of 59 genes, 15.3%	425 out of 24961 genes, 1.7%	1.80E-05
GO:0042221	response to chemical stimulus	16 out of 59 genes, 27.1%	1892 out of 24961 genes, 7.6%	0.000122
GO:0009269	response to desiccation	3 out of 59 genes, 5.1%	19 out of 24961 genes, 0.1%	0.000303
GO:0009737	response to abscisic acid stimulus	7 out of 59 genes, 11.9%	340 out of 24961 genes, 1.4%	0.000303
GO:0050832	defense response to fungus	5 out of 59 genes, 8.5%	131 out of 24961 genes, 0.5%	0.000303
GO:0009408	response to heat	5 out of 59 genes, 8.5%	147 out of 24961 genes, 0.6%	0.000451
GO:0009620	response to fungus	5 out of 59 genes, 8.5%	167 out of 24961 genes, 0.7%	0.000759

b

	Term	Observed Frequency	Expected Frequency	p-value
GO:0009408	response to heat	8 out of 57 genes, 14%	147 out of 24961 genes, 0.6%	5.94E-07
GO:0009266	response to temperature stimulus	10 out of 57 genes, 17.5%	399 out of 24961 genes, 1.6%	3.42E-06
GO:0009628	response to abiotic stimulus	15 out of 57 genes, 26.3%	1360 out of 24961 genes, 5.4%	2.48E-05
GO:0042221	response to chemical stimulus	17 out of 57 genes, 29.8%	1892 out of 24961 genes, 7.6%	3.53E-05
GO:0050896	response to stimulus	24 out of 57 genes, 42.1%	3689 out of 24961 genes, 14.8%	3.53E-05
GO:0010033	response to organic substance	12 out of 57 genes, 21.1%	1148 out of 24961 genes, 4.6%	0.000408
GO:0009642	response to light intensity	4 out of 57 genes, 7%	78 out of 24961 genes, 0.3%	0.00136
GO:0009744	response to sucrose stimulus	3 out of 57 genes, 5.3%	36 out of 24961 genes, 0.1%	0.00298
GO:0034285	response to disaccharide stimulus	3 out of 57 genes, 5.3%	37 out of 24961 genes, 0.1%	0.00298

c



GO term analysis of genes showing increased expression in siliques of both *gso1-1 gso2-1* and *ale1-4* mutant backgrounds at the globular (**a**) and heart (**b**) stage of embryo development. The degree of overlap between these datasets is illustrated in (**c**).

Supplementary Figure 6 (Related to Figure 4)

a

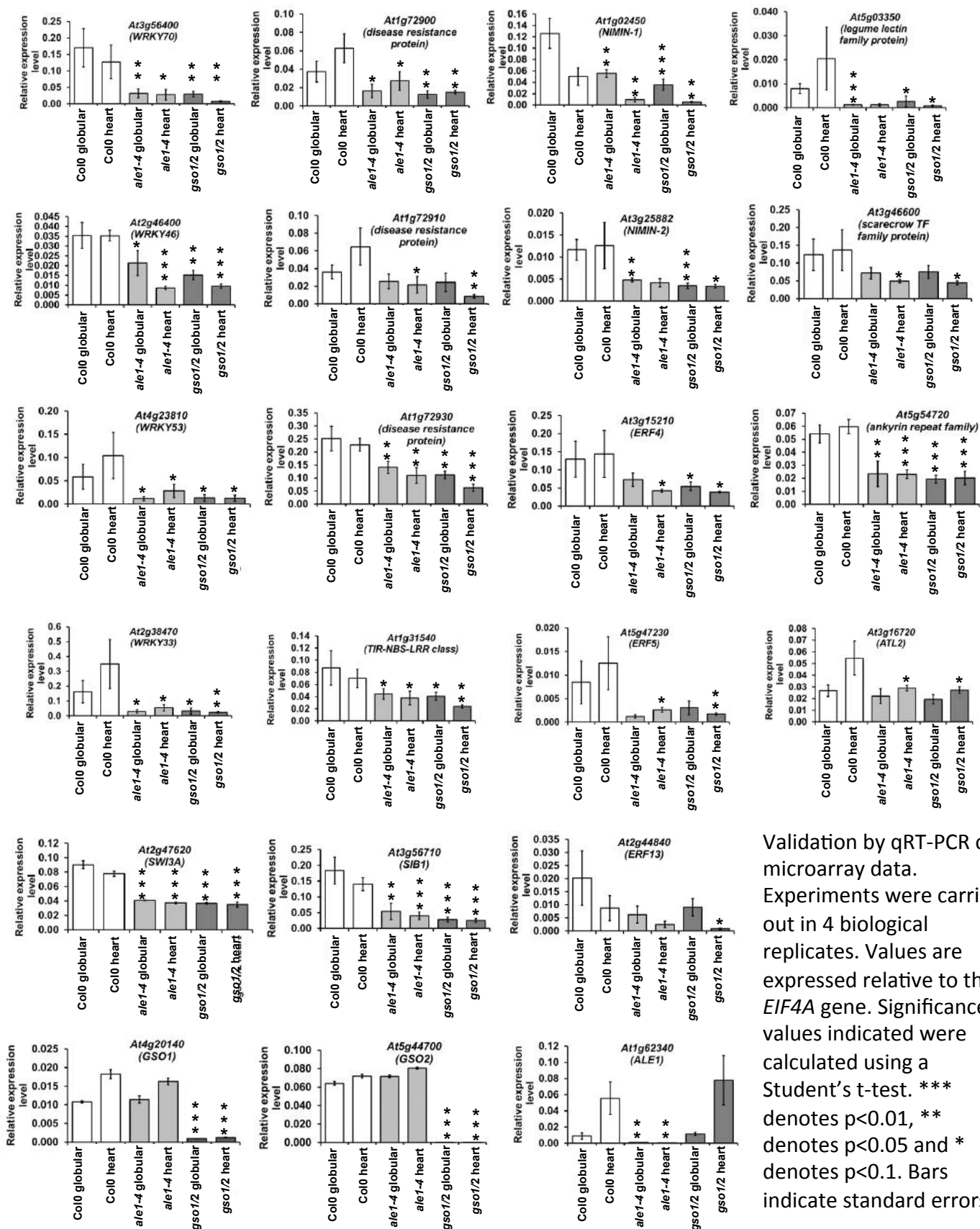
	Term	Observed Frequency	Expected Frequency	p-value
GO:0050896	response to stimulus	93 out of 205 genes, 45.4%	3689 out of 24961 genes, 14.8%	1.30E-22
GO:0010200	response to chitin	22 out of 205 genes, 10.7%	127 out of 24961 genes, 0.5%	3.71E-19
GO:0009743	response to carbohydrate stimulus	22 out of 205 genes, 10.7%	203 out of 24961 genes, 0.8%	2.23E-15
GO:0010033	response to organic substance	42 out of 205 genes, 20.5%	1148 out of 24961 genes, 4.6%	7.11E-14
GO:0006950	response to stress	55 out of 205 genes, 26.8%	2104 out of 24961 genes, 8.4%	8.53E-13
GO:0042221	response to chemical stimulus	52 out of 205 genes, 25.4%	1892 out of 24961 genes, 7.6%	8.53E-13
GO:0006952	defense response	32 out of 205 genes, 15.6%	747 out of 24961 genes, 3%	3.18E-12
GO:0002376	immune system process	21 out of 205 genes, 10.2%	292 out of 24961 genes, 1.2%	8.84E-12
GO:0008219	cell death	18 out of 205 genes, 8.8%	234 out of 24961 genes, 0.9%	1.46E-10
GO:0016265	death	18 out of 205 genes, 8.8%	234 out of 24961 genes, 0.9%	1.46E-10
GO:0045087	innate immune response	18 out of 205 genes, 8.8%	256 out of 24961 genes, 1%	5.38E-10
GO:0006955	immune response	18 out of 205 genes, 8.8%	260 out of 24961 genes, 1%	6.27E-10
GO:0012501	programmed cell death	15 out of 205 genes, 7.3%	197 out of 24961 genes, 0.8%	8.76E-09
GO:0006915	apoptosis	12 out of 205 genes, 5.9%	142 out of 24961 genes, 0.6%	1.79E-07
GO:0050789	regulation of biological process	60 out of 205 genes, 29.3%	3434 out of 24961 genes, 13.8%	2.36E-07
GO:0050794	regulation of cellular process	55 out of 205 genes, 26.8%	3050 out of 24961 genes, 12.2%	4.07E-07
GO:0065007	biological regulation	61 out of 205 genes, 29.8%	3661 out of 24961 genes, 14.7%	8.63E-07
GO:0009607	response to biotic stimulus	21 out of 205 genes, 10.2%	610 out of 24961 genes, 2.4%	1.46E-06
GO:0051707	response to other organism	20 out of 205 genes, 9.8%	558 out of 24961 genes, 2.2%	1.55E-06

b

	Term	Observed Frequency	Expected Frequency	p-value
GO:00102	response to chitin	31 out of 293 genes, 10.6%	127 out of 24961 genes, 0.5%	2.58E-26
GO:00508	response to stimulus	121 out of 293 genes, 41.3%	3689 out of 24961 genes, 14.8%	3.62E-25
GO:00097	response to carbohydrate stimulus	33 out of 293 genes, 11.3%	203 out of 24961 genes, 0.8%	1.29E-23
GO:00069	response to stress	75 out of 293 genes, 25.6%	2104 out of 24961 genes, 8.4%	6.65E-16
GO:00100	response to organic substance	53 out of 293 genes, 18.1%	1148 out of 24961 genes, 4.6%	4.69E-15
GO:00422	response to chemical stimulus	65 out of 293 genes, 22.2%	1892 out of 24961 genes, 7.6%	7.29E-13
GO:00096	response to wounding	18 out of 293 genes, 6.1%	145 out of 24961 genes, 0.6%	6.71E-11
GO:00023	immune system process	23 out of 293 genes, 7.8%	292 out of 24961 genes, 1.2%	2.42E-10
GO:00450	innate immune response	20 out of 293 genes, 6.8%	256 out of 24961 genes, 1%	6.71E-09
GO:00069	immune response	20 out of 293 genes, 6.8%	260 out of 24961 genes, 1%	7.81E-09
GO:00069	defense response	33 out of 293 genes, 11.3%	747 out of 24961 genes, 3%	9.82E-09
GO:00507	regulation of cellular process	75 out of 293 genes, 25.6%	3050 out of 24961 genes, 12.2%	2.31E-08
GO:00507	regulation of biological process	81 out of 293 genes, 27.6%	3434 out of 24961 genes, 13.8%	2.36E-08
GO:00650	biological regulation	84 out of 293 genes, 28.7%	3661 out of 24961 genes, 14.7%	3.48E-08
GO:00511	regulation of nitrogen compound metabolic process	51 out of 293 genes, 17.4%	1717 out of 24961 genes, 6.9%	5.94E-08
GO:00454	regulation of transcription	49 out of 293 genes, 16.7%	1621 out of 24961 genes, 6.5%	7.09E-08
GO:00096	response to abiotic stimulus	44 out of 293 genes, 15%	1360 out of 24961 genes, 5.4%	7.11E-08

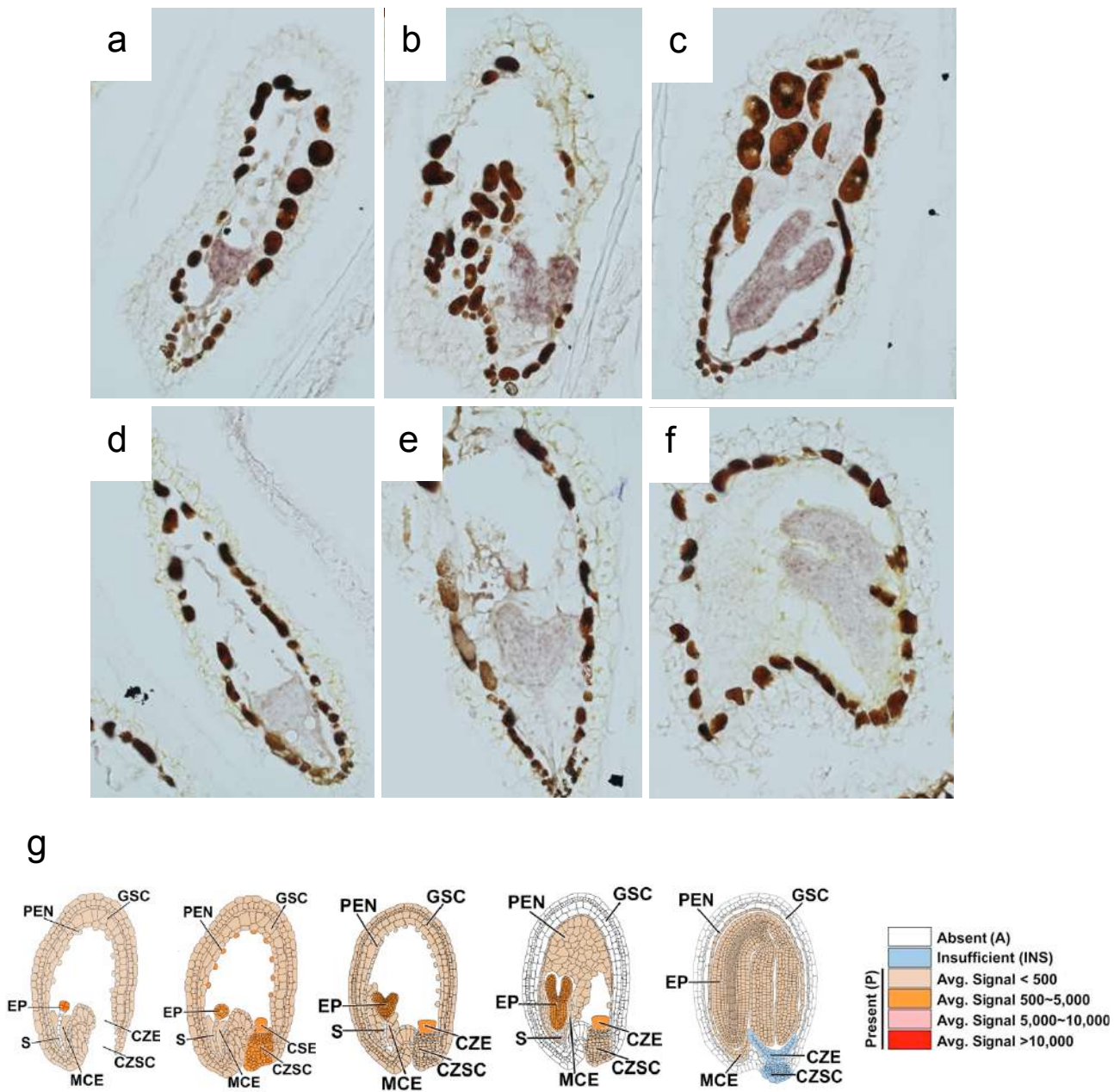
GO term analysis of genes showing reduced expression in siliques of both *gso1-1 gso2-1* and *ale1-4* mutant backgrounds at the globular **(a)** and heart **(b)** stage of embryo development.

Supplementary Figure 7 (Related to Figure 4)



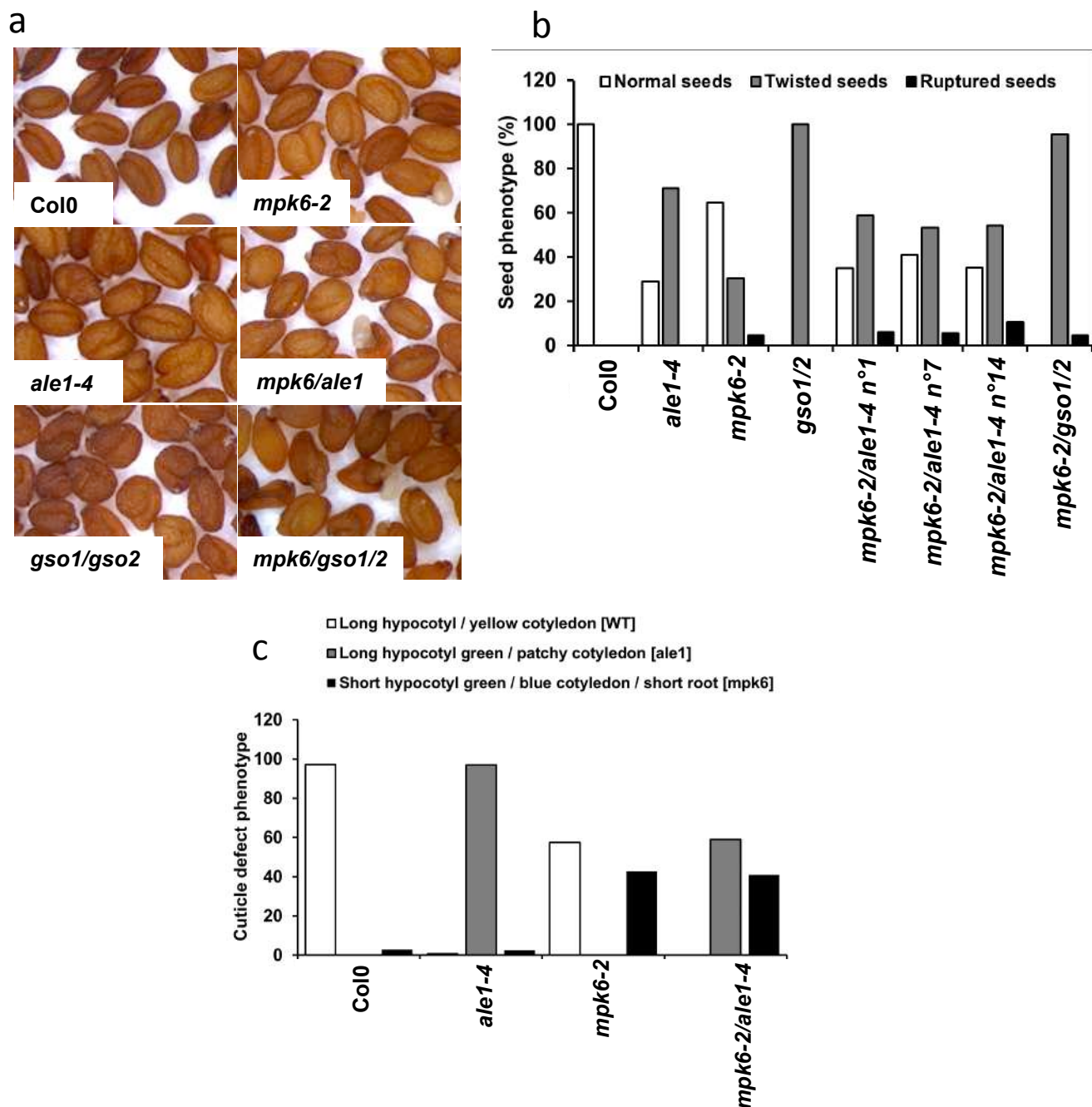
Validation by qRT-PCR of microarray data. Experiments were carried out in 4 biological replicates. Values are expressed relative to the *EIF4A* gene. Significance values indicated were calculated using a Student's t-test. *** denotes $p < 0.01$, ** denotes $p < 0.05$ and * denotes $p < 0.1$. Bars indicate standard errors.

Supplementary Figure 8 (Related to Figure 4)



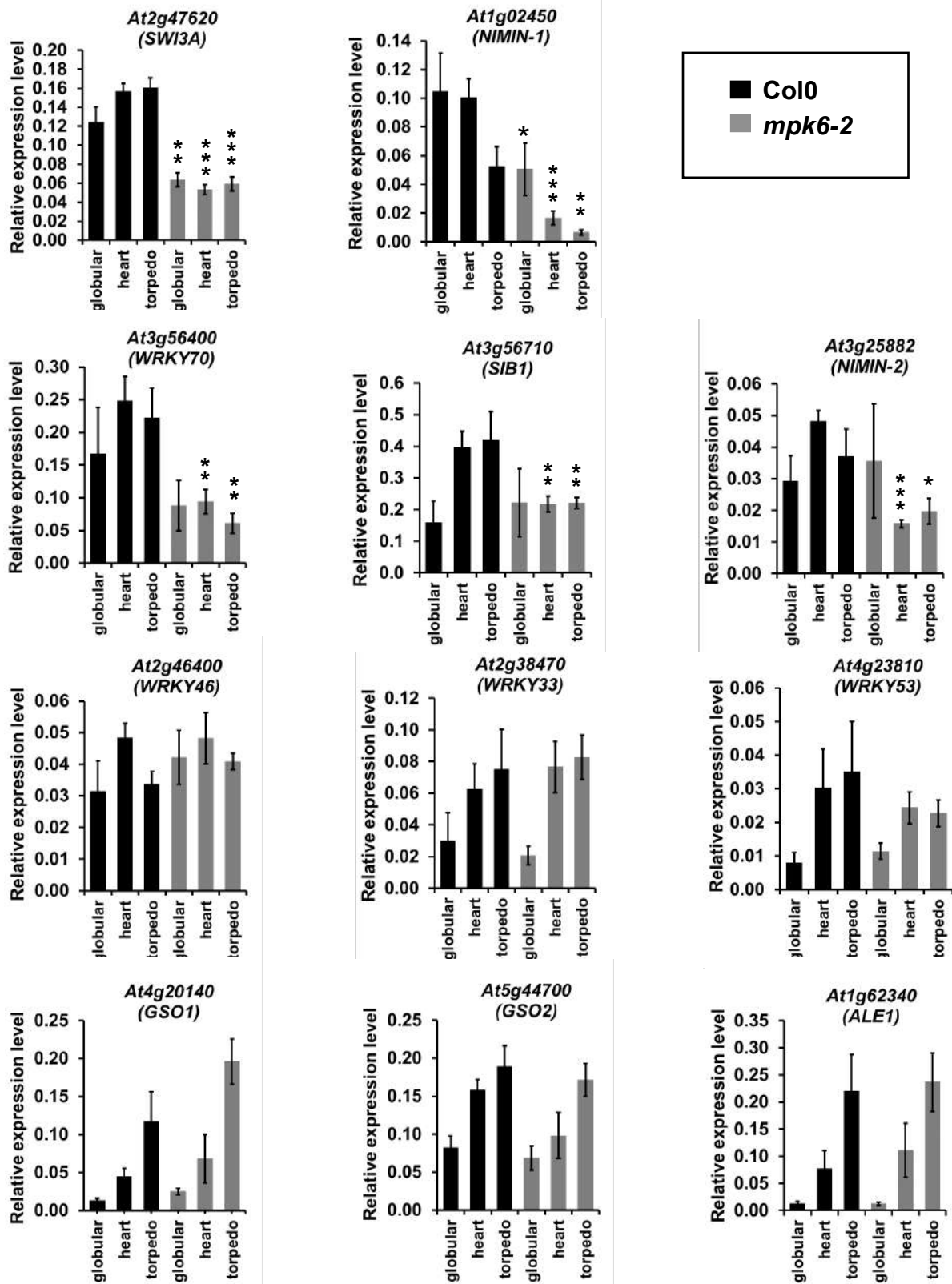
Analysis of the expression of *SWI3A* in wild-type (a-c), *gso1-1 gso2-1* (d-e) mutant embryos in seeds containing late globular/triangle (a,d), heart (b,e) and early torpedo (c,f) stage embryos. Expression data for *SWI3A* downloaded from the Seed Gene Network resource (<http://seedgenenetwork.net/>) is shown in (g).

Supplementary Figure 9 (Related to Figure 4)



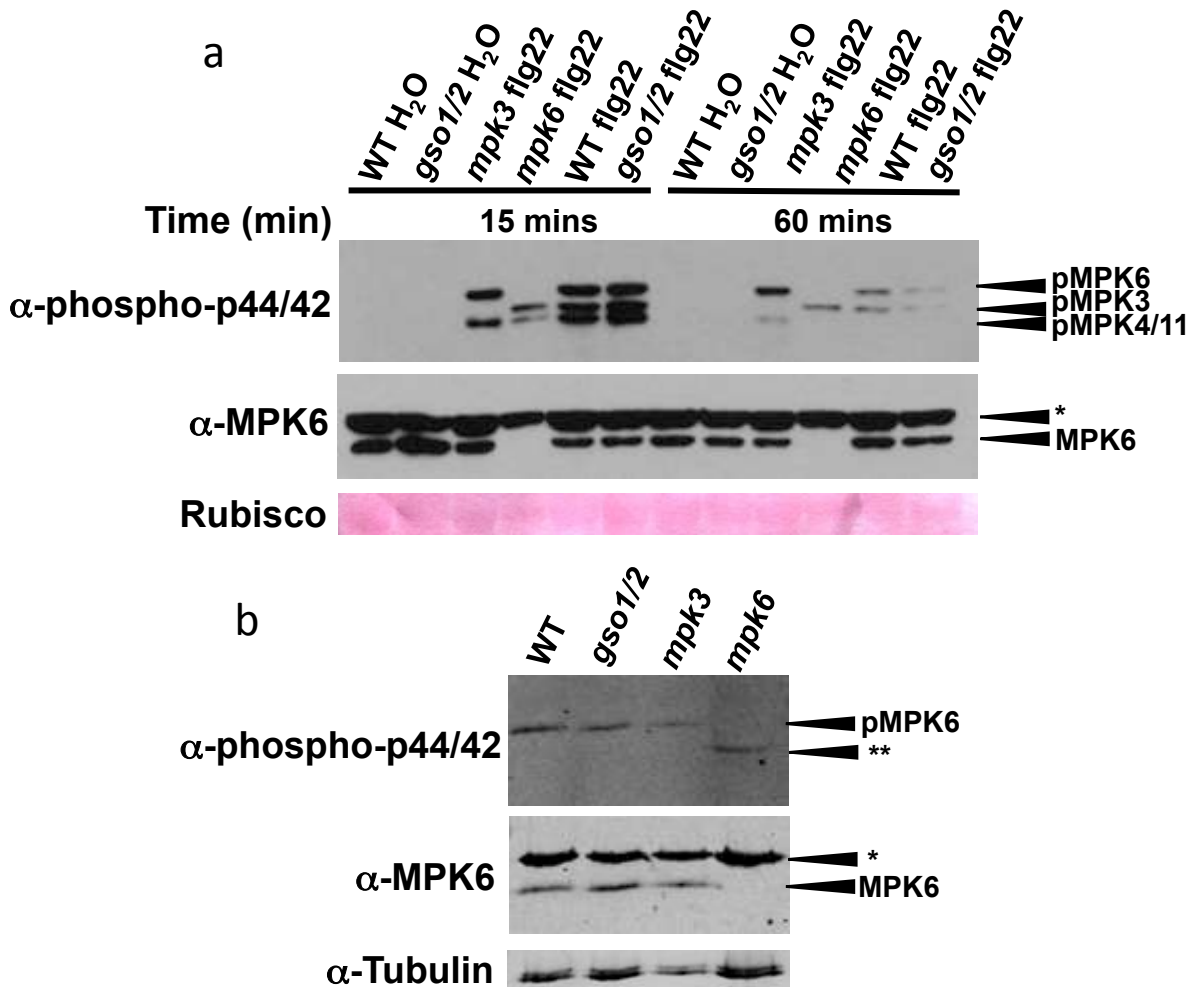
Non additivity of seed twisting (a-b) and seedling cuticle permeability (c) phenotypes between *mpk6-2* and *ale1-4* mutants and between *mpk6-2* and *gso1-1 gso2-1* double mutants. Populations of seeds (a) from single double and triple mutants were photographed, and seed phenotypes were quantified (b) (Col0 n = 196, *ale1-4* n=200, *mpk6-2* n=210, *gso1-1 gso2-1* n=111, *mpk6-2 ale1-4* (3 individuals) n = 211, 212 and 238, *mpk6-2 gso1-1 gso2-1* n=86). Etiolated seedlings were treated with toluidine blue and seedling and toluidine blue phenotypes were quantified (c). Results are representative of three independent experiments. Col0 n=389, *ale1-4* n=387, *mpk6-2* n=383, *mpk6-2 ale1-4* n=398. (Quantifications were not possible for *mpk6-2 gso1-1 gso2-1* triple mutants due to low seed set).

Supplementary Figure 10 (Related to Figure 4)



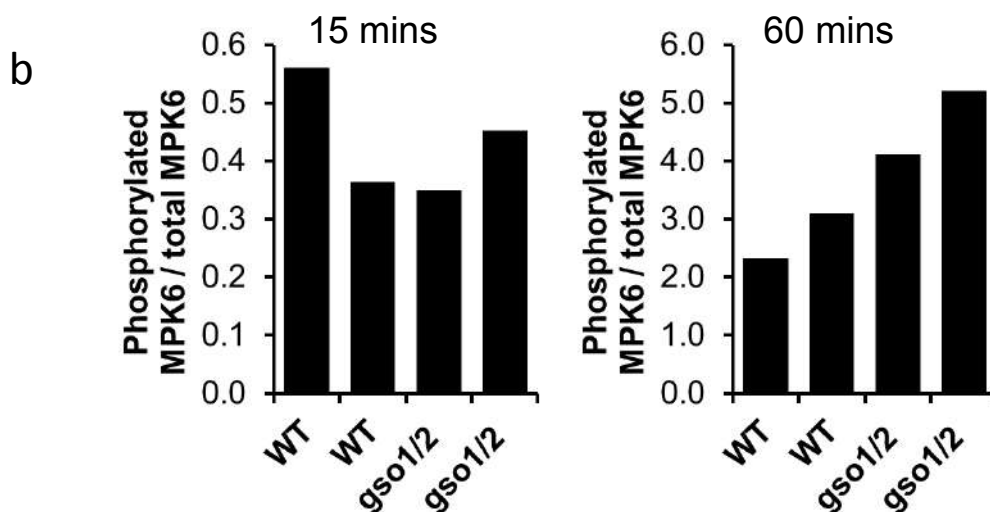
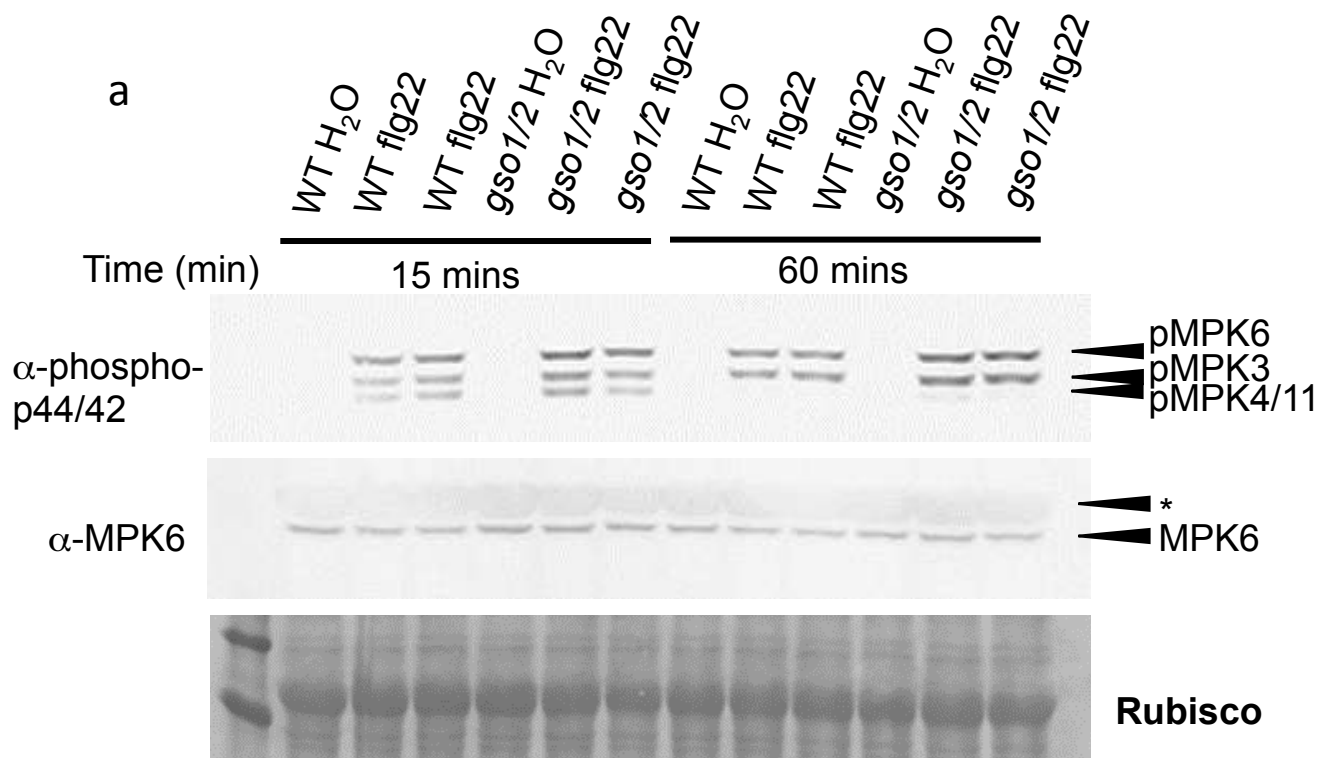
qRT-PCR analysis of the expression of candidate target genes in *mpk6-2* mutant siliques. Experiments were carried out in biological triplicate. Values are expressed relative to *EIF4* gene expression. Significance values indicated were calculated using a Student's t-test. *** denotes $p < 0.01$, ** denotes $p < 0.05$ and * denotes $p < 0.1$. Bars indicate standard errors.

Supplementary Figure 11 (Related to Figure 4)



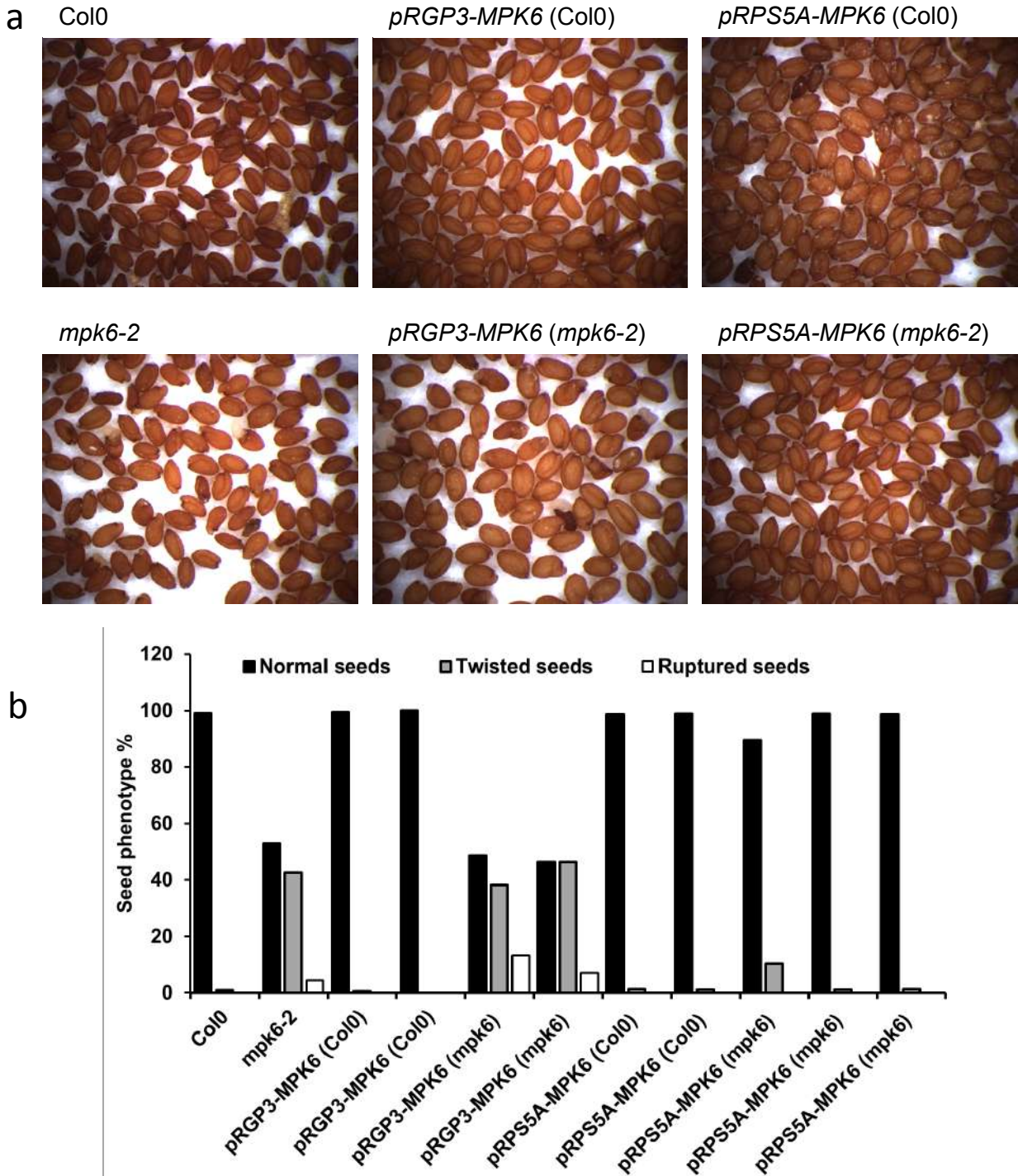
GSO1 and GSO2 mediate MPK6 phosphorylation in developing seeds. Western blot analysis of phosphorylated MPK proteins (upper panels) and then total MPK6 protein (middle panels). Loading controls (Ponceau S-stained Rubisco in (a) and Tubulin in (b)) are shown in lower panels. In each case the same blot is shown in the upper middle and lower panel. * Indicates a non specific band detected by the anti-MPK6 antibody. **(a)** Control experiment to test functionality of antibodies, using seedlings treated with water or with 100nM flg22 for either 15 or 60 minutes before protein extraction. The mutants *mpk3-1* and *mpk6-2* were included in flg22 treatments to confirm band identities. This experiment was independently repeated 3 times with similar results. **(b)** Analysis of proteins extracted from developing seeds at the globular-early torpedo stage. The mutants *mpk3-1* and *mpk6-2* were included to confirm band identification. No phosphorylation of MPKs other than MPK6 is observed in WT, *gso1-1 gso2-1* or *mpk3-1* seeds, but an additional band (**) is systematically observed in the *mpk6-2* mutant background. Quantification of this data is shown in Figure 4d. This experiment was repeated 4 times on independent biological samples, with similar results.

Supplementary Figure 12 (Related to Figure 4)



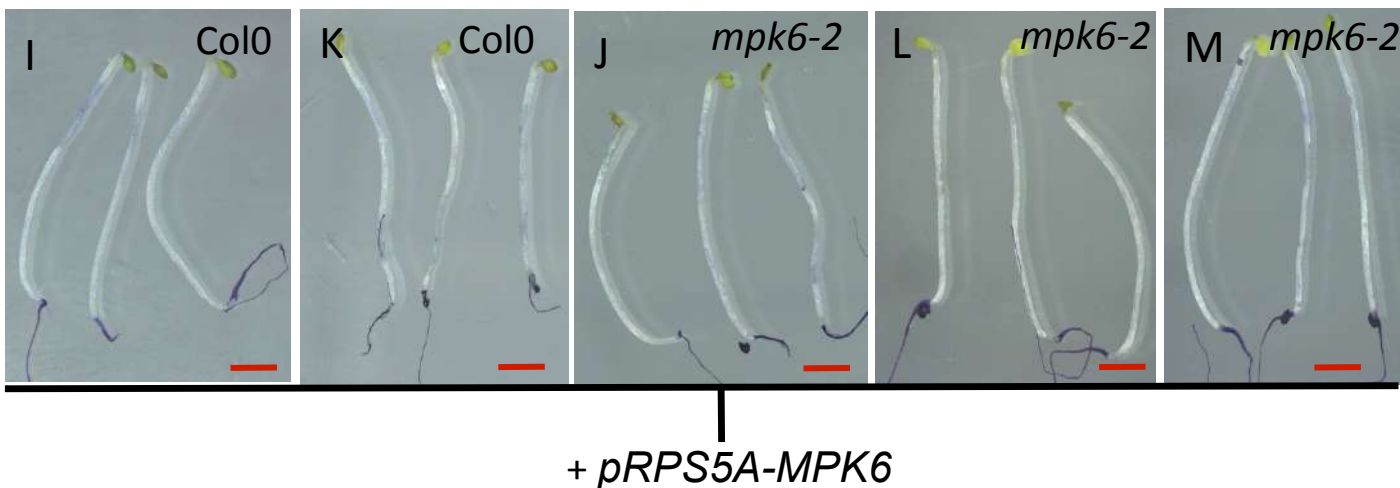
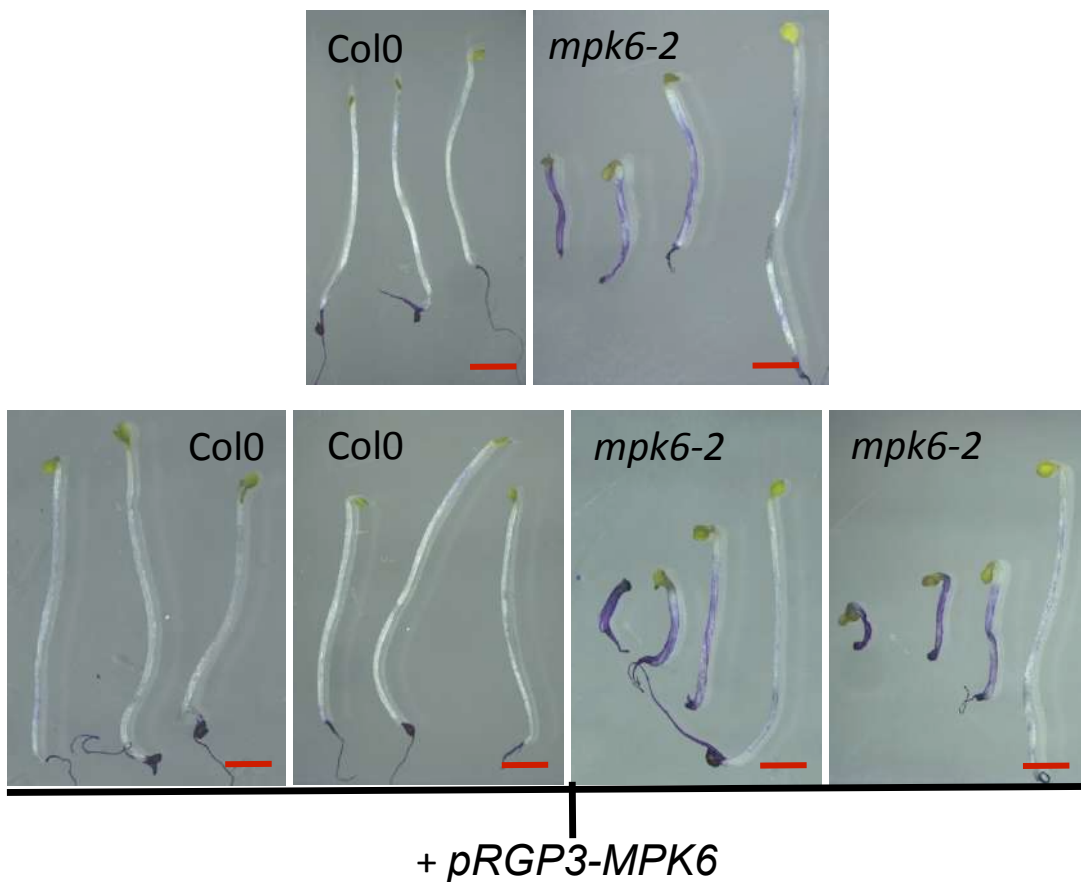
***gso1/gso2* mutant seedlings are not significantly affected in the MPK6 phosphorylation response to flg22.** (a) Western blot analysis of phosphorylated MPK proteins (upper panels) and then total MPK6 protein (middle panels). Loading control (Ponceau S-stained Rubisco) is shown in lower panels. In each case the same blot is shown in the upper middle and lower panel. * Indicates a non specific band detected by the anti-MPK6 antibody. Seedlings were treated with water or with 1nM flg22 for either 15 or 60 minutes before protein extraction. (b) relative degree of phosphorylation of MPK6 at 15 mins after treatment, and 1hr after treatment, for the flg22 treated replicates shown in (a).

Supplementary Figure 13 (Related to Figure 4)



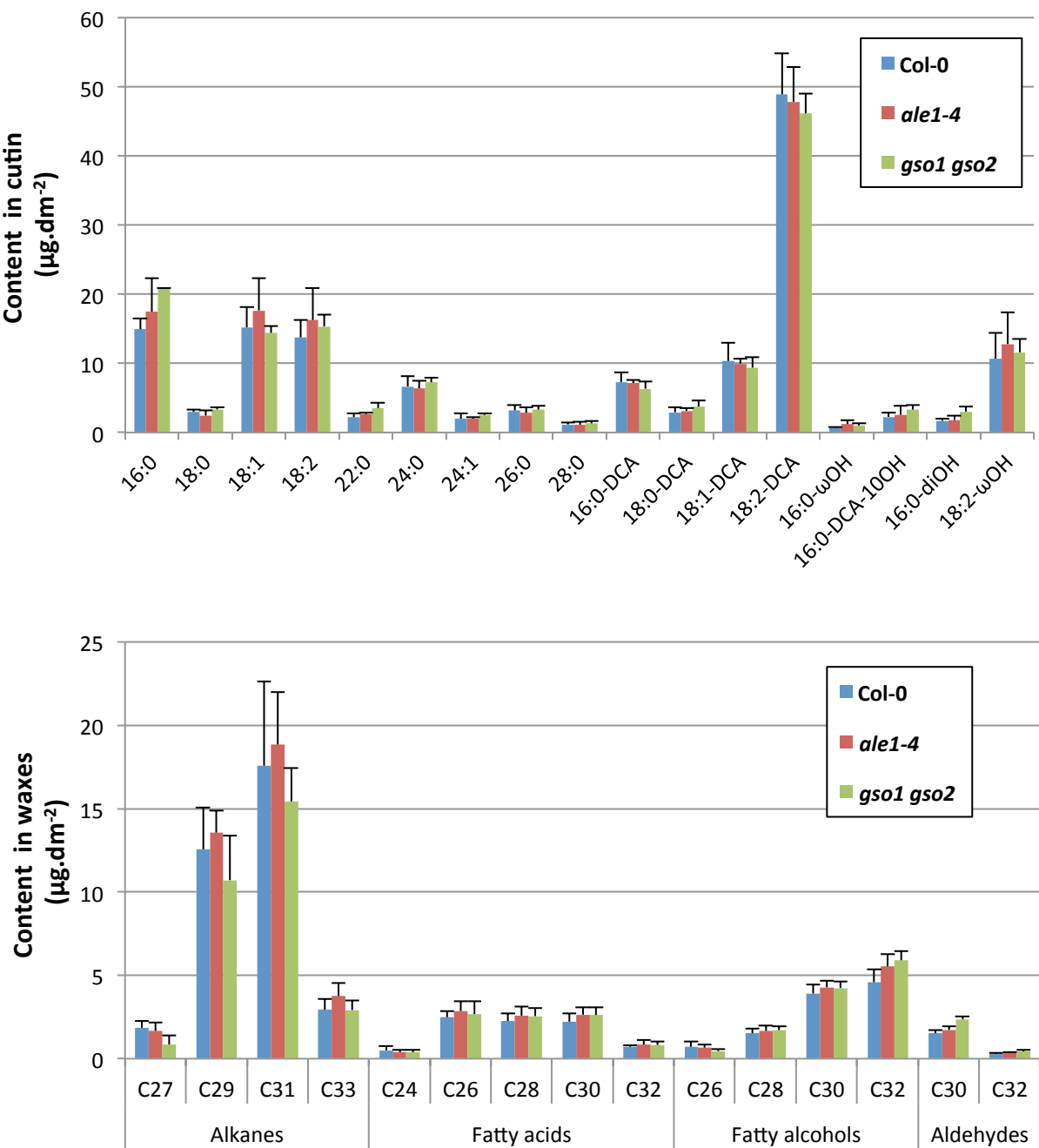
MPK6 is required in the embryo and testa, but not the endosperm (a) Representative phenotypes of seeds from wild-type (Col0), *mpk6-2*, and these backgrounds transformed with *pRGP3-MPK6* or *pRPS5A-MPK6*. **(b)** Quantification of seed phenotypes in the above material. Seeds from at least two independent transgenic lines have been quantified.

Supplementary Figure 14 (Related to Figure 4)



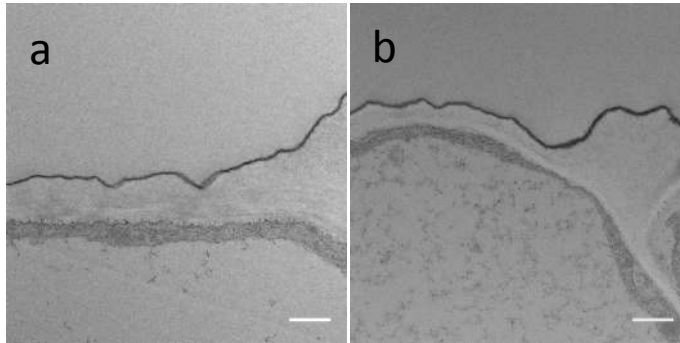
MPK6 activity is required in the embryo and testa, but not the endosperm, for normal seedling development (a) Representative phenotypes of toluidine blue-stained seedlings from wild-type (Col0), *mpk6-2*, and these backgrounds transformed with *pRGP3-MPK6* or *pRPS5A-MPK6*. Lines correspond to those described in Supplementary Figure 13b. Scale bar = 2mm

Supplementary Figure 15 (Related to Figure 5)

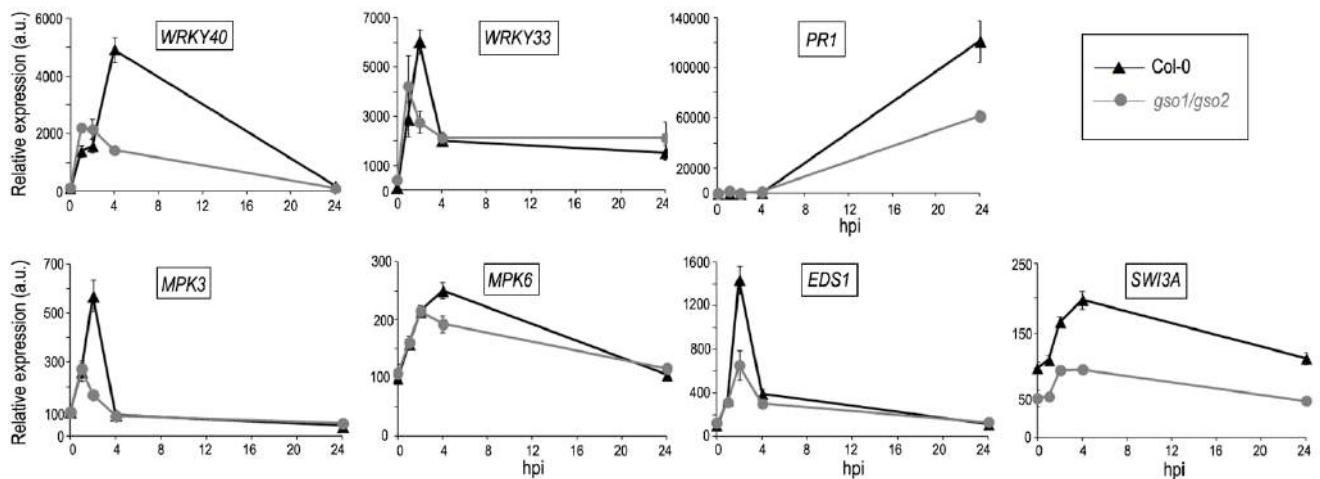


Cuticle analysis of mature leaves from wild-type, *ale1-4* and *gso1-1 gso2-1* plants. (a) Cutin composition and content of rosette leaves. Each constituent is designated by carbon chain-length and unsaturation, and is labeled by chemical class along the x-axis. Mean values are shown in $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-2} \pm \text{SD}$ of four replicates. **(b)** Cuticular wax composition and content of rosette leaves. Each wax constituent is designated by carbon chain-length and is labeled by chemical class along the x-axis. Mean values are shown in $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-2} \pm \text{SD}$ of four replicates. No significant differences are observed

Supplementary Figure 16 (Related to Figure 5)



c



(a) and **(b)** Leaf cuticle continuity in leaves of *Col0* and *gso1-1 gso2-1* mutant plants respectively. **(c)** Expression profiles of the indicated genes in *Arabidopsis Col-0* (▲) and *gso1-1 gso2-1* (●) lines 0, 1, 2, 4 and 24 hours post-inoculation (hpi) with *Pst AvrRpm1* (5×10^7 cfu/ml). Expression values of the individual genes were normalized using *SAND* family genes as internal standards and related to the value of *Col-0* at time 0, which is set at 100%. Mean and SEM values were calculated from 3 experiments with 4 replicates.

Supplemental Table 1

Down in a1o1	Down in a1o1 heart	Down in g1o2/2 glob	Down in g1o2/2 heart	Down in a1o1 at both stages	Down in g1o2/2 at both stages	Down at global stage in both genotypes	Down at heart stage in both genotypes	Up in a1o1 glob	Up in a1o1 heart	Up in g1o2/2 glob	Up in g1o2/2 heart	Up in a1o1 at both stages	Up in g1o2/2 at both stages	Up at global stage in both genotypes	Up at heart stage in both genotypes
AT1G01720	AT1G01250	AT1G01250	AT1G01250	AT1G01720	AT1G01250	AT1G01720	AT1G01250	AT1G01120	AT1G01120	AT1G01160	AT1G01120	AT1G02640	AT1G02640	AT1G01120	AT1G07400
AT1G02450	AT1G01600	AT1G01600	AT1G02400	AT1G02450	AT1G02450	AT1G02450	AT1G02450	AT1G01470	AT1G04380	AT1G01180	AT1G05300	AT1G30250	AT1G05300	AT1G01470	AT1G07470
AT1G03220	AT1G01720	AT1G01720	AT1G02450	AT1G04770	AT1G02820	AT1G05575	AT1G02820	AT1G02600	AT1G04645	AT1G01430	AT1G07400	AT1G34844	AT1G07400	AT1G09350	AT1G11080
AT1G04240	AT1G02450	AT1G02450	AT1G02820	AT1G05575	AT1G05100	AT1G07135	AT1G04770	AT1G04120	AT1G04660	AT1G01470	AT1G07470	AT1G52690	AT1G01970	AT1G15100	AT1G11260
AT1G04660	AT1G02820	AT1G02820	AT1G04770	AT1G06670	AT1G05575	AT1G07430	AT1G05100	AT1G04130	AT1G08220	AT1G02610	AT1G10970	AT1G021554	AT1G02330	AT1G16850	AT1G14280
AT1G04770	AT1G03870	AT1G05100	AT1G05100	AT1G06630	AT1G07135	AT1G06850	AT1G05575	AT1G09250	AT1G05340	AT1G02640	AT1G11080	AT1G204570	AT1G129455	AT1G02440	AT1G28330
AT1G05575	AT1G04040	AT1G05575	AT1G05575	AT1G07135	AT1G07430	AT1G11050	AT1G06830	AT1G09350	AT1G06350	AT1G02890	AT1G11260	AT1G218193	AT1G03250	AT1G23030	AT1G29460
AT1G06170	AT1G04770	AT1G06630	AT1G06630	AT1G07430	AT1G07490	AT1G12610	AT1G07135	AT1G01510	AT1G07400	AT1G04380	AT1G14280	AT1G20560	AT1G31173	AT1G30250	AT1G30250
AT1G06830	AT1G05100	AT1G07135	AT1G07135	AT1G1050	AT1G01065	AT1G13245	AT1G07430	AT1G16850	AT1G07470	AT1G05260	AT1G21910	AT1G26150	AT1G34844	AT1G34844	AT1G31173
AT1G07135	AT1G05575	AT1G07430	AT1G07430	AT1G12610	AT1G11050	AT1G14370	AT1G07490	AT1G17830	AT1G08230	AT1G05300	AT1G23030	AT1G22805	AT1G04740	AT1G35310	AT1G34844
AT1G07430	AT1G06540	AT1G07490	AT1G07430	AT1G12610	AT1G12610	AT1G17147	AT1G10657	AT1G17940	AT1G08560	AT1G05560	AT1G26762	AT1G32605	AT1G159860	AT1G151090	AT1G15280
AT1G08260	AT1G06770	AT1G08230	AT1G07490	AT1G16620	AT1G13245	AT1G17610	AT1G11050	AT1G17960	AT1G08955	AT1G06475	AT1G28330	AT1G231770	AT1G06960	AT1G161100	AT1G159860
AT1G08560	AT1G06830	AT1G08560	AT1G0657	AT1G1747	AT1G14480	AT1G19020	AT1G11210	AT1G20440	AT1G09155	AT1G07400	AT1G29420	AT1G243540	AT1G061100	AT1G166300	AT1G203100
AT1G11050	AT1G07050	AT1G10657	AT1G11050	AT1G19180	AT1G167147	AT1G19180	AT1G12610	AT1G20450	AT1G10070	AT1G06710	AT1G29430	AT1G306640	AT1G1672430	AT1G170800	AT1G203800
AT1G12610	AT1G07135	AT1G11050	AT1G11210	AT1G19770	AT1G19020	AT1G19770	AT1G13245	AT1G21910	AT1G11080	AT1G06790	AT1G29440	AT1G306670	AT1G216660	AT1G217300	AT1G205800
AT1G13245	AT1G07430	AT1G12610	AT1G12610	AT1G19180	AT1G19860	AT1G19860	AT1G13420	AT1G20330	AT1G11260	AT1G08340	AT1G29450	AT1G308685	AT1G202950	AT1G216740	AT1G26150
AT1G13420	AT1G07490	AT1G13420	AT1G13420	AT1G22810	AT1G119960	AT1G21100	AT1G14250	AT1G21915	AT1G12080	AT1G08985	AT1G29465	AT1G312510	AT1G229500	AT1G205660	AT1G295600
AT1G14370	AT1G07490	AT1G14370	AT1G14370	AT1G22810	AT1G119960	AT1G21100	AT1G14250	AT1G21915	AT1G12080	AT1G08985	AT1G29465	AT1G312510	AT1G229500	AT1G205660	AT1G295600
AT1G14880	AT1G09750	AT1G14480	AT1G13650	AT1G23710	AT1G20510	AT1G21110	AT1G14480	AT1G30250	AT1G13607	AT1G09155	AT1G29490	AT1G312580	AT1G203390	AT1G223290	AT1G326050
AT1G14880	AT1G10657	AT1G14630	AT1G14250	AT1G25390	AT1G20823	AT1G21130	AT1G14480	AT1G34844	AT1G13420	AT1G09350	AT1G29510	AT1G319680	AT1G3236050	AT1G227500	AT1G237170
AT1G15550	AT1G11050	AT1G15040	AT1G14480	AT1G25400	AT1G21210	AT1G22180	AT1G16730	AT1G35310	AT1G15757	AT1G09380	AT1G30250	AT1G322600	AT1G237170	AT1G29440	AT1G303830
AT1G16620	AT1G11210	AT1G17147	AT1G14540	AT1G27730	AT1G21110	AT1G22910	AT1G17147	AT1G47510	AT1G19370	AT1G10190	AT1G31173	AT1G324420	AT1G242540	AT1G3236050	AT1G305640
AT1G17147	AT1G12610	AT1G167160	AT1G16490	AT1G28370	AT1G21130	AT1G23710	AT1G17380	AT1G48580	AT1G19530	AT1G10717	AT1G34844	AT1G329240	AT1G267440	AT1G237170	AT1G306070
AT1G17610	AT1G13245	AT1G1619020	AT1G16730	AT1G28480	AT1G21590	AT1G26390	AT1G18300	AT1G51090	AT1G19540	AT1G10970	AT1G47400	AT1G355500	AT1G305640	AT1G237180	AT1G306686
AT1G19020	AT1G13420	AT1G19180	AT1G17050	AT1G15340	AT1G22190	AT1G25400	AT1G19180	AT1G51490	AT1G20440	AT1G11590	AT1G52890	AT1G359220	AT1G306070	AT1G240330	AT1G308970
AT1G19180	AT1G13650	AT1G19500	AT1G17147	AT1G13580	AT1G22810	AT1G27730	AT1G19210	AT1G52560	AT1G22890	AT1G13607	AT1G69860	AT1G404223	AT1G308970	AT1G242540	AT1G311340
AT1G19770	AT1G14250	AT1G191770	AT1G17380	AT1G33600	AT1G23710	AT1G28370	AT1G19670	AT1G52690	AT1G22990	AT1G14880	AT1G60960	AT1G402860	AT1G311340	AT1G247440	AT1G316000
AT1G19960	AT1G14480	AT1G191840	AT1G17950	AT1G34095	AT1G26390	AT1G31540	AT1G19770	AT1G61100	AT1G24212	AT1G15010	AT1G61100	AT1G423690	AT1G312580	AT1G304010	AT1G312580
AT1G20823	AT1G14518	AT1G191890	AT1G18300	AT1G35210	AT1G26400	AT1G31580	AT1G20510	AT1G63030	AT1G26796	AT1G15757	AT1G67910	AT1G424960	AT1G319680	AT1G305640	AT1G319680
AT1G20960	AT1G14840	AT1G191960	AT1G19020	AT1G36170	AT1G25550	AT1G33600	AT1G20823	AT1G64450	AT1G26879	AT1G161400	AT1G27430	AT1G427450	AT1G322600	AT1G306070	AT1G323600
AT1G20970	AT1G16410	AT1G205190	AT1G19180	AT1G37130	AT1G27730	AT1G34095	AT1G22190	AT1G64460	AT1G26799	AT1G16850	AT1G206120	AT1G433770	AT1G324420	AT1G308970	AT1G324420
AT1G21000	AT1G16620	AT1G20823	AT1G21110	AT1G33510	AT1G27770	AT1G33510	AT1G22810	AT1G68500	AT1G27220	AT1G13500	AT1G205380	AT1G436130	AT1G323240	AT1G321260	AT1G324500
AT1G21000	AT1G16620	AT1G20823	AT1G21110	AT1G33510	AT1G27770	AT1G33510	AT1G22810	AT1G68500	AT1G27220	AT1G13500	AT1G205380	AT1G436130	AT1G323240	AT1G321260	AT1G324500
AT1G21110	AT1G17147	AT1G21110	AT1G191770	AT1G54540	AT1G29690	AT1G37130	AT1G25390	AT1G70800	AT1G27250	AT1G20440	AT1G20560	AT1G32360	AT1G325210	AT1G322600	AT1G329240
AT1G21130	AT1G17380	AT1G21130	AT1G19960	AT1G55960	AT1G31540	AT1G25380	AT1G25400	AT1G71000	AT1G28330	AT1G21790	AT1G27330	AT1G523420	AT1G355500	AT1G324420	AT1G329370
AT1G21260	AT1G18300	AT1G21260	AT1G19180	AT1G58848	AT1G32640	AT1G52890	AT1G25550	AT1G74990	AT1G29460	AT1G21970	AT1G26150	AT1G524540	AT1G356000	AT1G327980	AT1G347180
AT1G21290	AT1G18740	AT1G21850	AT1G20510	AT1G60190	AT1G32920	AT1G53163	AT1G27730	AT1G209120	AT1G30250	AT1G22360	AT1G228570	AT1G535935	AT1G362590	AT1G329240	AT1G347340
AT1G22280	AT1G19180	AT1G22290	AT1G20823	AT1G61340	AT1G33600	AT1G55450	AT1G27770	AT1G27770	AT1G30820	AT1G22400	AT1G229500	AT1G530950	AT1G408950	AT1G50970	AT1G34780
AT1G22480	AT1G19210	AT1G22810	AT1G21100	AT1G62340	AT1G33510	AT1G56520	AT1G28370	AT1G204570	AT1G31713	AT1G22440	AT1G203930	AT1G52640	AT1G412690	AT1G365500	AT1G355500
AT1G22530	AT1G19640	AT1G23710	AT1G21110	AT1G63360	AT1G33710	AT1G68848	AT1G28380	AT1G217300	AT1G33055	AT1G22480	AT1G231730	AT1G535710	AT1G416000	AT1G362620	AT1G362950
AT1G22810	AT1G19670	AT1G25390	AT1G21130	AT1G66090	AT1G47485	AT1G60190	AT1G30135	AT1G217840	AT1G33770	AT1G22882	AT1G236050	AT1G557520	AT1G424960	AT1G369940	AT1G408950
AT1G23710	AT1G19770	AT1G25400	AT1G21390	AT1G66390	AT1G48100	AT1G61340	AT1G31540	AT1G218193	AT1G34250	AT1G22890	AT1G236830	AT1G560630	AT1G427450	AT1G362720	AT1G411800
AT1G24764	AT1G20470	AT1G25550	AT1G21890	AT1G67105	AT1G52890	AT1G66090	AT1G32640	AT1G18969	AT1G34844	AT1G22300	AT1G237170	AT1G433020	AT1G403930	AT1G416000	AT1G416000
AT1G25390	AT1G20510	AT1G26945	AT1G22070	AT1G67290	AT1G53170	AT1G66390	AT1G323720	AT1G20560	AT1G30660	AT1G23130	AT1G242540	AT1G433420	AT1G404090	AT1G423140	AT1G423140
AT1G25400	AT1G20823	AT1G27360	AT1G22190	AT1G67470	AT1G55450	AT1G66725	AT1G32920	AT1G23290	AT1G36340	AT1G23980	AT1G248270	AT1G437240	AT1G408950	AT1G424960	AT1G424960
AT1G27730	AT1G22190	AT1G27730	AT1G22810	AT1G68238	AT1G56510	AT1G66740	AT1G32928	AT1G26150	AT1G34366	AT1G24710	AT1G243820	AT1G433840	AT1G424960	AT1G427450	AT1G427450
AT1G28370	AT1G22810	AT1G27770	AT1G23710	AT1G69890	AT1G68190	AT1G68238	AT1G33600	AT1G27228	AT1G43667	AT1G62412	AT1G294740	AT1G506530	AT1G425810	AT1G433770	AT1G433770
AT1G28490	AT1G23710	AT1G28270	AT1G25390	AT1G69890	AT1G68190	AT1G68238	AT1G33600	AT1G27228	AT1G43667	AT1G62412	AT1G294740	AT1G506530	AT1G425810	AT1G433770	AT1G433770
AT1G29440	AT1G25400	AT1G29140	AT1G25550	AT1G72900	AT1G64390	AT1G69940	AT1G49500	AT1G29440	AT1G47655	AT1G26799	AT1G306640	AT1G5619190	AT1G437320	AT1G503840	AT1G503840
AT1G29450	AT1G25550	AT1G26960	AT1G27440	AT1G29190	AT1G64780	AT1G70270	AT1G49780	AT1G30650	AT1G47780	AT1G27380	AT1G306070	AT1G502250	AT1G438410	AT1G501470	AT1G501470
AT1G29500	AT1G27330	AT1G31320	AT1G27730	AT1G72920	AT1G65490	AT1G72900	AT1G51700	AT1G37170	AT1G48195	AT1G27440	AT1G306686	AT1G5020670	AT1G506530	AT1G514120	AT1G514120
AT1G29510	AT1G27770	AT1G31490	AT1G27770	AT1G72930	AT1G66090	AT1G72910	AT1G51820	AT1G37180	AT1G49000	AT1G28650	AT1G308970	AT1G502240	AT1G515960	AT1G519120	AT1G519120
AT1G30690	AT1G28370	AT1G31540	AT1G28370	AT1G72940	AT1G66390	AT1G72920	AT1G52070	AT1G40230	AT1G49130	AT1G29395	AT1G309440	AT1G502450	AT1G519190	AT1G519190	AT1G519190
AT1G31150	AT1G28380	AT1G31580	AT1G28380	AT1G77760	AT1G66400	AT1G72930	AT1G52890	AT1G40330	AT1G49210	AT1G29465	AT1G31140	AT1G503935	AT1G5025240	AT1G502520	AT1G502520
AT1G31540	AT1G28480	AT1G32640	AT1G29690	AT1G78410	AT1G67470	AT1G72940	AT1G55450	AT1G42530	AT1G51440	AT1G30250	AT1G311600	AT1G5047450	AT1G5025450	AT1G502670	AT1G502670
AT1G31580	AT1G30135	AT1G32920	AT1G29120	AT1G79770	AT1G68238	AT1G73870	AT1G66510	AT1G25440	AT1G52690	AT1G31713	AT1G312580	AT1G5051440	AT1G348380	AT1G3621170	AT1G3621170
AT1G32530	AT1G31540	AT1G33110	AT1G30135	AT1G8084											

Down in ale1 glob	Down in ale1 heart	Down in gso1/2 glob	Down in gso1/2 heart	Down in ale1 at both stages	Down in gso1/2 at both stages	Down at global stage in both genotypes	Down at heart stage in both genotypes	Up in ale1 glob	Up in ale1 heart	Up in gso1/2 glob	Up in gso1/2 heart	Up in ale1 at both stages	Up in gso1/2 at both stages	Up at global stage in both genotypes	Up at heart stage in both genotypes
AT1G70270	AT1G66390	AT1G68238	AT1G68840	AT3G20865	AT2G41100	AT3G02800	AT2G22200	AT4G27450	AT2G03190	AT1G62340	AT5G19120				
AT1G71220	AT1G66400	AT1G68350	AT1G68490	AT3G21150	AT2G42760	AT3G03430	AT2G22430	AT4G30280	AT2G04000	AT1G63030	AT5G19190				
AT1G72900	AT1G66540	AT1G68610	AT1G68970	AT3G22231	AT2G44840	AT3G03850	AT2G22500	AT4G33070	AT2G04025	AT1G64370	AT5G20250				
AT1G72100	AT1G67105	AT1G68825	AT1G68980	AT3G24520	AT2G46400	AT3G04210	AT2G22540	AT4G33560	AT2G04320	AT1G66460	AT5G20670				
AT1G72900	AT1G67290	AT1G68840	AT1G72520	AT3G26860	AT2G47060	AT3G05930	AT2G22880	AT4G34770	AT2G04570	AT1G66855	AT5G21170				
AT1G72930	AT1G67470	AT1G689120	AT1G72910	AT3G28120	AT2G47590	AT3G07850	AT2G23840	AT4G35160	AT2G05380	AT1G67265	AT5G24530				
AT1G72940	AT1G67970	AT1G69598	AT1G72910	AT3G28780	AT2G47600	AT3G09870	AT2G24600	AT4G36010	AT2G05440	AT1G67775	AT5G25240				
AT1G73870	AT1G68238	AT1G69940	AT1G72920	AT3G28810	AT2G47610	AT3G13227	AT2G25510	AT4G368130	AT2G05520	AT1G67820	AT5G25450				
AT1G75020	AT1G68725	AT1G70270	AT1G72930	AT3G28930	AT2G47620	AT3G14400	AT2G25735	AT4G368430	AT2G05530	AT1G68390	AT5G27780				
AT1G75040	AT1G69490	AT1G72110	AT1G72940	AT3G28980	AT2G47640	AT3G15210	AT2G26930	AT4G37240	AT2G05540	AT1G68570	AT5G35935				
AT1G76960	AT1G69795	AT1G72500	AT1G73325	AT3G29000	AT3G02380	AT3G15500	AT2G27395	AT4G37400	AT2G05960	AT1G68725	AT5G43270				
AT1G74750	AT1G68980	AT1G72900	AT1G73560	AT3G28644	AT3G04210	AT3G16720	AT2G27420	AT4G38410	AT2G12066	AT1G69520	AT5G44680				
AT1G77760	AT1G69940	AT1G72910	AT1G73540	AT3G04420	AT3G04640	AT3G19030	AT2G29090	AT4G38320	AT2G12465	AT1G69572	AT5G45950				
AT1G70210	AT1G70270	AT1G72920	AT1G73630	AT3G04440	AT3G07850	AT3G20220	AT2G29170	AT4G38330	AT2G12475	AT1G69828	AT5G47450				
AT1G78140	AT1G70700	AT1G72930	AT1G73870	AT3G04455	AT3G09870	AT3G20865	AT2G29310	AT5G06630	AT2G14365	AT1G70090	AT5G51440				
AT1G79770	AT1G71030	AT1G72940	AT1G74930	AT3G04630	AT3G10930	AT3G21150	AT2G30020	AT5G15960	AT2G14378	AT1G70800	AT5G52640				
AT1G79830	AT1G72610	AT1G73500	AT1G75400	AT3G04680	AT3G14040	AT3G21890	AT2G30300	AT5G19190	AT2G15325	AT1G70990	AT5G53710				
AT1G80840	AT1G72900	AT1G73870	AT1G75930	AT3G045640	AT3G14210	AT3G22060	AT2G31380	AT5G20150	AT2G15960	AT1G71360	AT5G57550				
AT1G80920	AT1G72910	AT1G74930	AT1G76650	AT3G046600	AT3G15210	AT3G22231	AT2G32020	AT5G23320	AT2G17723	AT1G72430	AT5G63225				
AT2G01021	AT1G72920	AT1G75040	AT1G77400	AT3G050770	AT3G16720	AT3G22235	AT2G32510	AT5G25240	AT2G17750	AT1G72510	AT5G64510				
AT2G01340	AT1G72930	AT1G76360	AT1G77760	AT3G050930	AT3G17120	AT3G23030	AT2G38210	AT5G25450	AT2G18193	AT1G72580	AT5G67390				
AT2G01410	AT1G72940	AT1G76650	AT1G78070	AT3G053810	AT3G17609	AT3G24520	AT2G38470	AT5G34790	AT2G18550	AT1G74020					
AT2G02140	AT1G73010	AT1G77400	AT1G78410	AT3G055980	AT3G19030	AT3G25882	AT2G38790	AT5G34800	AT2G18700	AT1G74670					
AT2G03240	AT1G73325	AT1G77760	AT1G79770	AT3G056290	AT3G21150	AT3G26860	AT2G40000	AT5G34830	AT2G19796	AT1G75250					
AT2G05520	AT1G73500	AT1G77890	AT1G80050	AT3G056400	AT3G22231	AT3G27690	AT2G40140	AT5G35935	AT2G19802	AT1G77780					
AT2G05935	AT1G73540	AT1G78070	AT1G80820	AT3G056710	AT3G22840	AT3G28810	AT2G40150	AT5G39050	AT2G19970	AT1G80100					
AT2G05995	AT1G74450	AT1G79245	AT1G80040	AT3G056880	AT3G24520	AT3G28830	AT2G40460	AT5G39760	AT2G20160	AT1G80440					
AT2G07679	AT1G74930	AT1G79770	AT2G01340	AT3G063060	AT3G25600	AT3G29000	AT2G40750	AT5G45960	AT2G20560	AT2G01520					
AT2G07681	AT1G75100	AT1G80040	AT2G005050	AT4G00770	AT3G29000	AT3G42450	AT2G41380	AT5G47330	AT2G20670	AT2G01667					
AT2G07687	AT1G75290	AT2G01150	AT2G05940	AT4G02200	AT3G44260	AT3G44260	AT2G41640	AT5G51440	AT2G20825	AT2G01850					
AT2G07688	AT1G75960	AT2G01340	AT2G15020	AT4G02410	AT3G44440	AT3G44440	AT2G42760	AT5G52310	AT2G22040	AT2G01890					
AT2G07696	AT1G76520	AT2G03090	AT2G15040	AT4G04610	AT3G44450	AT3G44450	AT2G43290	AT5G52640	AT2G22345	AT2G02000					
AT2G07709	AT1G76530	AT2G03240	AT2G15390	AT4G11000	AT3G45640	AT3G46630	AT2G44578	AT5G53710	AT2G22420	AT2G02490					
AT2G07717	AT1G76600	AT2G07739	AT2G15480	AT4G13075	AT3G46600	AT3G45640	AT2G44840	AT5G55270	AT2G23260	AT2G02580					
AT2G07725	AT1G76650	AT2G12020	AT2G16140	AT4G13395	AT3G46620	AT3G46620	AT2G45560	AT5G57520	AT2G23490	AT2G03190					
AT2G07727	AT1G77400	AT2G15940	AT2G17040	AT4G13560	AT3G50770	AT3G46600	AT2G45570	AT5G60250	AT2G24950	AT2G03200					
AT2G07733	AT1G77760	AT2G16016	AT2G17660	AT4G17230	AT3G50930	AT3G47440	AT2G46340	AT5G60630	AT2G25060	AT2G04034					
AT2G07735	AT1G78410	AT2G16140	AT2G18210	AT4G18197	AT3G51920	AT3G49530	AT2G46400	AT5G60890	AT2G26150	AT2G05330					
AT2G12020	AT1G78600	AT2G16586	AT2G22120	AT4G21990	AT3G52430	AT3G50770	AT2G47060	AT5G61890	AT2G26650	AT2G06660					
AT2G12905	AT1G78950	AT2G16890	AT2G22200	AT4G23170	AT3G53810	AT3G50930	AT2G47990	AT5G62360	AT2G27385	AT2G12475					
AT2G14560	AT1G78990	AT2G17040	AT2G22430	AT4G23810	AT3G55980	AT3G52620	AT2G47600	AT5G64735	AT2G28085	AT2G13810					
AT2G15040	AT1G79770	AT2G19770	AT2G22580	AT4G24380	AT3G55290	AT3G53810	AT2G47610	AT5G65687	AT2G28305	AT2G14247					
AT2G16110	AT1G80020	AT2G20570	AT2G22540	AT4G25480	AT3G56400	AT3G55980	AT2G47620	AT5G67300	AT2G28570	AT2G14610					
AT2G16140	AT1G80840	AT2G20750	AT2G22880	AT4G25490	AT3G56710	AT3G56290	AT2G47640		AT2G29500	AT2G15325					
AT2G16320	AT2G05050	AT2G21210	AT2G23320	AT4G32510	AT3G56880	AT2G56400	AT2G47650		AT2G31085	AT2G15740					
AT2G16485	AT2G05940	AT2G22055	AT2G23360	AT4G33060	AT3G59080	AT3G56710	AT3G01830		AT2G32800	AT2G19960					
AT2G17040	AT2G05955	AT2G22190	AT2G23810	AT4G35090	AT3G61190	AT3G56880	AT3G02380		AT2G33060	AT2G16660					
AT2G17880	AT2G10940	AT2G22200	AT2G23840	AT4G36500	AT3G61890	AT3G61890	AT3G04210		AT2G34123	AT2G16700					
AT2G18660	AT2G11940	AT2G22240	AT2G24600	AT4G38550	AT3G63060	AT3G63060	AT3G04640		AT2G36050	AT2G16790					
AT2G19500	AT2G13570	AT2G22430	AT2G25510	AT5G01540	AT4G00770	AT3G07850			AT2G36660	AT2G16960					
AT2G19770	AT2G14247	AT2G22500	AT2G25735	AT5G03210	AT4G01250	AT4G02200	AT3G09870		AT2G37130	AT2G17300					
AT2G21200	AT2G15020	AT2G22540	AT2G26530	AT5G06320	AT4G02200	AT3G10930			AT2G37170	AT2G17305					
AT2G21210	AT2G15040	AT2G22880	AT2G27395	AT5G07410	AT4G02410	AT3G14040			AT2G37880	AT2G17723					
AT2G22200	AT2G15390	AT2G23320	AT2G27420	AT5G08760	AT4G11000	AT4G11485	AT3G14210		AT2G38530	AT2G17750					
AT2G22430	AT2G15620	AT2G23810	AT2G27830	AT5G08790	AT4G11280	AT4G13075	AT3G15210		AT2G39030	AT2G17840					
AT2G22540	AT2G16016	AT2G24450	AT2G29900	AT5G17420	AT4G13395	AT4G13395	AT3G15760		AT2G39210	AT2G18490					
AT2G22740	AT2G16140	AT2G24600	AT2G29170	AT5G19240	AT4G14365	AT4G13560	AT3G16720		AT2G40180	AT2G18700					
AT2G22795	AT2G16145	AT2G25000	AT2G29310	AT5G22794	AT4G14560	AT4G14365	AT3G17120		AT2G42110	AT2G18969					
AT2G22880	AT2G17040	AT2G25510	AT2G30020	AT5G24915	AT4G15248	AT4G14400	AT3G17609		AT2G43540	AT2G19500					
AT2G23200	AT2G17230	AT2G26190	AT2G30320	AT5G36002	AT4G16860	AT4G14560	AT3G18710		AT2G43580	AT2G19796					
AT2G23840	AT2G18210	AT2G26530	AT2G31380	AT5G38760	AT4G16890	AT4G17230	AT3G19010		AT2G43590	AT2G19802					
AT2G24600	AT2G19650	AT2G27395	AT2G32020	AT5G41740	AT4G16920	AT4G18197	AT3G19030		AT2G43620	AT2G19970					
AT2G24850	AT2G22200	AT2G27420	AT2G32140	AT5G43630	AT4G17230	AT4G18205	AT3G21150		AT2G43870	AT2G20160					
AT2G25000	AT2G22430	AT2G28140	AT2G32540	AT5G43740	AT4G18197	AT4G18250	AT3G21670		AT2G44910	AT2G20170					
AT2G25510	AT2G22500	AT2G28190	AT2G34650	AT5G45340	AT4G18205	AT4G18395	AT3G21781		AT2G45400	AT2G20560					
AT2G25900	AT2G22540	AT2G28500	AT2G35970	AT5G46490	AT4G21990	AT4G21990	AT3G22231		AT2G45450	AT2G21465					
AT2G26080	AT2G22795	AT2G28950	AT2G36220	AT5G47230	AT4G23170	AT4G23170	AT3G22830		AT2G45830	AT2G22040					
AT2G26190	AT2G22880	AT2G29090	AT2G37090	AT5G48540	AT4G23180	AT4G23180	AT3G22840		AT2G47560	AT2G22121					
AT2G26400	AT2G23600	AT2G29170	AT2G38080	AT5G48850	AT4G23810	AT4G23810	AT3G23170		AT3G01070	AT2G22710					
AT2G26530	AT2G23840	AT2G30432	AT2G38210	AT5G51190	AT4G24380	AT4G24240	AT3G24520		AT3G01570	AT2G23130					
AT2G27310	AT2G24600	AT2G31380	AT2G38470	AT5G52750	AT4G25480	AT4G24380	AT3G25250		AT3G02000	AT2G23290					
AT2G27420	AT2G25510	AT2G32020	AT2G38790	AT5G54490	AT4G25490	AT4G25480	AT3G25600		AT3G02610	AT2G24550					
AT2G28910	AT2G25735	AT2G32140	AT2G39200	AT5G54720	AT4G27280	AT4G25490	AT3G26960		AT3G02640	AT2G24810					

Down in ale1 glob	Down in ale1 heart	Down in gso1/2 glob	Down in gso1/2 heart	Down in ale1 at both stages	Down in gso1/2 at both stages	Down at globular stage in both genotypes	Down at heart stage in both genotypes	Up in ale1 glob	Up in ale1 heart	Up in gso1/2 glob	Up in gso1/2 heart	Up in ale1 at both stages	Up in gso1/2 at both stages	Up at globular stage in both genotypes	Up at heart stage in both genotypes
AT2G47610	AT2G41010	AT2G47580	AT3G01830			AT5G49480	AT5G47230	AT4G01250		AT3G24690	AT2G37760				
AT2G47620	AT2G41380	AT2G47590	AT3G02380			AT5G51190	AT5G48490	AT4G02200		AT3G25990	AT2G38240				
AT2G47630	AT2G41410	AT2G47600	AT3G04210			AT5G52750	AT5G48540	AT4G020410		AT3G26210	AT2G38255				
AT2G47640	AT2G41640	AT2G47610	AT3G04640			AT5G53830	AT5G48850	AT4G04610		AT3G26770	AT2G38750				
AT2G47650	AT2G42200	AT2G47620	AT3G07850			AT5G54470	AT5G50040	AT4G08260		AT3G27785	AT2G39400				
AT3G01280	AT2G42760	AT2G47640	AT3G09520			AT5G54490	AT5G51190	AT4G11000		AT3G27831	AT2G40330				
AT3G02380	AT2G43290	AT3G01140	AT3G09870			AT5G54720	AT5G52750	AT4G11280		AT3G27835	AT2G41610				
AT3G02555	AT2G43550	AT3G01240	AT3G10340			AT5G59450	AT5G54490	AT4G13385		AT3G28857	AT2G41940				
AT3G02800	AT2G44460	AT3G01250	AT3G10930			AT5G59820	AT5G54720	AT4G15248		AT3G29240	AT2G42540				
AT3G03430	AT2G44578	AT3G02380	AT3G14040			AT5G61600	AT5G55450	AT4G16890		AT3G29370	AT2G43660				
AT3G03850	AT2G44840	AT3G02550	AT3G14210			AT5G62020	AT5G59450	AT4G16740		AT3G29700	AT2G43670				
AT3G04210	AT2G45560	AT3G02800	AT3G14380			AT5G62570	AT5G61600	AT4G16880		AT3G30280	AT2G44470				
AT3G05220	AT2G45570	AT3G03430	AT3G15210			AT5G63130	AT5G61720	AT4G16880		AT3G32070	AT2G44590				
AT3G05930	AT2G46340	AT3G03850	AT3G15760			AT5G63160	AT5G62020	AT4G16890		AT3G41761	AT2G44740				
AT3G05935	AT2G46400	AT3G04210	AT3G16280			AT5G63790	AT5G62750	AT4G16920		AT3G42725	AT2G45210				
AT3G06500	AT2G46650	AT3G04290	AT3G16720			AT5G64660	AT5G63130	AT4G17090		AT3G44460	AT2G47360				
AT3G07850	AT2G47060	AT3G04445	AT3G17120			AT5G65070	AT5G63330	AT4G17230		AT3G45248	AT2G47440				
AT3G09870	AT2G47580	AT3G04640	AT3G17609			AT5G65080	AT5G63790	AT4G17500		AT3G45252	AT2G47880				
AT3G10460	AT2G47590	AT3G05930	AT3G18710			AT5G65920	AT5G65070	AT4G18197		AT3G47140	AT3G01327				
AT3G11410	AT2G47600	AT3G06260	AT3G19010			AT5G66070	AT5G65080	AT4G21990		AT3G47190	AT3G01329				
AT3G13227	AT2G47610	AT3G07820	AT3G19030			AT5G66675	AT5G65920	AT4G23170		AT3G47340	AT3G03230				
AT3G13750	AT2G47620	AT3G07850	AT3G19580			AT5G67370	AT5G66675	AT4G23810		AT3G47380	AT3G04010				
AT3G14040	AT2G47630	AT3G09870	AT3G21160			AT5G67420	AT5G67420	AT4G23990		AT3G47950	AT3G04717				
AT3G14050	AT2G47640	AT3G10930	AT3G21670					AT4G24010		AT3G48580	AT3G04943				
AT3G15210	AT2G47650	AT3G13227	AT3G21781					AT4G24380		AT3G49110	AT3G05640				
AT3G15450	AT2G47880	AT3G13390	AT3G21800					AT4G24570		AT3G49790	AT3G06070				
AT3G15500	AT2G47890	AT3G13630	AT3G22231					AT4G25470		AT3G54260	AT3G07340				
AT3G16420	AT3G01830	AT3G14840	AT3G22830					AT4G25480		AT3G54580	AT3G09870				
AT3G16530	AT3G02380	AT3G14210	AT3G22840					AT4G25490		AT3G55500	AT3G09950				
AT3G16620	AT3G03190	AT3G14370	AT3G23090					AT4G27280		AT3G56520	AT3G10525				
AT3G16720	AT3G04140	AT3G15210	AT3G23170					AT4G28350		AT3G57380	AT3G10595				
AT3G19030	AT3G04210	AT3G15500	AT3G24520					AT4G29780		AT3G59220	AT3G10740				
AT3G20220	AT3G04640	AT3G16150	AT3G25250					AT4G33050		AT3G62950	AT3G10780				
AT3G20362	AT3G05400	AT3G16720	AT3G25600					AT4G33467		AT4G02520	AT3G10910				
AT3G20865	AT3G05725	AT3G17060	AT3G26960					AT4G34550		AT4G04223	AT3G11340				
AT3G21150	AT3G05930	AT3G17120	AT3G27140					AT4G35090		AT4G04580	AT3G11660				
AT3G21890	AT3G06145	AT3G17609	AT3G28270					AT4G36500		AT4G06672	AT3G12143				
AT3G22060	AT3G07820	AT3G18220	AT3G29000					AT4G36550		AT4G08290	AT3G12680				
AT3G22231	AT3G07850	AT3G18845	AT3G30280					AT4G37150		AT4G08950	AT3G12750				
AT3G22235	AT3G09870	AT3G19030	AT3G42660					AT4G38550		AT4G10490	AT3G13370				
AT3G23030	AT3G10520	AT3G20220	AT3G44440					AT5G01540		AT4G11890	AT3G14380				
AT3G23090	AT3G10930	AT3G20865	AT3G44450					AT5G03210		AT4G12617	AT3G15960				
AT3G24520	AT3G12520	AT3G21040	AT3G44860					AT5G03760		AT4G12825	AT3G16300				
AT3G25840	AT3G13227	AT3G21150	AT3G45130					AT5G05410		AT4G13060	AT3G16895				
AT3G25882	AT3G14040	AT3G21570	AT3G45640					AT5G06320		AT4G13380	AT3G16920				
AT3G26860	AT3G14210	AT3G21870	AT3G46600					AT5G07690		AT4G13968	AT3G17155				
AT3G27690	AT3G15210	AT3G21890	AT3G46620					AT5G08760		AT4G14250	AT3G18550				
AT3G27960	AT3G15760	AT3G22060	AT3G47430					AT5G08790		AT4G14400	AT3G18660				
AT3G28120	AT3G16720	AT3G22231	AT3G48320					AT5G11190		AT4G14930	AT3G19680				
AT3G28170	AT3G17120	AT3G22235	AT3G48360					AT5G13190		AT4G15940	AT3G20210				
AT3G28740	AT3G17609	AT3G22540	AT3G49570					AT5G16340		AT4G15390	AT3G21720				
AT3G28780	AT3G18690	AT3G22840	AT3G50220					AT5G16350		AT4G15417	AT3G22415				
AT3G28790	AT3G18710	AT3G23030	AT3G50770					AT5G19230		AT4G15620	AT3G22600				
AT3G28810	AT3G19010	AT3G24520	AT3G50930					AT5G19240		AT4G15660	AT3G23090				
AT3G28830	AT3G19030	AT3G25165	AT3G51920					AT5G20230		AT4G15670	AT3G24068				
AT3G28980	AT3G19380	AT3G25600	AT3G52430					AT5G21960		AT4G15690	AT3G24250				
AT3G29000	AT3G20865	AT3G25882	AT3G53810					AT5G22794		AT4G15700	AT3G24280				
AT3G29644	AT3G21150	AT3G25890	AT3G55980					AT5G24110		AT4G16000	AT3G24420				
AT3G29762	AT3G21670	AT3G26110	AT3G56290					AT5G24150		AT4G17160	AT3G25260				
AT3G32990	AT3G21781	AT3G26200	AT3G56400					AT5G24155		AT4G19460	AT3G25770				
AT3G42450	AT3G22231	AT3G26860	AT3G56710					AT5G24210		AT4G19970	AT3G26280				
AT3G44260	AT3G22830	AT3G27690	AT3G56880					AT5G24470		AT4G21040	AT3G26790				
AT3G44440	AT3G22840	AT3G28420	AT3G58250					AT5G24660		AT4G21080	AT3G27785				
AT3G44450	AT3G23170	AT3G28810	AT3G59080					AT5G24915		AT4G21600	AT3G27835				
AT3G44630	AT3G24520	AT3G28820	AT3G61190					AT5G26260		AT4G21850	AT3G27980				
AT3G44680	AT3G25165	AT3G28830	AT3G61220					AT5G35735		AT4G23140	AT3G28250				
AT3G45640	AT3G25250	AT3G29000	AT3G61890					AT5G36002		AT4G23380	AT3G28360				
AT3G46520	AT3G26860	AT3G42450	AT3G61910					AT5G37770		AT4G23390	AT3G28990				
AT3G46600	AT3G26860	AT3G44260	AT3G64320					AT5G38760		AT4G24360	AT3G29152				
AT3G47440	AT3G26960	AT3G44400	AT3G63120					AT5G39120		AT4G24960	AT3G29240				
AT3G48060	AT3G27140	AT3G44440	AT4G00770					AT5G39150		AT4G27450	AT3G30720				
AT3G48670	AT3G28120	AT3G44450	AT4G01080					AT5G39180		AT4G27810	AT3G42473				
AT3G49530	AT3G28270	AT3G44480	AT4G01250					AT5G39670		AT4G28365	AT3G45248				
AT3G50480	AT3G28780	AT3G44630	AT4G02200					AT5G40180		AT4G28775	AT3G45870				
AT3G50590	AT3G28810	AT3G45640	AT4G02410					AT5G41740		AT4G30090	AT3G46900				
AT3G50770	AT3G28820	AT3G46520	AT4G04610					AT5G42050		AT4G30590	AT3G48720				
AT3G50930	AT3G28830	AT3G46600	AT4G08260					AT5G43630		AT4G32100	AT3G48740				
AT3G52620	AT3G28960	AT3G46620	AT4G10120					AT5G44390		AT4G34770	AT3G49330				
AT3G53810	AT3G28980	AT3G47340	AT4G11000					AT5G44565		AT4G35770	AT3G49780				
AT3G55980	AT3G29000	AT3G47440	AT4G11280					AT5G46490		AT4G36130	AT3G49930				
AT3G56290	AT3G29644	AT3G48090	AT4G11330					AT5G47230		AT4G36740	AT3G50220				
AT3G56400	AT3G30460	AT3G49530	AT4G13395					AT5G48540		AT4G36850	AT3G50840				
AT3G56705	AT3G44260	AT3G49540	AT4G13930					AT5G48850		AT4G38000	AT3G50970				
AT3G56710	AT3G44320	AT3G49940	AT4G14365					AT5G51195		AT5G01280	AT3G51325				
AT3G56880	AT3G44440	AT3G50560	AT4G14560					AT5G52320		AT5G01870	AT3G52310				
AT3G59010	AT3G44450	AT3G50770	AT4G15248					AT5G52750		AT5G02020	AT3G55500				
AT3G61160	AT3G44630	AT3G50800	AT4G15390					AT5G54470		AT5G02760	AT3G56000				
AT3G61890	AT3G44860	AT3G50900	AT4G16590					AT5G54490		AT5G03820	AT3G56240				
AT3G63060	AT3G45130	AT3G50930	AT4G16740					AT5G54720		AT5G03940	AT3G56360				

Down in ale1 glob	Down in ale1 heart	Down in gso1/2 glob	Down in gso1/2 heart	Down in ale1 at both stages	Down in gso1/2 at both stages	Down at globular stage in both genotypes	Down at heart stage in both genotypes	Up in ale1 glob	Up in ale1 heart	Up in gso1/2 glob	Up in gso1/2 heart	Up in ale1 at both stages	Up in gso1/2 at both stages	Up at globular stage in both genotypes	Up at heart stage in both genotypes
AT4G13395	AT3G53400	AT3G60930	AT4G23990				AT5G66675		AT5G19175	AT4G04830					
AT4G13494	AT3G53810	AT3G61190	AT4G24010				AT5G67370		AT5G19190	AT4G08950					
AT4G13510	AT3G55980	AT3G61890	AT4G24380				AT5G67420		AT5G20250	AT4G09153					
AT4G13560	AT3G56200	AT3G62100	AT4G24570						AT5G20670	AT4G12140					
AT4G14365	AT3G56290	AT3G62170	AT4G24780						AT5G21170	AT4G12690					
AT4G14400	AT3G56400	AT3G62640	AT4G25470						AT5G23212	AT4G12825					
AT4G14548	AT3G56710	AT3G63060	AT4G25480						AT5G23360	AT4G12890					
AT4G14560	AT3G56880	AT3G63440	AT4G25490						AT5G24355	AT4G12900					
AT4G15660	AT3G57640	AT4G00770	AT4G27280						AT5G25090	AT4G12910					
AT4G15670	AT3G59080	AT4G01250	AT4G28085						AT5G25240	AT4G13380					
AT4G15700	AT3G61190	AT4G01410	AT4G28350						AT5G25250	AT4G13968					
AT4G16780	AT3G61220	AT4G01525	AT4G29780						AT5G25440	AT4G15040					
AT4G17230	AT3G62960	AT4G02200	AT4G30280						AT5G25450	AT4G15050					
AT4G18197	AT3G63060	AT4G02380	AT4G33050						AT5G26620	AT4G15053					
AT4G18205	AT3G63110	AT4G02410	AT4G33467						AT5G35120	AT4G15755					
AT4G18250	AT4G00050	AT4G02420	AT4G33920						AT5G35792	AT4G15765					
AT4G18395	AT4G00670	AT4G11000	AT4G34550						AT5G35935	AT4G16000					
AT4G19515	AT4G00770	AT4G11280	AT4G35090						AT5G36680	AT4G16130					
AT4G20260	AT4G01080	AT4G11485	AT4G36500						AT5G37473	AT4G17160					
AT4G21990	AT4G01250	AT4G12720	AT4G36550						AT5G38180	AT4G17220					
AT4G23160	AT4G02200	AT4G13075	AT4G36950						AT5G38197	AT4G18780					
AT4G23170	AT4G02410	AT4G13395	AT4G37150						AT5G38270	AT4G19170					
AT4G23180	AT4G04610	AT4G13410	AT4G37560						AT5G38960	AT4G19420					
AT4G23800	AT4G04810	AT4G13560	AT4G38550						AT5G39050	AT4G20260					
AT4G23810	AT4G04830	AT4G13710	AT5G01540						AT5G39560	AT4G21080					
AT4G24240	AT4G08260	AT4G14315	AT5G03170						AT5G40155	AT4G22105					
AT4G24380	AT4G08870	AT4G14365	AT5G03210						AT5G40360	AT4G23380					
AT4G25480	AT4G11000	AT4G14400	AT5G03760						AT5G41450	AT4G24960					
AT4G25490	AT4G11180	AT4G14560	AT5G05390						AT5G41471	AT4G25100					
AT4G26090	AT4G11280	AT4G14819	AT5G05410						AT5G42242	AT4G25810					
AT4G26320	AT4G12030	AT4G15248	AT5G06320						AT5G44380	AT4G26220					
AT4G27410	AT4G12730	AT4G16515	AT5G07690						AT5G44420	AT4G27435					
AT4G27740	AT4G13075	AT4G16860	AT5G08760						AT5G44572	AT4G27450					
AT4G28400	AT4G13395	AT4G16890	AT5G08790						AT5G44585	AT4G28330					
AT4G28905	AT4G13560	AT4G16920	AT5G10580						AT5G44680	AT4G28775					
AT4G31330	AT4G15248	AT4G16950	AT5G11790						AT5G47450	AT4G29280					
AT4G32510	AT4G16590	AT4G17230	AT5G13190						AT5G47670	AT4G29293					
AT4G33050	AT4G16740	AT4G17670	AT5G14545						AT5G48953	AT4G29390					
AT4G33740	AT4G16860	AT4G18197	AT5G15500						AT5G48980	AT4G30270					
AT4G35090	AT4G16880	AT4G18205	AT5G16340						AT5G49448	AT4G30880					
AT4G36500	AT4G16890	AT4G18250	AT5G16350						AT5G50090	AT4G32100					
AT4G37560	AT4G16920	AT4G18290	AT5G19040						AT5G52272	AT4G32340					
AT4G37790	AT4G16950	AT4G18395	AT5G19230						AT5G52390	AT4G33020					
AT4G38550	AT4G16980	AT4G21990	AT5G19240						AT5G52640	AT4G33420					
AT5G01360	AT4G17090	AT4G22490	AT5G20230						AT5G53110	AT4G35060					
AT5G01540	AT4G17230	AT4G23170	AT5G21960						AT5G53710	AT4G36130					
AT5G03210	AT4G17470	AT4G23180	AT5G22794						AT5G56075	AT4G37240					
AT5G03350	AT4G17490	AT4G23810	AT5G24110						AT5G57123	AT4G37260					
AT5G06320	AT4G17500	AT4G24240	AT5G24120						AT5G57260	AT4G37360					
AT5G07410	AT4G18010	AT4G24380	AT5G24150						AT5G57520	AT4G37800					
AT5G07420	AT4G18197	AT4G25480	AT5G24155						AT5G57920	AT4G38400					
AT5G08130	AT4G18440	AT4G25490	AT5G24210						AT5G58782	AT4G38410					
AT5G08230	AT4G20820	AT4G25590	AT5G24470						AT5G59220	AT4G38700					
AT5G08760	AT4G21760	AT4G26090	AT5G24655						AT5G59590	AT4G39650					
AT5G08790	AT4G21990	AT4G27280	AT5G24660						AT5G60630	AT4G39917					
AT5G10550	AT4G23170	AT4G27657	AT5G24915						AT5G62630	AT5G02260					
AT5G13770	AT4G23810	AT4G27920	AT5G26260						AT5G63240	AT5G02490					
AT5G16570	AT4G23990	AT4G29340	AT5G26340						AT5G65370	AT5G02600					
AT5G17420	AT4G24010	AT4G29780	AT5G35735						AT5G65660	AT5G02760					
AT5G18670	AT4G24380	AT4G29900	AT5G36002							AT5G03170					
AT5G19240	AT4G24570	AT4G29920	AT5G37770							AT5G03810					
AT5G20240	AT4G24700	AT4G30064	AT5G38760							AT5G03820					
AT5G20490	AT4G25380	AT4G30140	AT5G39120							AT5G04045					
AT5G22794	AT4G25470	AT4G31800	AT5G39150							AT5G04047					
AT5G23575	AT4G25480	AT4G33040	AT5G39180							AT5G04530					
AT5G24530	AT4G25490	AT4G33050	AT5G39670							AT5G05030					
AT5G24915	AT4G27280	AT4G33300	AT5G40170							AT5G05250					
AT5G25250	AT4G27560	AT4G34150	AT5G40180							AT5G05440					
AT5G25280	AT4G27570	AT4G34550	AT5G41740							AT5G06020					
AT5G26692	AT4G27654	AT4G34900	AT5G42050							AT5G06030					
AT5G26717	AT4G27657	AT4G35090	AT5G42250							AT5G06500					
AT5G27870	AT4G28350	AT4G35700	AT5G42530							AT5G06530					
AT5G27980	AT4G29700	AT4G36500	AT5G43630							AT5G07260					
AT5G36002	AT4G29780	AT4G38550	AT5G44390							AT5G08730					
AT5G38760	AT4G29900	AT4G38960	AT5G44565							AT5G09440					
AT5G40340	AT4G31550	AT5G01540	AT5G46490							AT5G10220					
AT5G40450	AT4G32020	AT5G01820	AT5G46710							AT5G10230					
AT5G41740	AT4G32510	AT5G02110	AT5G47230							AT5G11070					
AT5G41761	AT4G33050	AT5G03210	AT5G48540							AT5G11220					
AT5G41790	AT4G33467	AT5G03350	AT5G48850							AT5G13220					
AT5G42250	AT4G33790	AT5G04720	AT5G49480							AT5G14070					
AT5G42530	AT4G34410	AT5G05840	AT5G49740							AT5G14120					
AT5G43630	AT4G34550	AT5G06320	AT5G51190							AT5G14995					
AT5G43700	AT4G35010	AT5G07410	AT5G52320							AT5G15500					
AT5G43740	AT4G35090	AT5G07420	AT5G52750							AT5G15630					
AT5G44568	AT4G36500	AT5G08640	AT5G52760							AT5G15960					
AT5G45110	AT4G36550	AT5G08760	AT5G53830							AT5G17470					
AT5G45340	AT4G37140	AT5G11250	AT5G54470							AT5G17730					
AT5G46490	AT4G37150	AT5G11260	AT5G54490							AT5G18600					
AT5G46500	AT4G37800	AT5G12940	AT5G54720							AT5G19190					
AT5G46710	AT4G38420	AT5G13190	AT5G58120							AT5G19700					
AT5G47220	AT4G38550	AT5G14380	AT5G58680							AT5G20250					
AT5G47230	AT5G01015	AT5G15140	AT5G59450							AT5G20670					
AT5G47690	AT5G01180	AT5G15310	AT5G59820							AT5G22940					
AT5G48490	AT5G01540	AT5G15948	AT5G61270							AT5G23240					
AT5G48540	AT5G01820	AT5G16350	AT5G61600							AT5G23660					
AT5G48560	AT5G02110	AT5G18240	AT5G62020							AT5G24410					
AT5G48850	AT5G03120	AT5G19230	AT5G62570							AT5G25240					
AT5G50040	AT5G03210	AT5G19240	AT5G63130							AT5G25410					
AT5G51190	AT5G03760	AT5G19473	AT5G63160							AT5G25450					

Supplemental Table 2

Primer name	Sequence	Application
LCR-HIS-F	atggagat tccactgctctaag	In-situ hybridization
LCR-HIS-R	ctaactgaaacgcggtaccaac	
BDG1-HIS-F	atgggattctcacggctgctc	
BDG1-HIS-R	aagttgaggagtagtggaatgctg	
FDH-HIS-F	atgggtagatccaacgagcaag	
FDH-HIS-R	ttagagaggcacagggtaacg	
LACS2-HIS-F	atgtcttttagccgcgataatgtg	
LACS2-HIS-R	ctatgcatggaaccttttgcttc	
ABCG11-HIS-F	caccatggagatagaagcaagcagacaac	
ABCG11-HIS-R	ctaccatctgcgagctccatct	
LTPG1-HIS-F	caccctgataatgaagggtctcatctcc	
LTPG1-HIS-R	ggagagatatcagatttgagtggg	
GSO1-HIS-F	ttccggtttaggtcaaccgggtatc	
GSO1-HIS-R	gacatggagaagactatcacaagcttgcc	
GSO2-HIS-F	atgcagcaaaactctgttctctgctc	
GSO2-HIS-R	tttgcctctccctgtaactggcagc	
SWI3A-HIS-F	atggaagccactgatccaagc	RT-qPCR
SWI3A-HIS-R	tcatttcacgtacgtatgatccc	
At3g56400-qPCR-F	tctcgtttcttgataacctcg	
At3g56400-qPCR-R	cgctgttatcacatgaagcatt	
At2g46400-qPCR-F	gaaaaatggctctattgatgatgg	
At2g46400-qPCR-R	tcgatgcgtgcatctgtaa	
At4g23810-qPCR-F	cggagatccgagaagtgaag	
At4g23810-qPCR-R	tctgaccactttgtaacatcttt	
At2g38470-qPCR-F	agatggagaaaaatcagcgccag	
At2g38470-qPCR-R	ttactgctctcatgtcgtgtg	
At2g47620-qPCR-F	ggataagagcgctctgtggc	
At2g47620-qPCR-R	ctagaaactcaacttgctctgc	
At1g72900-qPCR-F	tggcctttaaaaagagagacga	
At1g72900-qPCR-R	cgtagcaaaattcattgct	
At1g72910-qPCR-F	gccacggaatgtttttgtgtc	
At1g72910-qPCR-R	acccaagagcaaccactc	
At1g72930-qPCR-F	caacaatatgatgagtcagacg	
At1g72930-qPCR-R	agtcttatgggccttctcc	
At1g31540-qPCR-F	cataaatctggagactctgccc	
At1g31540-qPCR-R	acctctcaatcgctgtttcg	
At3g56710-qPCR-F	agacgcgctgactctca	
At3g56710-qPCR-R	ggtagagaaagggtgtgtc	
At1g02450-qPCR-F	cacggaaacgtagacgagaag	
At1g02450-qPCR-R	gacctttctccgccgttag	
At3g25882-qPCR-F	gggtgtgctgagggagagatt	
At3g25882-qPCR-R	tcaaccaagattctgactcc	
At3g15210-qPCR-F	atggggatcggttaacgtagg	
At3g15210-qPCR-R	cgatctaaacgccgatgtc	
At5g47230-qPCR-F	caaattcgtaaaccgccatt	
At5g47230-qPCR-R	tgcgaaattgaatccactctg	
At2g44840-qPCR-F	gtcagtctccgatcagttaacg	
At2g44840-qPCR-R	acaaccaactagactcgcc	
At5g03350-qPCR-F	ggtccactccagtcctttc	
At5g03350-qPCR-R	gaaagtgaagaagtttcaaatgat	
At3g46600-qPCR-F	gcaagctgtggcgagttt	
At3g46600-qPCR-R	ttctctatctcctcagtttctcaa	
At5g54720-qPCR-F	tgaagtctgtagaggccagact	
At5g54720-qPCR-R	ttgtctgttttctcaaaatcg	
At3g16720-qPCR-F	gagtctctcgccgggatt	
At3g16720-qPCR-R	tcaaccgcaatcacaaactc	
GSO1-qPCR-F	tggtttgcagtctcttatgg	
GSO1-qPCR-R	cagtgccttcaacgagtaa	
GSO2-qPCR-F	cgagtatatggcgaatggaag	
GSO2-qPCR-R	caagaacctcctttttctcgat	
ALE1Fex7	tcctagattcgccgattatgttg	
ALE1Rex8	gccactctctcgtgtctctaaa	
EIF4A-F	ttcgctcttctcttctctc	
EIF4A-R	gaactcatctgtccctcaagta	

Chapitre 3

MYB30 est impliqué
dans la formation de la
cuticule embryonnaire
chez *Arabidopsis thaliana*

3.1. Résultats

Comme présenté dans l'introduction, le facteur de transcription d'*Arabidopsis* MYB30 active l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de composés liés à la cuticule après inoculation bactérienne (Raffaele *et al.*, 2008). De plus, chez des plantes saines, MYB30 est exprimé dans l'embryon au cours du développement de la graine pendant la même fenêtre développementale durant laquelle la cuticule embryonnaire est synthétisée (voir chapitre précédent et Figure 1.23). En outre, des gènes de biosynthèse de la cuticule dont l'expression est activée par MYB30 chez les plantes adultes après inoculation bactérienne sont exprimés dans la graine aux mêmes stades développementaux (Figure 1.24). Enfin, comme montré dans le Chapitre 2, les RLK GSO1 et GSO2 qui sont essentielles pour la déposition de la cuticule embryonnaire sont aussi exprimées aux mêmes stades que MYB30.

Basé sur ces résultats, nous avons cherché à déterminer si MYB30 pourrait jouer un rôle dans la formation de la cuticule embryonnaire.

3.1.1. MYB30 est exprimé dans les cellules épidermiques des embryons en développement

Comme montré dans l'introduction, l'expression de MYB30 chez des embryons aux stades globulaire, cœur, et torpille a été précédemment démontrée dans des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* de l'écotype Ws-4 exprimant une construction MYB30p:*GUS* (Figure 1.23 B). Nous avons cherché à confirmer ce profil d'expression dans le fond génétique Col-0. En effet, les lignées surexprimant ou mutées pour MYB30 qui nous utilisons en routine dans notre équipe sont dans le fond génétique Col-0 et il était par conséquent important de confirmer que MYB30 est exprimé pendant le développement précoce de la graine chez Col-0 avant de poursuivre notre étude. L'analyse de plantes d'*Arabidopsis* Col-0 transformées avec une construction contenant un fragment de 1,1 kb du promoteur de MYB30 fusionné au gène rapporteur *GUS* (MYB30p::*GUS*) a montré une coloration GUS principalement localisée dans l'embryon en développement. Pendant l'embryogenèse, l'expression de MYB30 s'étend du stade globulaire au stade embryon mature et semble être plus intense autour du stade cœur précoce (Figure 3.1).

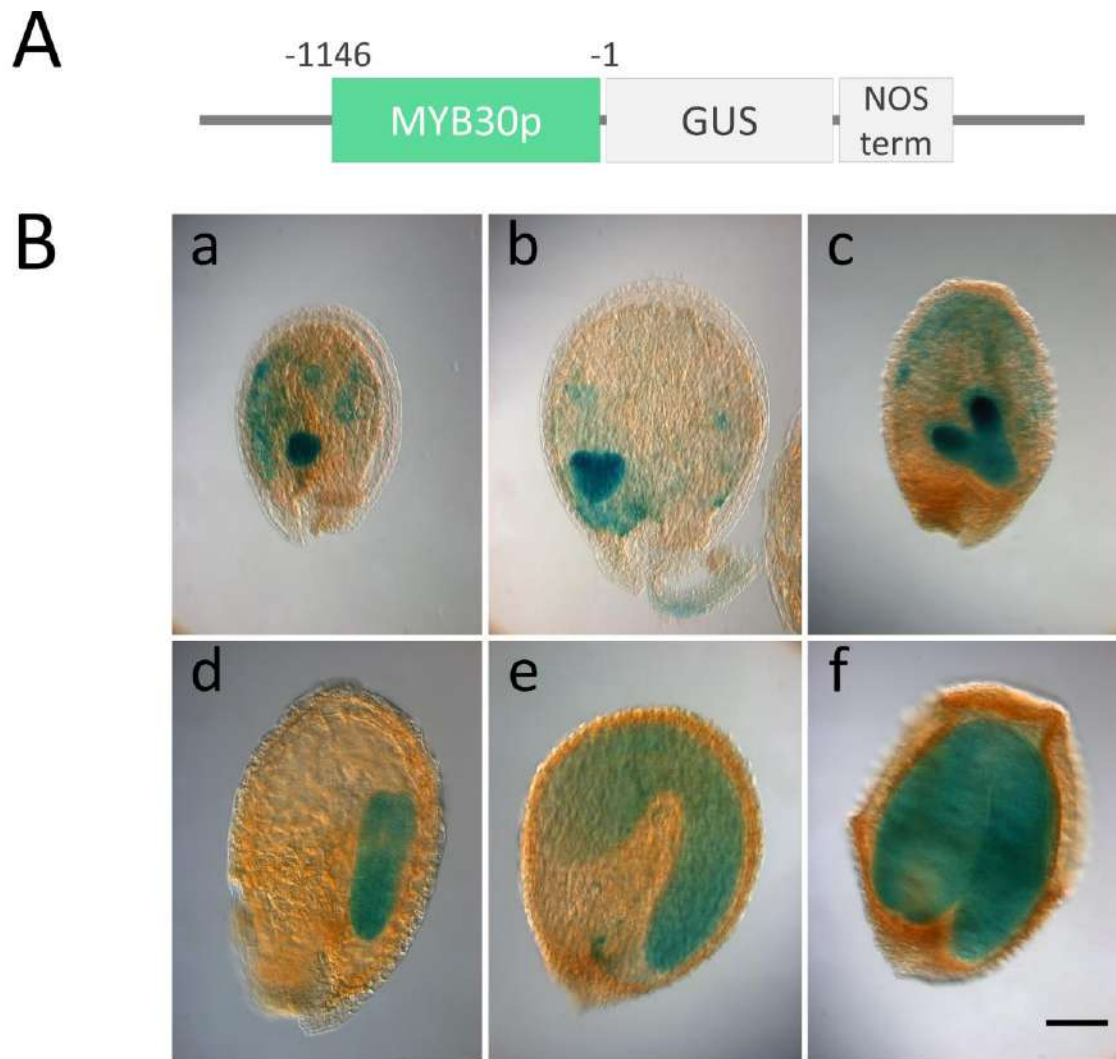


Figure 3.1 *MYB30* est exprimé dans les embryons en développement

(A) Représentation schématique de la construction utilisée pour suivre l'expression de *MYB30* par coloration GUS. **(B)** Coloration GUS de plantes transgéniques d'*Arabidopsis MYB30p::GUS* de l'écotype Col-0. Le profil d'expression *GUS* des embryons en développement a été déterminé à différents stades: a: globulaire. b: cœur. c: cœur tardif. d: torpille. e: cotylédons courbés. f: embryon mature. Barre d'échelle = 100 μ m.

Une hybridation *in situ* d'ARN (HIS) sur une série de coupes d'embryons en développement fut ensuite réalisée par Audrey Creff (équipe de Gwyneth Ingram, RDP, Lyon), afin d'analyser de manière plus approfondie le profil d'expression de *MYB30*. L'ARN messager de *MYB30* est détecté du stade pré-globulaire au stade cotylédons courbés et, de manière intéressante, semble limité aux cellules épidermiques de l'embryon (Figure 3.2). L'ensemble de ces données confirme que l'expression de *MYB30* durant l'embryogenèse est spatialement et temporellement cohérente avec un rôle potentiel dans la formation de cuticule.

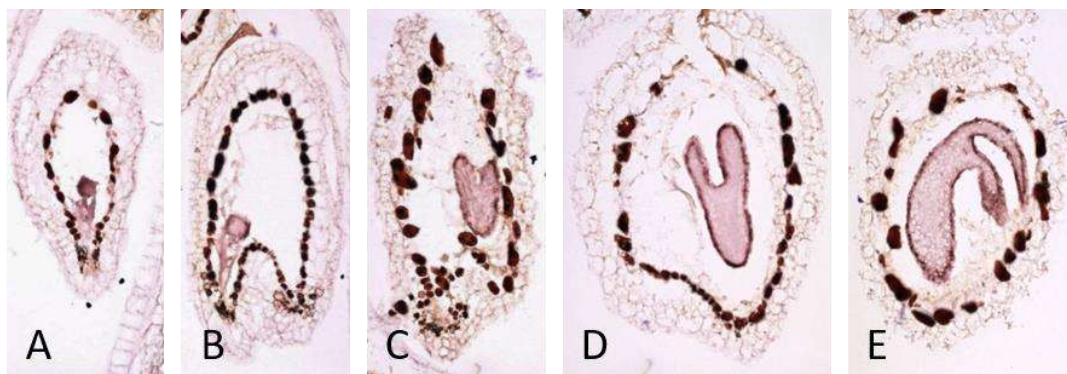


Figure 3.2 MYB30 est exprimé dans les cellules épidermiques des embryons en développement.

(A-E) L'hybridation *in situ* a été réalisée à l'aide d'une sonde antisens pour *MYB30* sur des coupes transversales de graines Col-0 au stade pré-globulaire (A), globulaire (B), cœur (C), torpille (D) et cotylédons courbés (E). La coloration brune de l'endothélium (la couche cellulaire interne des téguments) est observée chez toutes les graines et représente un artefact admis dans les tissus de graines en développement. Les images ont été gracieusement fournies par Audrey Creff.

3.1.2. MYB30 est requis pour l'intégrité de la cuticule embryonnaire

Etant donné que l'analyse de la cuticule de plantules peu de temps après la germination permet une lecture précise des changements causés par des défauts embryonnaires dans la composition de cette dernière, nous avons tout d'abord testé l'effet de la dérégulation de *MYB30* en mesurant la perméabilité de plantules mutées pour *MYB30* (*myb30-02* et *myb30-67*) et le surexprimant (*MYB30^{OE}*) à l'aide du Bleu de Toluidine (BT), un colorant hydrophile (Tanaka *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2013). Les mutants précédemment décrits *ale1-4* et *gso1-1 gso2-1*, qui présentent des défauts de cuticule embryonnaire, ont été utilisés en tant que contrôles internes dans ces analyses (Tanaka *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2004; Tsuwamoto *et al.*, 2008). Chez des plantules étiolées 3 jours après stratification (JAS), aucune coloration n'est visible chez Col-0 tandis que pour les plantules *ale1-4*, l'hypocotyle est modérément coloré en bleu et les cotylédons apparaissent verts de par le mélange de leur couleur jaune avec la coloration bleue. Le double mutant *gso1-1 gso2-1*, qui est fortement affecté, montre une coloration bleue foncée à la fois des cotylédons et de l'hypocotyle. Les hypocotyles de la lignée *MYB30^{OE}* restent blancs et les cotylédons jaunes, indiquant une cuticule intacte. Enfin, les plantules *myb30-02* présentent une légère coloration au niveau de l'hypocotyle et des cotylédons, tandis que les plantules *myb30-67* montrent une coloration BT comparable à celle d'*ale1-4* (Figure 3.3 A). En plus de ces analyses qualitatives, la quantification de l'absorption de BT fut réalisée à la fois sur des plantules étiolées de 3 jours et des plantules de 7 jours cultivées en condition de jour long. Les résultats de ces analyses sont corrélés avec les observations précédentes (Figure 3.3 B et C).

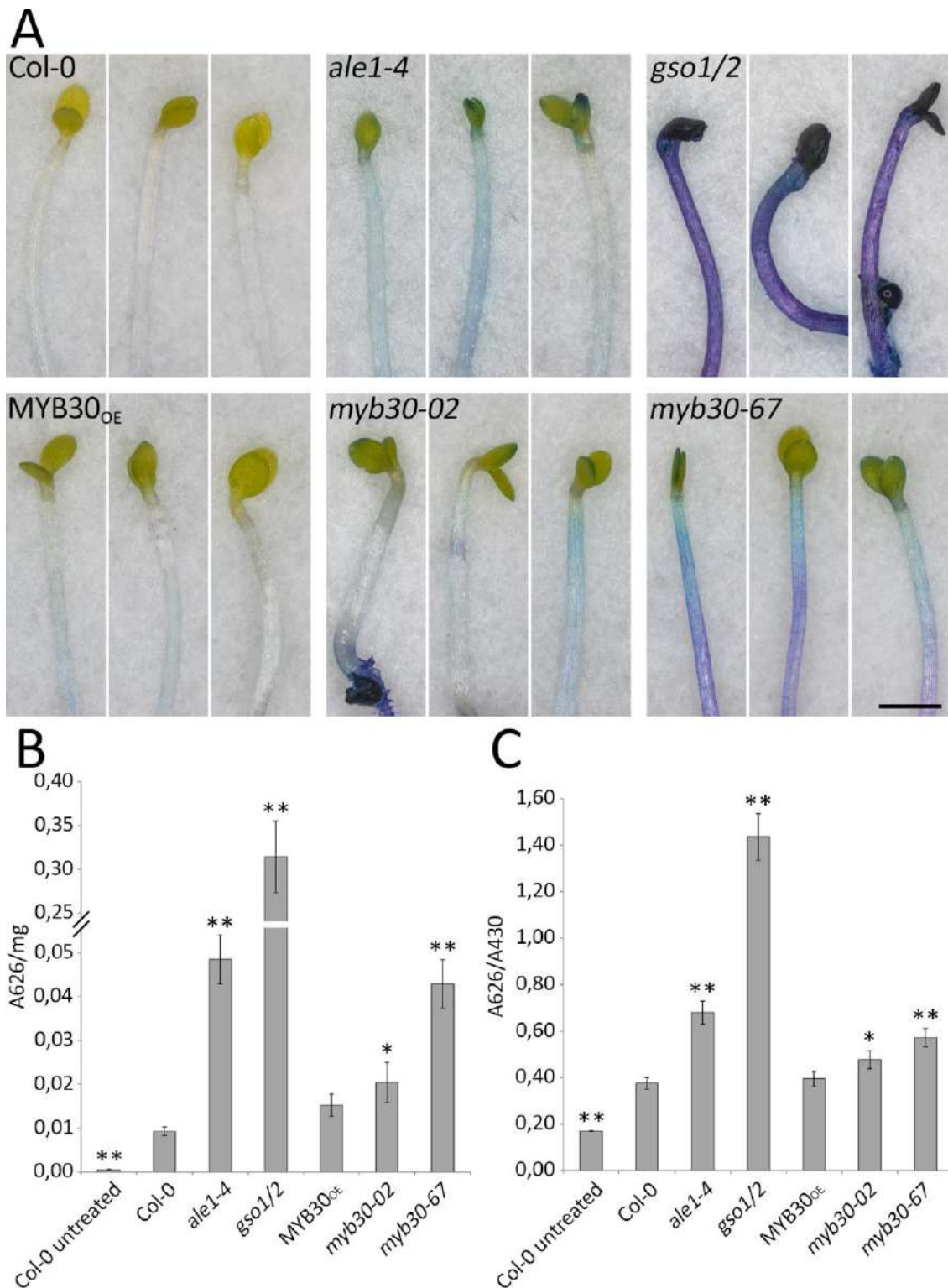


Figure 3.3 La perte de fonction de *MYB30* cause des défauts cuticulaires faibles

(A) Coloration au Bleu de Toluidine de plantules étiolées des lignées indiquées, 3 jours après stratification. Toutes les plantules ont été cultivées sur la même boîte afin de permettre un traitement uniforme. Barre d'échelle = 1 mm. **(B-C)** L'absorption du Bleu de Toluidine chez ces lignées a été quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre chez des plantules étiolées de 3 jours (B) ou des plantules de 7 jours (C), montrant le phénotype faible des allèles *MYB30* comparé à celui des plantules mutantes *gso1-1 gso2-1*. Les barres d'erreur représentent l'erreur type d'au moins cinq réplicats biologiques contenant au moins 20 plantules. Les différences statistiques avec la lignée Col-0 ont été déterminées selon le test de Student (* signifie une p-value < 0.05 et ** signifie une p-value < 0.001).

De plus, la cuticule de ces lignées a été directement visualisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser après traitement avec le colorant fluorescent Auramine-O qui possède une forte affinité pour les cires acides et insaturées, ainsi que pour les précurseurs de la cutine (Figure 3.4). Une cuticule épaisse et continue peut-être observée à la surface des cellules épidermiques des plantules de Col-0, tandis que les plantules *ale1-4* montrent une cuticule plus fine, et quasiment aucune cuticule n'est détectée à la surface de *gso1-1 gso2-1*. En accord avec les expériences de Bleu de Toluidine, la lignée MYB30_{OE} est similaire à Col-0 et les deux mutants *myb30* présentent une cuticule plus fine comparée à celle des hypocotyles sauvages. De manière intéressante, dû à l'affinité modérée de l'Auramine-O pour le contenu cytoplasmique lipidique (Buda *et al.*, 2009), une coloration est également détectée à l'intérieur des hypocotyles d'*ale1-4*, *gso1-1 gso2-1*, *myb30-02* et *myb30-67*, ce qui reflète des défauts de cuticule chez ces mutants et confirme les résultats obtenus par la coloration BT.

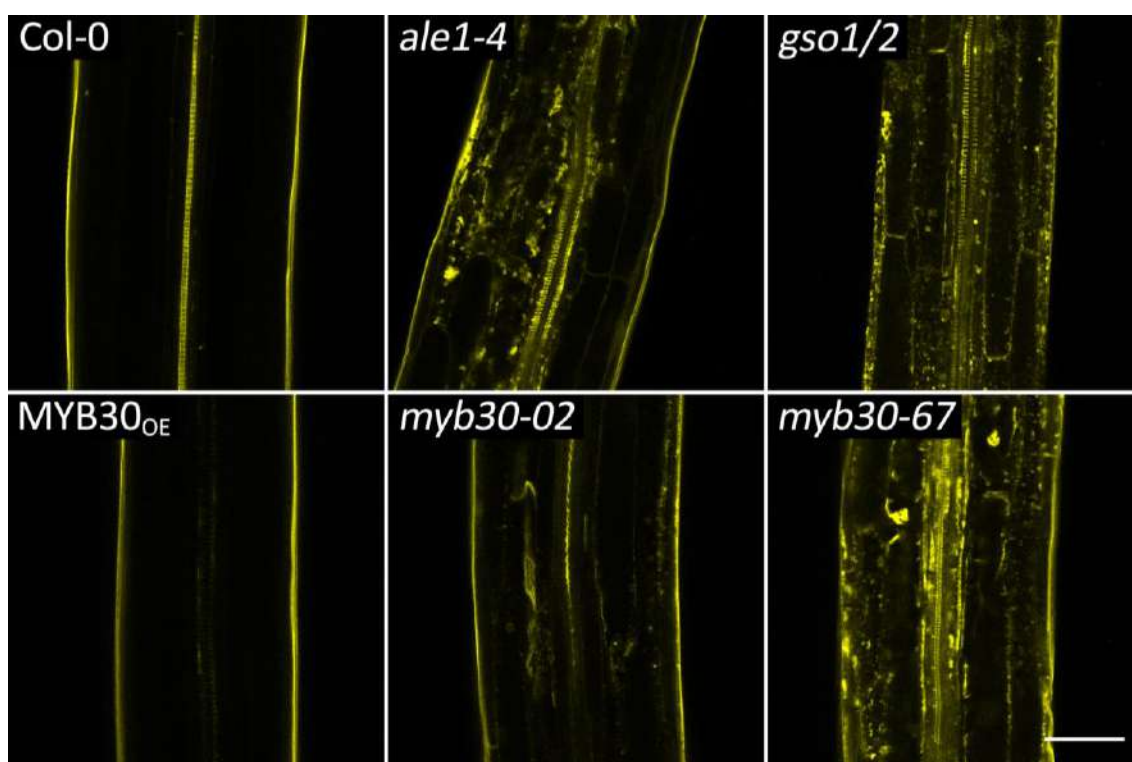


Figure 3.4 Les plantules mutantes *myb30* présentent des défauts de cuticule

Images confocales d'hypocotyles colorés à l'Auramine-O de plantules étiolées 3 jours après stratification. Toutes les plantules ont été cultivées sur la même boîte afin de permettre un traitement uniforme. Barre d'échelle = 100 μ m.

Dans le but d'obtenir une preuve directe de l'implication de MYB30 dans le dépôt de la cuticule embryonnaire, nous avons observé des embryons de Col-0, *myb30-67* et *gso1-1 gso2-1* par microscopie électronique à transmission, en collaboration avec Alain Jauneau de la Plateforme d'Imagerie de Toulouse TRI-Genotoul. Comme décrit dans le Chapitre 2, la cuticule embryonnaire de Col-0 est continue mais *gso1-1 gso2-1* montre une cuticule moins dense et discontinue. Des discontinuités similaires sont observées, bien qu'à une fréquence moindre, chez les embryons *myb30-67* (Figure 3.5). Plus tard dans

le développement, au stade torpille, les trous dans la cuticule de *myb30-67* et *gso1-1 gso2-1* sont moins fréquents, bien que la cuticule de *gso1-1 gso2-1* apparaisse plus fine et moins dense aux électrons.

Ensemble, ces résultats démontrent, comme précédemment décrit pour GSO1 et GSO2, que MYB30 est requis pour le renforcement de la cuticule embryonnaire.

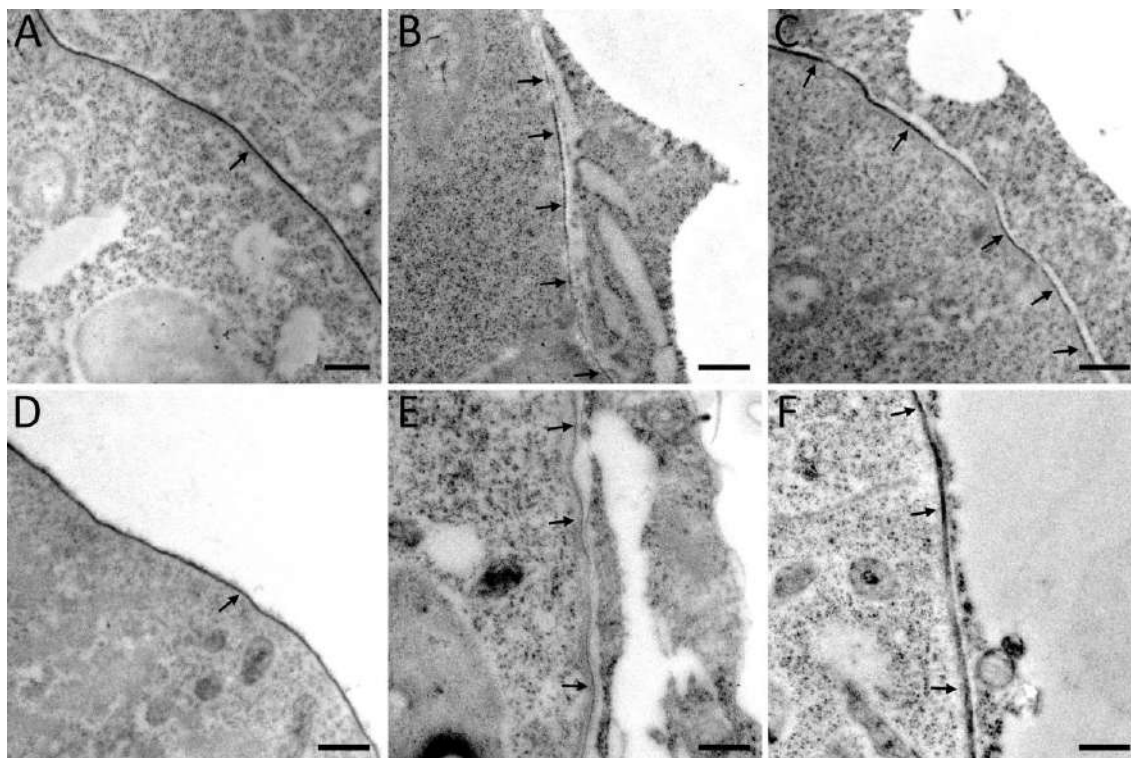


Figure 3.5 La déposition de la cuticule embryonnaire est altérée chez les embryons *myb30-67*

Observation de la déposition de la cuticule embryonnaire chez des embryons sauvages (A, D) *gso1-1 gso2-1* (B,E) et *myb30-67* (C,F) au stades cœur (A-C) et torpille (D-F) de l'embryogenèse. Les flèches noires indiquent la face interne de la cuticule embryonnaire. Barre d'échelle = 500 nm.

3.1.3. MYB30 contrôle l'expression de gènes de biosynthèse de la cuticule pendant l'embryogenèse

Afin d'avoir une vision des processus régulés par MYB30 dans la graine, une analyse transcriptomique a été réalisée dans notre groupe à partir de siliques au stade cœur de plantes sauvages, du mutant *myb30-02* et de la lignée MYB30^{OE}. L'analyse des données a été réalisée par David Rengel (Plateforme d'Analyse de Données du LIPM). Comme présenté dans la [Table 3.1](#), les gènes régulés positivement par MYB30 montrent une sur-représentation de termes *Gene Ontology* (GO) reliés aux réponses de défense, à la paroi cellulaire, et à la biosynthèse/au métabolisme des VLCFA/cutine/cires ([Figure 3.6](#)). Ces résultats rappellent le rôle clairement décrit de MYB30 en tant que régulateur positif de défense à travers l'activation de la biosynthèse des VLCFA et sont en accord avec le fait que MYB30 soit requis pour le dépôt de la cuticule pendant l'embryogenèse.

GO.ID	Term	p-value
GO:0050896	response to stimulus	1.5e-18
GO:0006952	defense response	1.7e-10
GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	1.3e-08
GO:0009607	response to biotic stimulus	7.1e-08
GO:0098542	defense response to other organism	2.9e-07
GO:0051707	response to other organism	3.0e-07
GO:0043207	response to external biotic stimulus	3.2e-07
GO:0009605	response to external stimulus	4.6e-07
GO:0071669	plant-type cell wall organization or bio...	5.8e-07
GO:0010025	wax biosynthetic process	9.0e-07
GO:0010166	wax metabolic process	9.0e-07
GO:0071555	cell wall organization	1.1e-06
GO:0045492	xylan biosynthetic process	5.1e-06
GO:0050832	defense response to fungus	9.7e-06
GO:0009828	plant-type cell wall loosening	1.6e-05
GO:0042335	cuticle development	2.0e-05
GO:0010143	cutin biosynthetic process	2.6e-05
GO:0009834	plant-type secondary cell wall biogenesi...	2.6e-05
GO:0042545	cell wall modification	3.2e-05
GO:0042546	cell wall biogenesis	3.8e-05
GO:0045490	pectin catabolic process	3.9e-05
GO:0009827	plant-type cell wall modification	5.2e-05
GO:0010410	hemicellulose metabolic process	5.9e-05
GO:0006631	fatty acid metabolic process	7.1e-05
GO:0009664	plant-type cell wall organization	0.00012
GO:0000038	very long-chain fatty acid metabolic pro...	0.00016
GO:0006633	fatty acid biosynthetic process	0.00026
GO:0009831	plant-type cell wall modification involv...	0.00032
GO:0010383	cell wall polysaccharide metabolic proce...	0.00045
GO:0042547	cell wall modification involved in multi...	0.00052
GO:0009751	response to salicylic acid	0.00077
GO:0042742	defense response to bacterium	0.00989

Table 3.1. Analyse de termes GO des gènes dont l'expression est régulée positivement par MYB30 chez des siliques d'Arabidopsis au stade cœur

Les termes GO relatifs à la défense, la paroi cellulaire et aux processus liés aux lipides sont montrés en bleu, vert et rouge, respectivement.

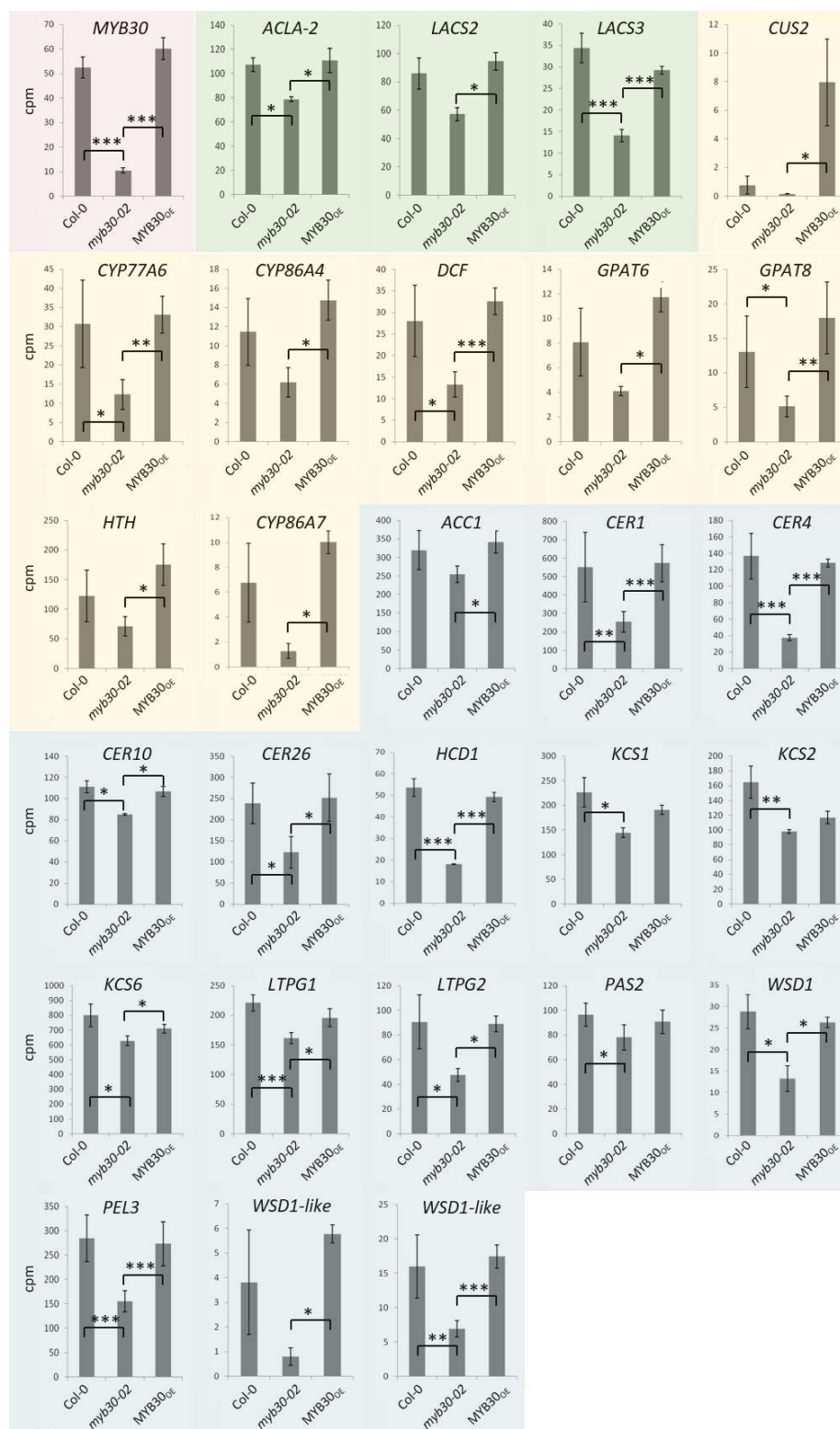


Figure 3.6 Gènes d'Arabidopsis dont l'expression est régulée positivement par MYB30 ayant une fonction relative à la biosynthèse ou au métabolisme des VLCFA/cutine/cires

Les gènes avec un fond jaune, bleu ou vert ont une fonction démontrée ou suspectée respectivement liée à la production de cutine, de cire ou des deux. L'expression de MYB30 est indiquée en rouge. L'expression moyenne des gènes et les valeurs d'erreur-type correspondent à trois réplicats biologiques indépendant de silques des lignées indiquées au stade cœur. Les astérisques indiquent des valeurs d'expression significativement différentes (*, ** et *** signifient des p-values corrigées par FDR < 0.05, <0,001 et <0,0001, respectivement).

Nous avons ensuite analysé les promoteurs de plusieurs gènes de biosynthèse de la cuticule soit (i) identifiés dans l'analyse transcriptomique décrite ci-dessus, (ii) co-exprimés avec *MYB30* pendant l'embryogenèse ou (iii) identifiés comme cibles de *MYB30* pendant l'activation des réponses immunitaires (Raffaele *et al.*, 2008) (Table 3.2). Cette analyse révéla la présence de séquences consensus de liaison MYB dans les promoteurs de tous ces gènes.

Promoteur testé	Identifié dans une analyse RNA-Seq sur siliques	Co-exprimé avec <i>MYB30</i> pendant l'embryogénèse	Identifié dans une analyse micro-array lors de la défense
<i>CER1</i>	✓		
<i>CER4</i>	✓		
<i>CER10</i>	✓	✓	✓
<i>CER26</i>	✓		
<i>CYP96A15</i>		✓	
<i>GPAT4</i>			✓
<i>HCD1</i>	✓	✓	✓
<i>KCR1</i>		✓	✓
<i>KCS1</i>	✓		✓
<i>KCS10/FDH</i>			✓
<i>LACS2</i>	✓		
<i>LTPG1</i>	✓	✓	✓
<i>LTPG2</i>	✓	✓	
<i>WDS1</i>	✓		

Table 3.2. Gènes cibles directs putatifs de *MYB30* dans différents contextes, testés par ChIP

Les gènes écrits en gras ont été trouvés enrichis par *MYB30* dans la Figure 3.7.

Une analyse d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) sur des plantules d'*Arabidopsis* transgéniques 35S:GFP-*MYB30* a été ensuite réalisée afin de déterminer si *MYB30* régule de manière directe l'expression de gènes de biosynthèse de la cuticule. Ces expériences ont été réalisées dans le cadre d'une mobilité de trois mois dans le laboratoire d'Emmanuelle Graciet (Maynooth University, Irlande). Les extraits totaux de protéines du contrôle Col-0 et des plantes 35S:GFP-*MYB30* ont été immunoprécipités à l'aide d'anticorps anti-GFP. Des PCR quantitatives ont été effectuées sur les produits issus du ChIP en utilisant des amorces de part et d'autre, ou proche des séquences consensus de liaison MYB comme indiqué dans la Table Supplémentaire 2.1. Les résultats préliminaires, qui doivent être confirmés, suggèrent que les régions des promoteurs de *CER4*, *CER10*, *GPAT4*, *KCS10/FDH*, *LACS2* et *LTPG2* sont enrichies par *MYB30* (Figure 2.7, Table Supplémentaire 2.1). En outre, les expériences de ChIP avec les plantes contrôles Col-0 ne montrent pas d'enrichissement des mêmes régions par *MYB30*. Bien que des expériences supplémentaires soient en cours dans l'équipe d'Emmanuelle Graciet pour confirmer ces

résultats, ils indiquent que MYB30 pourrait cibler spécifiquement les séquences de promoteurs de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse de la cuticule. Ceci est cohérent avec le fait que MYB30 régule l'expression de gènes reliés à la production de la cuticule pendant l'embryogenèse, comme montré par l'analyse transcriptomique mentionnée précédemment.

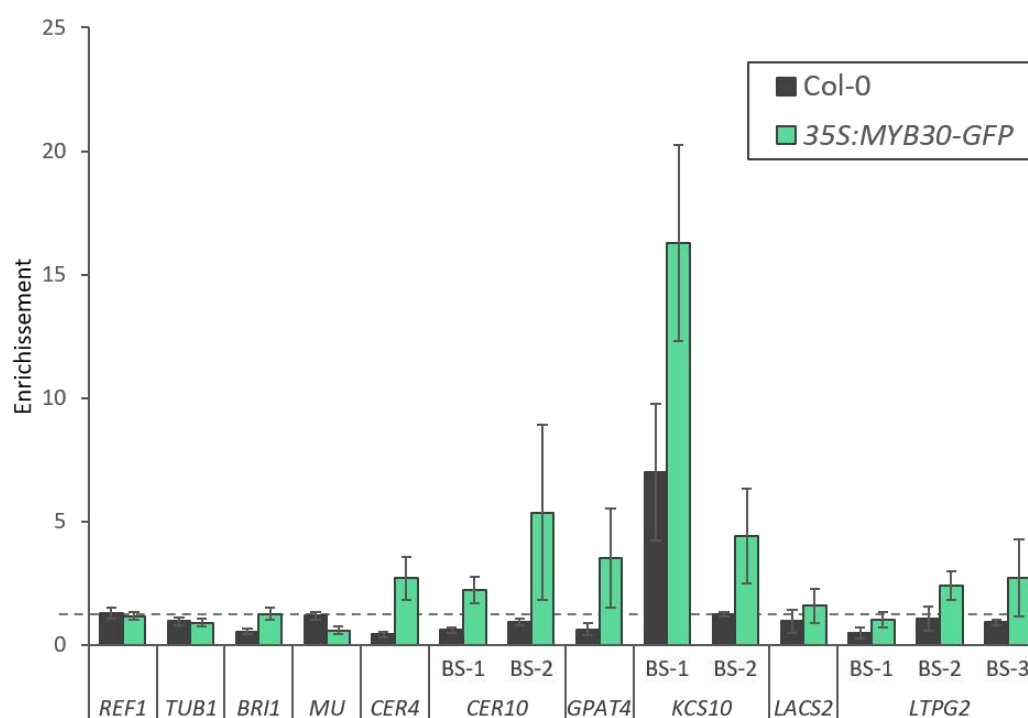


Figure 3.7 Des gènes de biosynthèse de la cuticule pourraient être des cibles directes de MYB30 chez les plantules d'Arabidopsis

Des expériences de ChIP ont été réalisées sur des plantules Col-0 et 35S:GFP-MYB30. L'enrichissement de régions contrôles négatives (*REF1* (*MYB97*), *TUB1* (*TUBULIN*), *BRI1* (*BR INSENSITIVE 1*) et *MU* (un élément transposable) ainsi que de gènes cibles putatifs sélectionnés a été testée par PCR quantitative. Les barres d'erreur indiquent l'erreur-type de trois mesures biologiques indépendantes.

3.1.4. La dérégulation de *MYB30* impacte la production de cutine

Étant donné que MYB30 régule l'expression de gènes de biosynthèse de la cuticule pendant l'embryogenèse, nous avons ensuite analysé la composition de la cuticule de cotylédons de plantules de 5 jours des lignées *myb30-02* et *myb30-67* par chromatographie en phase gazeuse (GC-MS), en collaboration avec Frédéric Domergue et Jérôme Joubès (Laboratoire de Biogenèse Membranaire, Bordeaux). La quantité d'acides dicarboxyliques (DCA) est considérablement réduite à la fois chez les lignées mutantes *myb30-02* et *myb30-67*, dû à une diminution conséquente en 16:2DCA, le composé majoritaire de la cutine. De plus, la quantité de 18:2ωOH est également réduite, impactant la quantité totale d'acides gras oméga-hydroxylés dans les cotylédons (Figure 3.8). Ces résultats indiquent, en accord avec les données d'expression de gènes, que MYB30 est requis pour la production de cutine à des stades développementaux précoces.

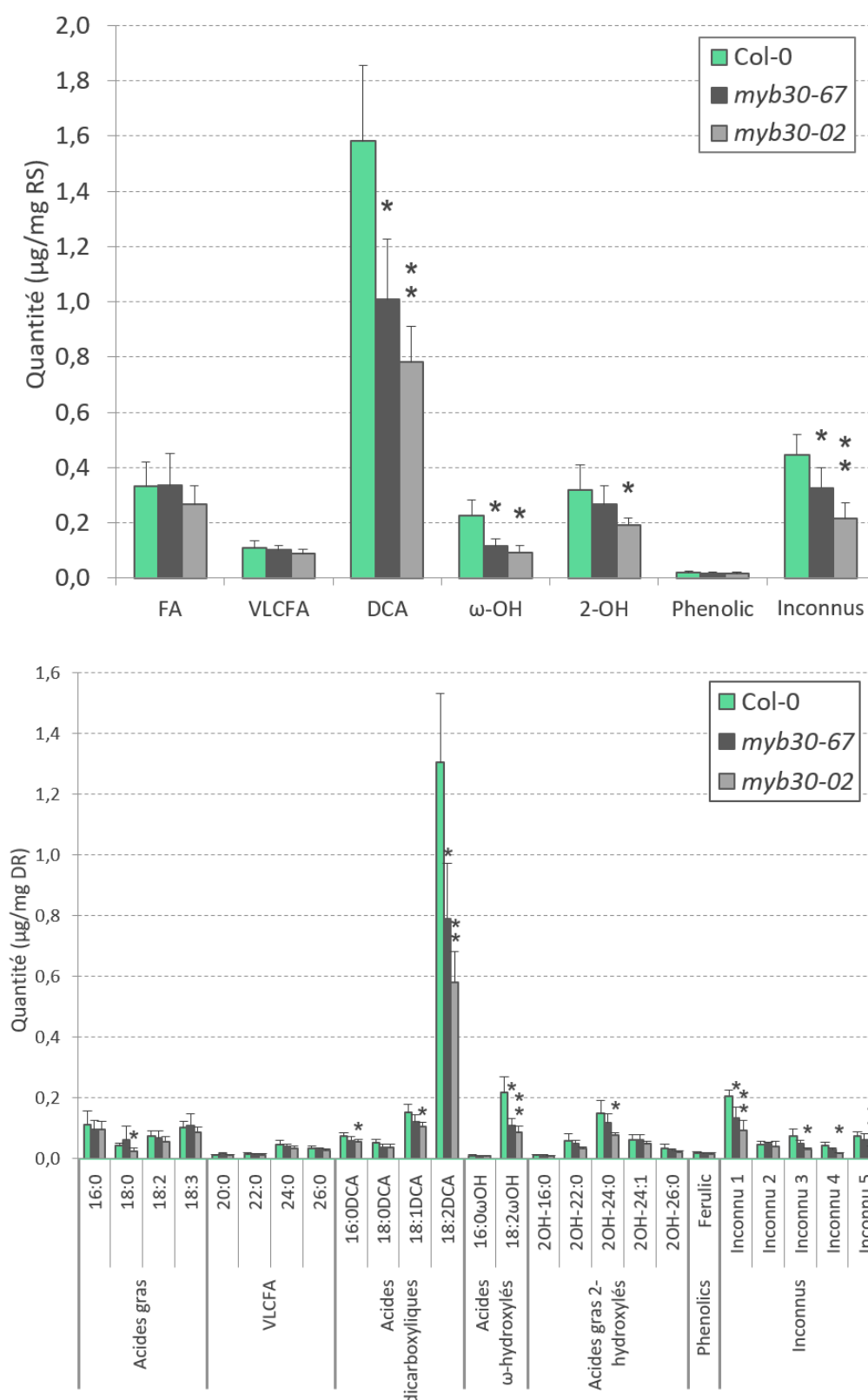


Figure 3.8 Les défauts de perméabilité cuticulaire des mutants *myb30-02* et *myb30-67* sont corrélés avec des changements dans la composition de la cutine

Des plantules de Col-0, *myb30-02* et *myb30-67* ont été cultivées en condition *in vitro* pendant 5 jours sous lumière continue, puis les cotylédons ont été récoltés, délipidés et leur cutine a été analysée. ω OH et DCA signifient respectivement acide oméga-hydroxylé et acide α,ω -dicarboxylique. Les valeurs moyennes sont montrées en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de résidu sec (RS) délipidé $\pm$ écart-type ($n = 4$).

3.1.5. Les expressions de *MYB30* et *GSO2* sont interdépendantes pendant le développement de l'embryon

Une analyse de coefficient de corrélation de Pearson utilisant des données transcriptomiques spécifiques de tissus de la graine à cinq stades de développement différents (Belmonte *et al.*, 2013) a permis d'identifier *GSO2* et *MYB30* comme les gènes les plus fortement corrélés l'un avec l'autre. D'autre part, les données d'expression de gènes provenant de l'analyse RNA-Seq présentée précédemment (voir section 3.1.3) indiquent que l'expression de *GSO2* est significativement plus élevée dans le fond génétique *myb30-02* (Figure 3.9).

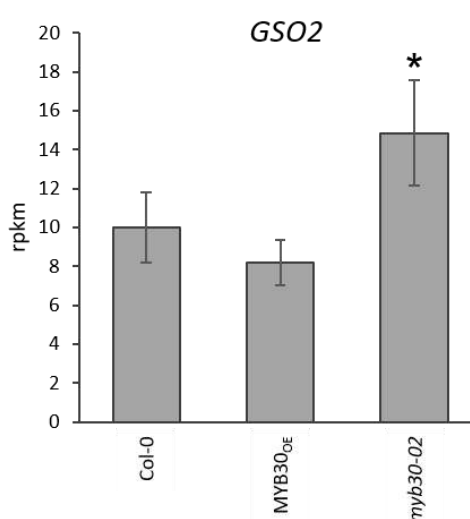


Figure 3.9 Expression de *GSO2* dans les siliques au stade cœur des lignées indiquées

L'expression moyenne des gènes et les valeurs d'erreur-type correspondent à trois réplicats biologiques indépendants de siliques des lignées indiquées au stade cœur. Les astérisques indiquent des valeurs d'expression significativement différentes (* signifie une p-value corrigée par FDR < 0.05).

Dans le but de tester si la mutation de *GSO1/2* affecte l'expression de *MYB30*, Audrey Creff (RDP, Lyon) a réalisé une HIS sur des graines *gso1-1 gso2-1* en utilisant une sonde anti-sens *MYB30*. Cette expérience montre que l'expression de *MYB30* n'est pas détectable dans les cellules épidermiques des embryons *gso1-1 gso2-1* au stade cœur (Figure 3.10). Ce résultat, ajouté au rôle positif de *MYB30* sur la régulation de la biosynthèse de la cuticule, nous a amené à proposer que *MYB30* puisse agir en aval de *GSO1/GSO2* pendant la déposition de la cuticule embryonnaire.



Figure 3.10 L'expression de *MYB30* est régulée négativement chez les embryons *gso1-1 gso2-1*

L'hybridation *in situ* a été réalisée à l'aide d'une sonde antisens pour *MYB30* sur des coupes transversales de graines Col-0 et *gso1-1 gso2-1* au stade cœur. La coloration brune de l'endothélium (la couche cellulaire interne des téguments) est observée chez toutes les graines et représente un artefact admis dans les tissus de graines en développement. Les images ont été gracieusement fournies par Audrey Creff.

Enfin, un chevauchement significatif (44%) a été trouvé entre les cibles transcriptionnelles de *GSO1/2* et *MYB30* dans les siliques entières (Creff *et al.*, soumis; nos données non publiées) renforçant ainsi l'idée que *MYB30* est impliqué dans la formation de la cuticule liée à la défense dépendante de par *GSO1/2* chez les jeunes embryons.

3.1.6. *MYB30*, *GSO1* et *GSO2* agissent dans la même voie pour établir la formation de la cuticule embryonnaire

Afin d'explorer la relation fonctionnelle entre *MYB30*, *GSO1* et *GSO2*, Irene Serrano dans notre équipe a généré les lignées mutantes multiples suivantes: *myb30-67 gso1-1*, *myb30-67 gso2-1* et *myb30-67 gso1-1 gso2-1*. Lors du génotypage de ces lignées pour confirmer la présence des différentes mutations, elle a aussi obtenu les mutants simples *gso1-1* et *gso2-1*.

La perméabilité de ces lignées au BT a ensuite été mesurée. Comme décrit précédemment, les plantules non-étiolées des mutants simples *gso1-1* et *gso2-1* montrent des taux d'absorption BT similaires à Col-0, confirmant la redondance fonctionnelle entre les deux RLK (Tsuwamoto *et al.*, 2008) tandis que les plantules étiolées *gso1-1* affichent une perméabilité légèrement plus élevée au BT. Aucun effet additif n'est observé entre *myb30-67* et *gso1-1* ou *gso2-1* et aucune différence significative n'est détectée dans les défauts de perméabilité cuticulaire entre le triple mutant *myb30-67 gso1-1 gso2-1* et le double mutant *gso1-1 gso2-1* (Figure 3.11 A à C).

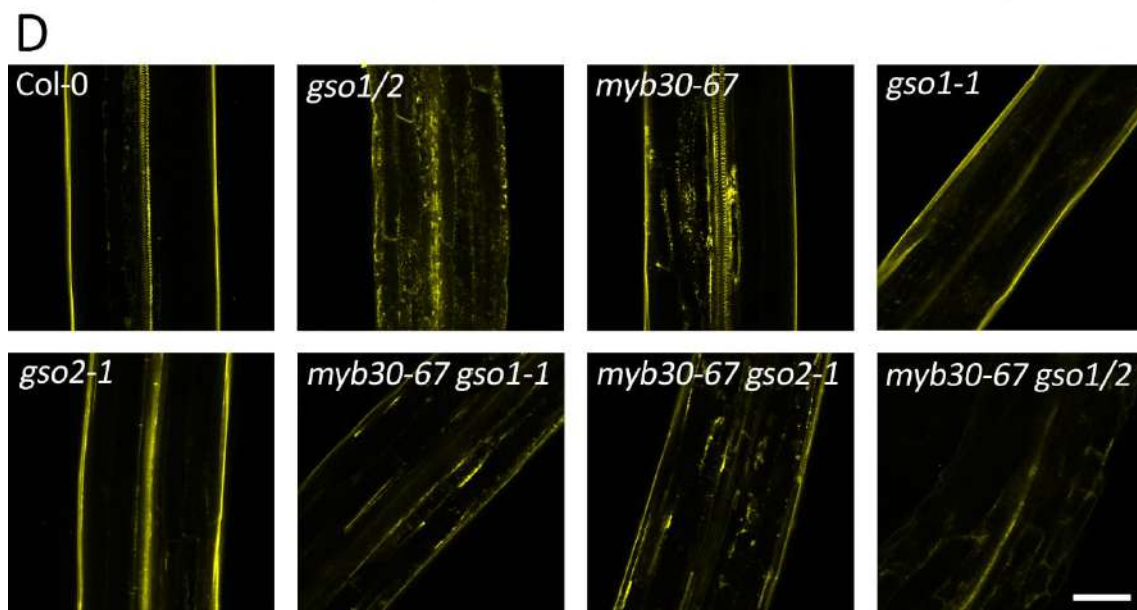
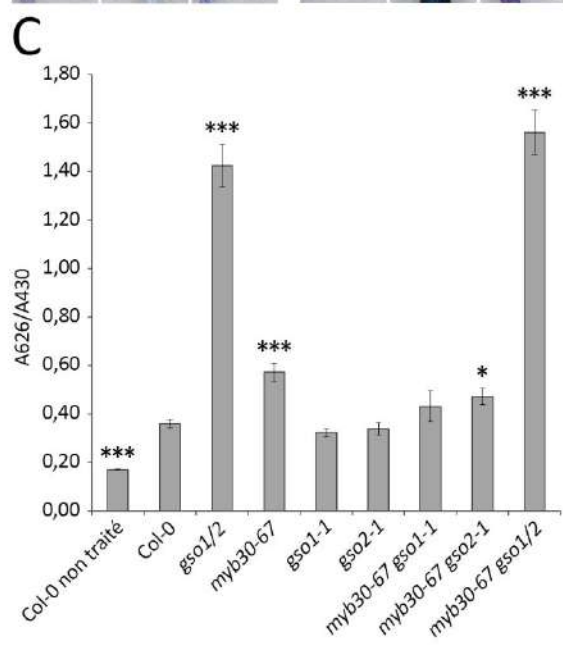
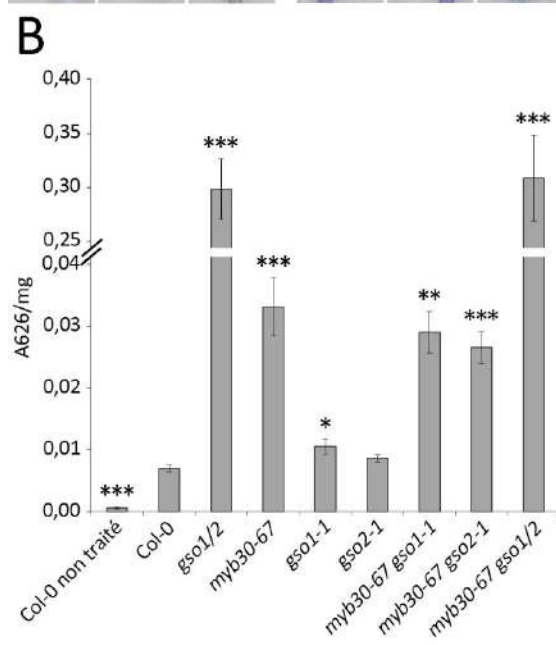


Figure 3.11 La mutation de *MYB30* n'est pas additive avec celles de *GSO1* et *GSO2* pour la perméabilité cuticulaire

(A) Coloration au Bleu de Toluidine de plantules étiolées des lignées indiquées, 3 jours après stratification. Toutes les plantules ont été cultivées sur la même boîte afin de permettre un traitement uniforme. Barre d'échelle = 1 mm. **(B-C)** L'absorption du Bleu de Toluidine chez ces lignées a été quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre chez des plantules étiolées de 3 jours (B) ou des plantules de 7 jours (C). Les barres d'erreur représentent l'erreur type d'au moins cinq réplicats biologiques contenant au moins 20 plantules. Les différences statistiques avec la lignée Col-0 ont été déterminées selon le test de Student (* signifie une p-value < 0.05, ** signifie une p-value < 0.01 et *** signifie une p-value < 0.001). **(D)** Images confocales d'hypocotyles colorés à l'Auramine-O de plantules étiolées, 3 jours après stratification. Toutes les plantules ont été cultivées sur la même boîte afin de permettre un traitement uniforme. Barre d'échelle = 100 µm. Certaines images ont été gracieusement fournies par Irene Serrano.

Après traitement à l'Auramine-O, tous les doubles et triples mutants montrent une coloration à l'intérieur de l'hypocotyle, bien que chez les plantules *myb30-67 gso1-1 gso2-1* cette coloration apparaisse moins intense, peut-être dû à un manque de composés lipidiques cytoplasmiques chez cette lignée. La cuticule de l'hypocotyle du triple mutant est à peine visible, tout comme celle des plantules *gso1-1 gso2-1* (Figure 3.11 D).

En conclusion, les effets de la mutation de *MYB30* ne semblent pas être additifs avec ceux de *GSO1* et *GSO2* en ce qui concerne la formation de la cuticule embryonnaire, suggérant qu'ils agissent probablement dans la même voie génétique.

Site de liaison	Début	Séquence	Fin
<i>CER4</i>	-199	CGTTTGAGTGAGAGAAATAATGCAACAGAG- TACAACCTGACATATCACATATGTGTTACTAAGATTATAGTTT- TAGGCTTTACAAGGTGAAATTAATGTGAGCACCTACCTACAT	-133
<i>CER10</i> BS-1	-445	AAATCGAGTGATCCGGTCAACTAGATAGGAACCAC- CAAAAGTGTTACTCGTTTTTTTTTTGGTATTTGGTT- TAGTCATGTTTAGTTAAACGTAAAGCATTGCAGTATTCGC- TATAGAAAAGAGTGAAATAATGTTACCTAGAAGAGATT- GATTCATGAGCACAAAAACATTAGTT- GCAAACCTTCTACCCCTCACTTGATGACATATGTCCATCGT	-662
<i>CER10</i> BS-2	-26	AGACCAGATGAGGAAATTGAGAGAGATAGAGAGA- CAAGGGAAATTAAATAGAGAGGAAGAAGAAGACGAGATT- GAGCATTGAAGAGGATGTAGTTGGGAGTAGGAGAACTAC- TAACTATCTTCCCACTTATGCGATTAGATTGGGACCATT	-179
<i>GPAT4</i>	-326	TGATTAGGGTATTTATTAGATGATGGAATTTGGTGATACA- TAAATATAATTTGGTCACACGCGGTTGAGTTACTTTCTTTT- GTTGATTGACATGAAAGAAAGTAGTT- TAGTAGTTACACTAAATGGAAGGCTG	-461
<i>KCS10</i> BS-1	-326	GGGATTGGGTTTGGTGGTTGG- TGAGAGGTAGTTAATGTCGCCAACTACTTGACTGGTCG- TAGTTGGAGTGAGTTATGTCACCTCTAATTCCTCCGTTCTAA- TAAGGTGTAGTTTGGATCTTATG	-263
<i>KCS10</i> BS-2	-288	ACTAACCAGATGTCAAAGGATAAAAGATGACCACTTTTT- GACAATTTGACAATTTGTCAATTTGGGGTTTCT- GAATCAGTTCTGTTTTTTTTTTTTTTGAAT- TAAGCTAGTAACTTTGGTTTGGTTAAAAACCGACAGGTTT- GTGGAGAACTTTGGTTTGGTTT	-453
<i>LACS2</i>	-578	ACTGGTTACTATAGTGATAAAGATCCTGATTATGACAGT- GACTGTGAGCTGG- TGAGGTCTAAGAGTACAAAAACAATGATCTAAGTTATCAA	-410

		ACTATAAACTATATAATTTCGAAATATATTAATTTT- GTTAAATCCAAACCAAATTGCATGCAAATGTCAGTTTGT	
<i>LTPG2</i> BS-1	-553	AACATCTCTCTGAAGAAAAACATATCTAGAGTAAATGTTTT- GAAAAAATATTTAACATATATGAACTTTGGTTTTGTTT- GATTTTGGTTCGAAGTGGATTATTTGATGTTTAGAAAGTT- GAATTGTAGATTAT	-689
<i>LTPG2</i> BS-2	-247	GTGGCGAGATCAAATCAGTCGAATAGATAATGTGT- TATGTTTTCTTTGGCTGAGTAAGAAATTATATGTT- GGAAAATTATAAGATTTTTGTGATAGTAT- TATGAAAACCATCAGAATTACAATCTGTACCATCTCT	-384
<i>LTPG2</i> BS-3	-894	ATCAAAATCTATTTTAAAGCCTAAATATAAT- TTCCATCTCCATGTGTACCGACCTTTGTGTGATTGACTATT- GAGTAGGCAGTTGATACGTTGGAAAGCGTTTGA	-1000

Table Supplémentaire 3.1 Séquences des amplicons générés lors des expériences de ChIP

Les séquences surlignées représentent les sites consensus de liaison MYB. Les séquences sous-lignées indiquent les amorces utilisées pour les expériences de ChIP-qPCR.

3.2. Discussion

La cuticule est une couche hydrophobe complexe qui recouvre les surfaces aériennes de la plante, et qui a de nombreuses fonctions essentielles, non seulement au niveau physiologique à travers la limitation des pertes en eau et la résistance aux agents pathogènes, mais aussi au niveau développemental, agissant comme signal morphogénétique et empêchant la fusion d'organes durant l'organogenèse (Nawrath, 2006; Ingram and Nawrath, 2017). Les voies de biosynthèse de la cuticule et leur régulation commencent à être bien caractérisées chez la plante adulte. En revanche, les mécanismes de régulation qui régissent sa biosynthèse *de novo* restent peu connues et ce n'est que relativement récemment que des études ont mis à jour une voie de régulation de la cuticule embryonnaire (Xing *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2008).

3.2.1. Un nouveau rôle pour MYB30 dans la biosynthèse de la cuticule embryonnaire

Lors des réactions immunitaires, le FT MYB30 régule positivement l'expression de gènes du complexe FAE et la production de cires cuticulaires (Raffaele *et al.*, 2008). De manière intéressante, *MYB30* semble exprimé durant les stades précoces de l'embryogenèse, correspondants au début de la biosynthèse de cuticule. De plus, certains gènes cibles de MYB30 identifiés chez la plante adulte, sont également exprimés au même moment du développement embryonnaire, tout comme *GSO1* et *GSO2*, codant pour deux RLK impliquées dans une voie spécifique de la formation de cuticule embryonnaire.

Sur la base de ces données, nous avons cherché à déterminer si MYB30 joue un rôle dans la formation de la cuticule embryonnaire. Pour cela, nous avons tout d'abord confirmé l'expression de *MYB30* lors du développement de l'embryon, et nous avons pu déterminer plus spécifiquement que *MYB30* est exprimé dans les cellules épidermiques des embryons d'*Arabidopsis* du stade globulaire jusqu'au stade mature, un profil d'expression spatial et temporel cohérent avec un rôle dans la formation de la cuticule. En effet, la production de la cuticule commence au stade globulaire (Creff *et al.*, soumis) et continue très certainement tant que l'embryon grandit.

Des modifications dans la composition ou la structure de la cuticule peuvent mener à une augmentation de la **perméabilité** des parties aériennes de la plante (Tanaka *et al.*, 2004). Par exemple, des mutations dans des transporteurs ABC (Fabre *et al.*, 2016), l' α/β hydrolase BDG (Kurdyukov, Faust, Nawrath, *et al.*, 2006) ou des enzymes de biosynthèse de lipides (Beaudoin *et al.*, 2009) sont associées avec des changements dans la perméabilité de la cuticule. Dû à la localisation épidermique de MYB30 et à son rôle potentiel dans la formation de la cuticule, l'implication de MYB30 dans la perméabilité de la cuticule fut par la suite évaluée par différentes méthodes. Par l'utilisation du colorant hydrophile Bleu de Toluidine et de la sonde lipophile Auramine-O (Figures 3.3 et 3.4), nous avons pu montrer que MYB30 est nécessaire à l'intégrité de la cuticule de jeunes plantes. L'Auramine-O est moins fréquemment utilisé que le BT pour évaluer la perméabilité de la cuticule, mais permet une visualisation directe de cette dernière. Par exemple,

grâce à ce colorant, Fiume *et al.* observent des discontinuités, voire même des fragments de cuticule qui se détachent dans la cuticule d'hypocotyles de jeunes plantules d'*Arabidopsis* qui n'expriment plus le gène *TWISTED SEED1* (*TWS1*), un gène qui code pour une petite protéine localisée dans le réticulum endoplasmique (Fiume *et al.*, 2016). En comparaison, le phénotype des mutants *myb30* est moins fort, mais peut s'expliquer par le rôle essentiel que joue *TWS1* sur la biosynthèse de la cuticule, et par la copie unique de ce gène dans le génome d'*Arabidopsis*, suggérant l'absence de redondance fonctionnelle. Cela suggère qu'il existe une redondance partielle d'autres FT avec *MYB30* pour le contrôle de l'activation des gènes de biosynthèse de la cuticule. En effet, les lignées mutées pour *MYB30* montrent un phénotype modéré, équivalent à celui des plantules *ale1-4*, mais plus faible que celles des plantules *gso1-1 gso2-1*.

Une différence de phénotype est notable entre les deux lignées T-DNA *myb30-02* et *myb30-67*: la cuticule de la première apparaît moins perméable que celle de la seconde chez les plantules étiolées. Ceci peut s'expliquer par le fait que bien que chez *myb30-67*, l'expression de *MYB30* soit plus élevée que chez *myb30-02*, l'insertion T-DNA de *myb30-67* étant dans le deuxième exon, la protéine produite par cette lignée n'est vraisemblablement pas fonctionnelle, car elle ne contient pas un domaine d'activation MYB complet (Figure 3.12). En revanche, chez la lignée *myb30-02*, bien que l'expression du gène *MYB30* soit fortement réduite, elle n'est pas complètement abolie (il reste jusqu'à environ 20% d'expression), et l'insertion ADN-T étant située dans le promoteur du gène *MYB30*, la structure de la protéine *MYB30* potentiellement produite n'est vraisemblablement pas altérée (Figure 3.12).

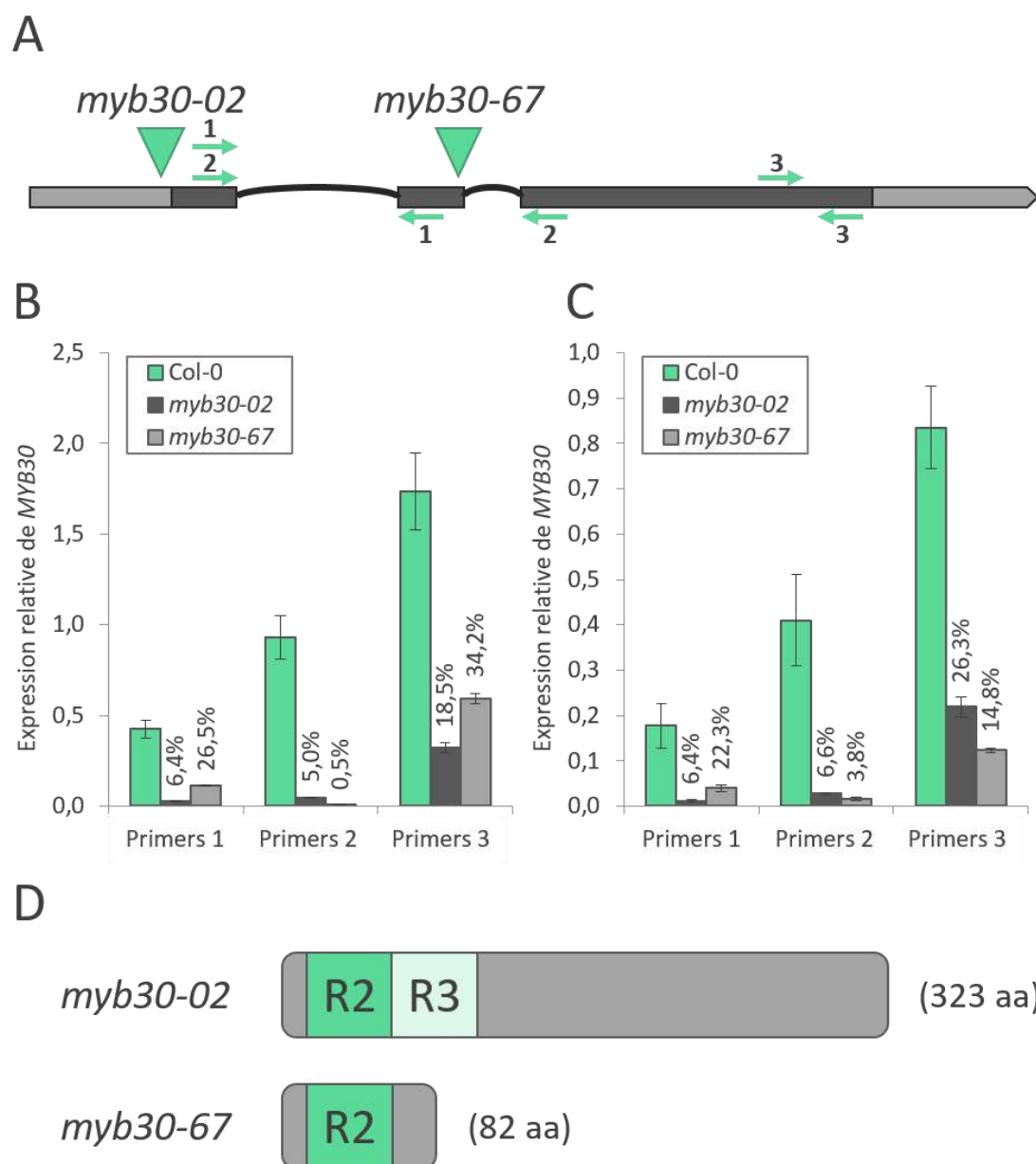


Figure 3.12 Position des insertions ADN-T des lignées mutantes *myb30-02* et *myb30-67* et analyse d'expression de *MYB30* dans les conditions utilisées pour les expériences de Toluidine Blue

(A) Sites d'insertions ADN-T de *myb30-02* et *myb30-67*. Les rectangles gris clairs et gris foncés représentent respectivement les régions UTR et les exons. Les lignes représentent les introns. Les amorces utilisées dans les parties B et C de la figure sont représentées par des flèches. (B-C) L'expression de *MYB30* relative à celle du gène de ménage *MON1* a été déterminée par RT-qPCR pour des plantules étiolées de 3 jours (B) ou des plantules de 7 jours (C). Les résultats représentent les valeurs moyennes $\pm$ SE (n=3). Les pourcentages d'expression de *MYB30* par rapport au sauvage sont indiqués sur le graphe. (D) Structure des protéines *MYB30* prédites pour être produites par les lignées *myb30-02* et *myb30-67*. R2 et R3 représentent les répétitions du domaine MYB, caractéristiques des FT MYB de type R2R3.

La surface des cotylédons d'*Arabidopsis* augmentent d'environ 50 fois dans les six premiers jours après semis (Tsukaya *et al.*, 1994). Par conséquent, les cotylédons de plantules doivent produire une cuticule *de novo* pour couvrir leur surface en permanence.

Certaines études suggèrent que la capacité à former la cuticule, acquise pendant la formation de la graine, est requise pour la formation d'une cuticule continue qui recouvre les plantules en période de croissance rapide (Tanaka *et al.*, 2001). Ces données renforcent l'idée que MYB30 est requis pour la formation de la cuticule non seulement chez les jeunes plantules mais aussi lors de **l'embryogenèse**. En effet, à la surface des cellules épidermiques des embryons *myb30-67* au stade cœur et torpille, la cuticule est discontinue, présentant des "trous". Le processus de dépôt de la cuticule *de novo* n'a été décrit pour la première fois que très récemment (Creff *et al.*, soumis), et montre que chez l'embryon sauvage Col-0, ce dépôt se fait par "*patches*" séparés, puis les discontinuités laissées sont comblées au début du stade cœur. Comme observé pour la perméabilité des hypocotyles, le mutant *myb30-67* semble moins affecté dans le dépôt de cuticule embryonnaire que le double mutant *gso1-1 gso2-1* et présente un phénotype similaire à celui du mutant *ale1-4* (voir chapitre 2).

La cuticule à la surface de l'embryon n'est pas la seule couche cuticulaire de la graine et à l'inverse de la cuticule à la surface des organes aériens de la plante, **les cuticules de la graine** sont bien moins comprises. Tout d'abord, une cuticule épaisse a été mise en évidence à l'interface entre l'albumen et les téguments, qui semble présente dès les premières étapes après la fécondation (Beeckman *et al.*, 2000). Chez le mutant *bdg*, l'ultrastructure de cette cuticule est modifiée, et apparaît plus perméable au BT que celle du sauvage (De Giorgi *et al.*, 2015). Cependant, l'origine de cette cuticule associée à l'albumen reste incertaine, et le fait que de nombreux gènes clés pour la biosynthèse de la cuticule soient exprimés dans l'endothélium (une couche cellulaire épidermique donc pré-programmée à produire une cuticule) et absents de l'albumen périphérique (Winter *et al.*, 2007; Bassel *et al.*, 2008), suggère que cette cuticule est produite au moins en grande partie par l'assise cellulaire la plus interne des téguments. Plusieurs rôles ont été proposés pour cette cuticule associée à l'albumen, dans la germination, la viabilité et la dormance de la graine (De Giorgi *et al.*, 2015). Cependant, la contribution des autres couches cuticulaires de la graine dans ces processus reste mal connue et il est aujourd'hui difficile d'attribuer clairement une fonction à cette cuticule particulière. D'autre part, les téguments de la graine étant le résultat de la fusion de deux surfaces épidermiques, il n'est pas surprenant d'observer des traces de cutine entre les parois cellulaires des téguments internes et externes juste après la fécondation, bien que ces dépôts cuticulaires semblent fragmentés (Creff *et al.*, 2015). Enfin, à la surface des graines matures d'*Arabidopsis*, on retrouve également une couche de subérine (Yadav *et al.*, 2014; Gou *et al.*, 2017), et à nouveau, étant donné l'origine épidermique des téguments, il est probable qu'une cuticule y soit aussi présente. Malheureusement, peu d'études ont été menées sur l'ultrastructure de la surface du manteau de la graine pendant son développement, et très peu de choses sont connues sur ces couches lipidiques externes (Ingram and Nawrath, 2017).

De manière intéressante, des données indiquent que *MYB30* est exprimé dans les **téguments** de la graine, ainsi que certains des gènes cibles de *MYB30* tels que *CER10*, *HCD1*, *LTPG1*, *LTPG2*, *KCR1*, *KCS2* et *PAS2* (Figure 1.24; Belmonte *et al.*, 2013), suggérant un rôle

pour le FT dans la synthèse d'une ou plusieurs couches cuticulaires d'origine maternelle de la graine. En accord avec cette hypothèse, des données générées dans notre équipe indiquent que les lignées *myb30* semblent plus perméables au chlorure de Tetrazolium, un composé couramment utilisé pour estimer la perméabilité des téguments des graines. D'autres résultats qui sont en cours de confirmation dans notre équipe suggèrent que dérégulation de l'expression de *MYB30* affecte des caractéristiques morphologiques telles que la taille, la forme et le poids de la graine (Nolwenn Guéguen, données non publiées). La poursuite de ces travaux représente une perspective intéressante, qui permettrait de compléter les résultats présentés dans cette thèse, et d'avoir une vision plus complète du rôle de *MYB30* dans la graine.

Les cellules épidermiques forment un tissu protecteur principalement dédié à la production et à la sécrétion de la cuticule qui à son tour forme une couche continue qui recouvre l'épiderme. Par conséquent, des changements dans le métabolisme ou le transport des composés cuticulaires sont souvent associés avec des défauts morphologiques de l'épiderme, plus facilement repérables sur les cellules spécialisées telles que les **stomates**. Par exemple, comme évoqué en introduction, les cotylédons des plantules *gso1-1 gso2-1* montrent une augmentation de leur indice stomatal, ainsi qu'une distribution anormale, avec plusieurs stomates en contact, alors qu'ils sont normalement espacés d'une cellule au moins (Tsuwamoto *et al.*, 2008). Les mêmes observations ont été faites chez les mutants d'*Arabidopsis* *cer1* et *cer6* (Gray *et al.*, 2000), ou chez les mutants *cer-g* de l'orge (Zeiger, 1972). On pourrait donc s'attendre à un phénotype similaire chez les mutants *myb30* et il sera intéressant de vérifier ce point dans un futur proche.

3.2.2. *MYB30* active l'expression de gènes de biosynthèse de la cuticule pendant l'embryogenèse

Pour aller plus loin dans la compréhension des bases moléculaires sous-jacentes à ce nouveau rôle de *MYB30* sur la formation de la cuticule, une analyse RNA-Seq fut menée dans notre équipe sur des siliques de plantes d'*Arabidopsis* dérégulées pour l'expression de *MYB30*. Par cette approche transcriptomique nous avons montré que parmi les gènes cibles de *MYB30* durant le développement, un nombre significatif d'entre-eux sont reliés à la formation de la cuticule. De manière plus directe, nos données préliminaires indiquent que la protéine *MYB30* serait capable de se lier aux promoteurs de certains gènes de la voie de biosynthèse de la cuticule, et d'activer leur expression. Ces résultats démontrent que *MYB30* régule l'expression de gènes de biosynthèse de la cuticule lors des stades de développement précoce de la plante.

Parmi les gènes identifiés comme cibles potentielles de *MYB30* par RNA-Seq ou ChIP-qPCR, on retrouve majoritairement des gènes impliqués dans la production des **cires cuticulaires** (*CER1*, *CER4*, *CER26*, *LTPG1*, *LTPG2*, et *WSD1*) et plus particulièrement des gènes du **complexe FAE** (*CER10*, *HCD1*, *KCS1*, *KCS2*, *KCS6*), mais aussi des gènes impliqués dans la biosynthèse de **cutine** (*GPAT4*, *GPAT6*, *CUS2*, *CYP86A7*), et des gènes situés **en amont** de la voie de biosynthèse de la cuticule (*ATP CYTRATE LYASE-A2*, *LACS2*, *LACS3*),

suggérant que MYB30 pourrait agir sur la production des deux grandes catégories de molécules composant la cuticule, à différents niveaux de la voie (Figure 3.13).

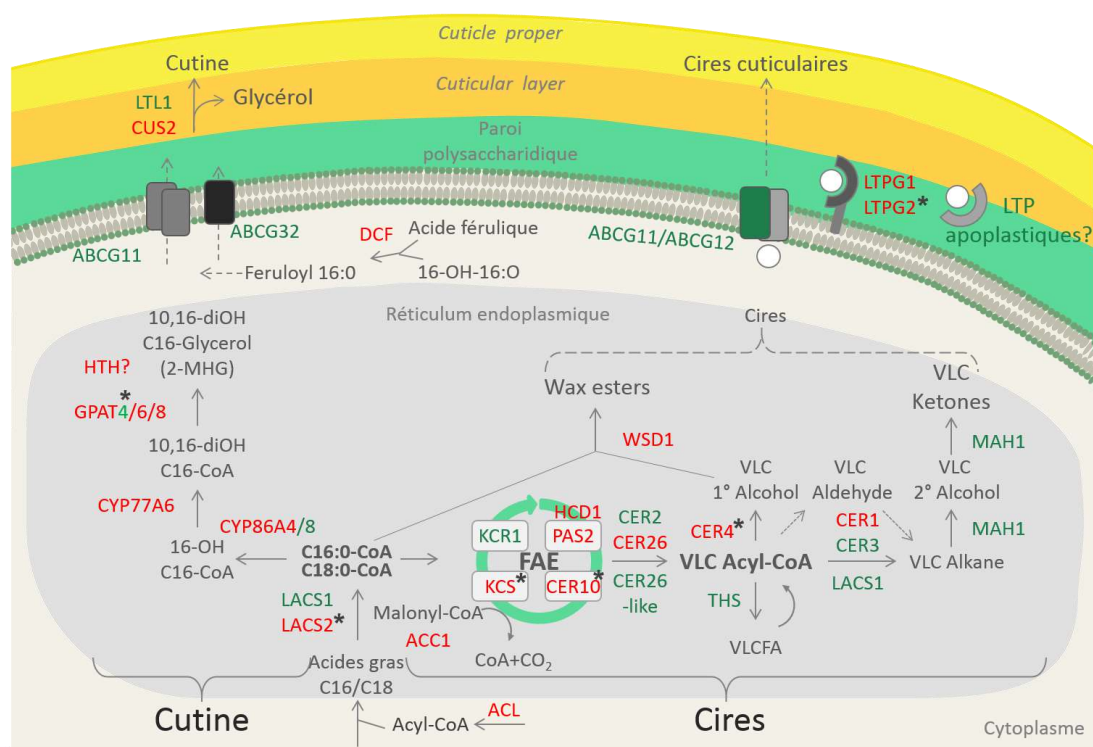


Figure 3.13 Les gènes cibles de MYB30 pendant l'embryogenèse sont situés à différents niveaux de la voie de biosynthèse de la cuticule

Les gènes cibles de MYB30 sont représentés en rouge, les autres gènes de la voie en vert, et les composés cuticulaires en gris. Les gènes identifiés comme potentiellement cibles directes dans l'analyse ChIP-qPCR sont désignés par des astérisques.

De manière intéressante, un nombre important de gènes cibles de MYB30 identifiés par l'analyse RNA-Seq appartiennent à des catégories fonctionnelles liées à l'immunité, suggérant ainsi que MYB30 pourrait conserver son rôle d'**activateur des défenses** au cours de l'embryogenèse. Bien que peu de choses sont connues sur les mécanismes de défense de l'embryon d'*Arabidopsis*, des travaux sont en cours dans l'équipe afin d'étudier le rôle potentiel de MYB30 dans ces processus. En outre, plusieurs gènes cibles de MYB30 après inoculation bactérienne des feuilles sont retrouvés comme gènes cibles au cours du développement de l'embryon, tels que *CER10*, *HCD1*, *KCS1*, *KSC2*, *LTPG1* et *PAS2*, indiquant que MYB30 pourrait garder une certaine affinité pour un même set de gènes dans différents contextes.

Comme évoqué en introduction, le proche homologue de MYB30, MYB96, régule également la production de composés cuticulaires, notamment lors de la réponse à la sécheresse. Seo *et al.*, ont montré la liaison de **MYB96** aux promoteurs de certains gènes de la voie de biosynthèse des cires, et parmi ceux-ci certains sont réprimés chez les siliques du mutant *myb30-02*, tels que *CER1*, *KCS2*, *KCS6*, et *WDS1*. Ces données suggèrent que

MYB30 et MYB96 partagent une liste de gènes cibles communs, mais il est utile de mentionner que *MYB96* présente une expression extrêmement faible dans l'embryon d'*Arabidopsis* (Figure 3.14; Belmonte *et al.*, 2013), ce qui rend l'hypothèse de MYB30 et MYB96 collaborant pour la régulation de la production de cuticule embryonnaire très peu probable. Cependant, la possibilité que MYB30 et MYB96 puissent co-réguler la production de composés cuticulaires dans d'autres couches cuticulaires de la graine reste ouverte.

En revanche, **MYB94**, un autre membre de la sous-famille S1 des FT MYB de type R2R3, est exprimé au stade cœur (Figure 3.14; Belmonte *et al.*, 2013) et des travaux ont prouvé que MYB94 régule la biosynthèse des cires cuticulaires de manière redondante avec MYB96 (Lee and Suh, 2015; Lee *et al.*, 2016). Divers exemples de la littérature montrent que dans certains cas deux ou trois FT phylogénétiquement proches agissent en synergie pour réguler des processus développementaux. Par exemple WRINKLED1 (WRI1), WRI3 et WRI4 co-régulent la synthèse d'acides gras et de cutine dans la fleur (To *et al.*, 2012), ou encore MYB16 et MYB106 régulent ensemble le développement cuticulaire, la différenciation cellulaire de l'épiderme et la maturation des trichomes (Oshima *et al.*, 2013). Il est donc tentant d'imaginer que MYB30 et MYB94 pourraient agir de concert pour la régulation de la cuticule chez l'embryon.

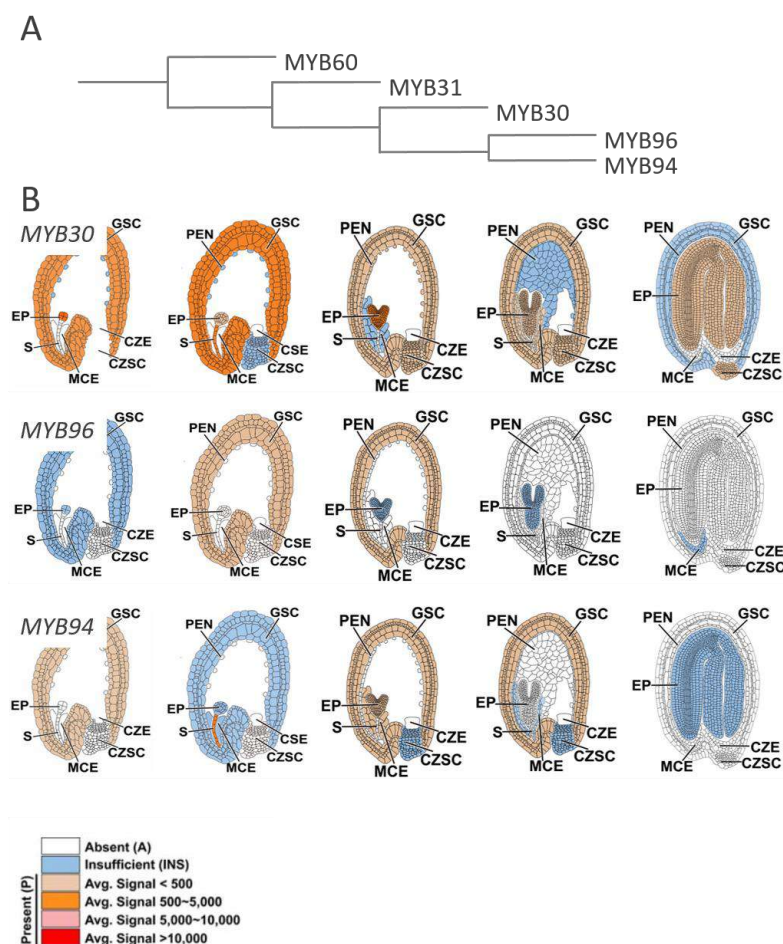


Figure 3.14 Les deux plus proches homologues de MYB30 sont également exprimés dans la graine **(A)** Représentation schématique des relations phylogénétiques entre les membres du sous-groupe S1 de protéines MYB-R2R3 (Adapté de Dubos *et al.*, 2010). **(B)** Expression de MYB96 et MYB94 dans les différents tissus et au cours du développement de la graine d'après seedgenenetwork.net (Belmonte *et al.*, 2013). Les couleurs correspondent à l'intensité de signal moyen des réplicats biologiques, comme indiqué en bas. CZE : vésicule de l'albumen chalazal ; CZSC : chalaze ; EP : Embryon ; GSC : Téguments ; MCE : albumen mycropytaire ; PEN : albumen périphérique ; S : suspenseur.

Comme évoqué en introduction, des interacteurs protéiques régulent l'activité de MYB30, dans différents contextes (voir section 1.5.6 de l'introduction). De façon intéressante, plusieurs de ces interacteurs sont exprimés au cours du développement de la graine, et plus particulièrement dans l'embryon. Parmi eux, l'E3 Ub-ligase **MIEL1** (Figure 3.15), qui régule négativement l'accumulation de MYB30 lors des réactions de défense, a récemment été identifiée comme un régulateur négatif de la biosynthèse des cires de la hampe florale médiée par MYB30 et MYB96 (Gil *et al.*, 2017). On pourrait donc envisager que certains interacteurs connus de MYB30, et plus particulièrement MIEL1, soient également capables de réguler l'activité de ce FT dans la graine, afin de contrôler ses fonctions de régulateur de la biosynthèse de cuticule embryonnaire.

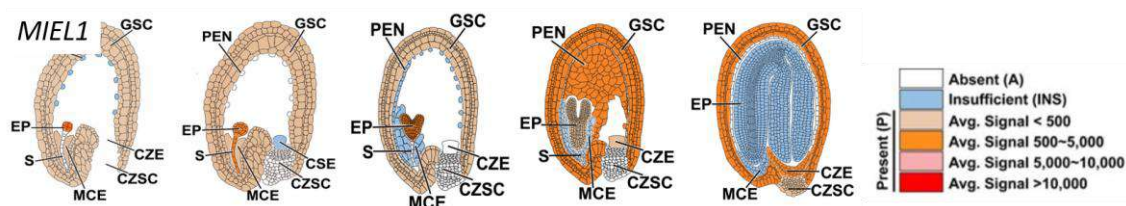


Figure 3.15 Le gène *MIEL1*, codant pour un régulateur protéique de MYB30 lors des réponses de défense, est exprimé dans la graine

Expression de *MIEL1* dans les différents tissus et au cours du développement de la graine d'après seedgenenetwork.net (Belmonte *et al.*, 2013). Les couleurs correspondent à l'intensité de signal moyen des réplicats biologiques, comme indiqué à droite. CZE : vésicule de l'albumen chalazal ; CZSC : chalaze ; EP : Embryon ; GSC : Téguments ; MCE : albumen mycropytaire ; PEN : albumen périphérique ; S : suspenseur.

Dans notre analyse RNA-Seq, un certain nombre de gènes sont réprimés chez le mutant *myb30-02* mais ne sont pas surexprimés chez *MYB30^{OE}* comme l'on pourrait s'y attendre (Figure 3.6). Cela pourrait s'expliquer par le fait que le niveau d'expression de *MYB30* chez la lignée *MYB30^{OE}* n'est pas beaucoup plus élevé que celui de Col-0, et ne suffit pas à induire une expression des gènes cibles significativement supérieure à celle causée par l'expression endogène de *MYB30* (Figure 3.6). Une lignée surexprimant *MYB30* à des taux plus élevés a récemment été obtenue dans l'équipe et sera utilisée pour valider les résultats obtenus.

Une contrainte importante à l'analyse des résultats du RNA-Seq est que ce dernier a été réalisé sur des siliques entières et non pas avec des graines isolées. En effet, la dissection des siliques pour en extraire les graines aurait pu modifier l'expression de gènes en réponse à la blessure créée. Par conséquent, il est difficile d'attribuer l'effet observé sur l'expression des gènes à la dérégulation de l'expression de *MYB30* spécifiquement dans la graine, et encore moins au niveau de l'épiderme de l'embryon. Afin de pallier ce problème, un projet de micro-dissection laser suivie d'une analyse RNA-Seq est en cours dans l'équipe en collaboration avec Gwyneth Ingram (RDP, Lyon) et Bertrand Dubreucq (IJPB, Versailles), afin d'analyser avec précision l'effet de *MYB30* sur l'activité des gènes dans l'épiderme de l'embryon au stade cœur.

L'expérience de ChIP-qPCR quant à elle n'a pas été réalisée sur des embryons, mais sur des jeunes plantules, un stade de développement proche de l'embryogenèse, durant lequel *MYB30* est encore fortement exprimé dans les cotylédons de la lignée sauvage. Plusieurs raisons font que les résultats générés par cette expérience sont préliminaires. Tout d'abord, seulement trois réplicats ont pu être réalisés et tous les sites de liaison MYB potentiels identifiés dans les promoteurs n'ont pas pu être testés, dû aux problèmes techniques rencontrés lors de la réalisation de cette méthode délicate, et aux faibles rendements d'ADN obtenus. Ensuite, chaque expérience a été réalisée en utilisant une lignée 35S:GFP-MYB30 indépendante, créant de la variabilité dans les niveaux d'expression de *MYB30*. Enfin, les taux d'enrichissement obtenus pour les promoteurs étudiés (Figure 3.7) sont relativement faibles comparés à ceux qui peuvent être obtenus dans des expériences similaires (enrichissement de plus de 30 fois par Goslin *et al.* par exemple, (Goslin *et al.*, 2017) mais ils sont égaux ou voire plus élevés que ceux obtenus

par Seo *et al.* ou Lee *et al.* notamment (Seo *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2016). Pour ces différentes raisons, une répétition de cette expérience est actuellement en cours dans le groupe d'Emmanuelle Graciet (Maynooth University), en utilisant une lignée exprimant fortement *MYB30*, que nous avons identifiée lors de ces expériences préliminaires. Cette expérience devrait permettre de connaître avec plus de précision le rôle de *MYB30* en tant que régulateur de la biosynthèse de cuticule embryonnaire.

3.2.3. MYB30 régule la production de cutine

MYB30 étant capable de moduler les niveaux d'ARN messagers codant pour des enzymes de biosynthèse de la cuticule, nous avons ensuite observé son rôle sur les produits finaux de la voie, à savoir les différentes molécules lipidiques produites par ces enzymes.

L'analyse de spectrométrie de masse a révélé que *MYB30* joue principalement un rôle sur la production de 18:2 ω OH et de 18:2 DCA. Dans les feuilles et les tiges d'*Arabidopsis*, les réactions d'oxydation convertissant les acides gras en acides ω -hydroxylés sont catalysés principalement par les enzymes de la famille des cytochromes P450 LCR (*CYP86A8*) et *ATT1* (*CYP86A2*) (Wellesen *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2004). Les mécanismes responsables de la conversion suivante en DCA restent incertains mais pourraient faire intervenir des oxydoréductases telles que *HOTHEAD* (**HTH**), bien que *HTH* ne soit pas spécifiquement exprimé dans l'épiderme (Krolikowski *et al.*, 2003; Kurdyukov, Faust, Trenkamp, *et al.*, 2006). Dans les fleurs d'*Arabidopsis*, **CYP86A4** et **CYP77A6** sont les hydroxylases respectivement en position ω et en milieu de chaîne, responsable de la formation du 10,16-dihydroxypalmitate, le précurseur principal de la cutine florale (Li-Beisson *et al.*, 2009). De manière cohérente, chez le mutant *myb30-02*, les expressions de *HTH*, *CYP86A4* et *CYP77A6* sont significativement diminuées par rapport au sauvage (Figure 3.6), ce qui pourrait expliquer les quantités réduites de 18:2 ω OH et 18:2 DCA observées chez ce mutant. La forte diminution de ces composés chez les mutants *myb30* supporte l'idée que *MYB30* est un régulateur important de la production de la cuticule. De plus, chez *Arabidopsis*, le 18:2 DCA est le composé majoritaire de la cutine des feuilles et des tiges, ce qui sous-entend que *MYB30* joue un rôle conséquent sur la structure de la cutine. En accord avec cela, on retrouve parmi les cibles potentielles (directes et indirectes) de *MYB30*, d'autres gènes impliqués dans la production de cutine tels que **CUS2**, *DEFICIENT IN CUTIN FERULATE* (**DCF**), **GPAT4**, **GPAT6**, **GPAT8**, et **LACS2** (Figures 3.6 et 3.7). En effet, *CUS2* est une protéine découverte récemment de la famille des GDSL, homologue de la protéine de tomate CD1, et qui est requise pour la formation des crêtes cuticulaires à la surface des sépales d'*Arabidopsis* (Hong *et al.*, 2017). *DCF* est une acyltransferase cytoplasmique, qui transfère un acide férulique aux acides ω -hydroxylés avant leur export vers l'extérieur de la cellule (Rautengarten *et al.*, 2012). Enfin, *GPAT4* et *GPAT6* sont des glycerol-3-phosphate acyltransferases responsables pour la synthèse des polyesters de cutine, respectivement dans les tiges et les feuilles, et les fleurs d'*Arabidopsis* (Li *et al.*, 2007; Li-Beisson *et al.*, 2009), tandis que *LACS2* est une acyltransferase responsable pour la biosynthèse des monomères de cutine C16 (Lü *et al.*, 2009).

En plus de ces protéines clairement identifiées comme jouant un rôle dans la biosynthèse de cutine, on retrouve parmi les gènes régulés par MYB30 dans les siliques d'*Arabidopsis*, **CYP86A1**, un gène codant pour une enzyme de la famille des cytochromes P450 qui est impliqué dans la biosynthèse de subérine, une couche hydrophobe proche de la cutine (Höfer *et al.*, 2008). De même, on retrouve également **LACS3**, que l'on suppose être impliqué dans la synthèse de la cuticule chez *Arabidopsis*, dû à sa forte expression dans les cellules épidermiques (Suh *et al.*, 2005) et à son homologie avec *LACS1* et *LACS2*, codant pour deux enzymes clés pour la production de monomères de cutine (Schnurr *et al.*, 2004; Lü *et al.*, 2009; Weng *et al.*, 2010).

Enfin, la production de cires cuticulaires étant fortement réprimée dans les conditions *in vitro* que nous avons utilisées, seule la production de cutine a pu être analysée dans nos travaux. Par conséquent, malgré l'activation par MYB30 de gènes codant pour des enzymes de la voie des cires (Figures 3.6 et 3.7), son rôle sur la production des lipides constituant les cires cuticulaires dans le développement n'a pas pu être déterminé. À l'inverse, lors de l'étude du rôle de MYB30 dans l'immunité (Raffaele *et al.*, 2008), seule la production de cires cuticulaires a été analysée sur les plantes adultes, ne nous permettant pas de comparer l'action de MYB30 sur la production de cutine entre développement et défense.

3.2.4. MYB30, un nouveau composant de la voie ECF en aval de GSO1/2?

La voie ECF est une voie de signalisation spécifique de la graine, responsable de la régulation de la biosynthèse de la cuticule embryonnaire (Delude *et al.*, 2016). GSO2 est un acteur moléculaire majeur de cette voie, et nous avons montré que l'expression de *MYB30* est fortement corrélée avec celle de *GSO2* durant l'embryogénèse. De plus, nos résultats mettent en évidence une **boucle de régulation négative** où l'expression de *MYB30* est régulée positivement par *GSO1/2*, et MYB30 régule négativement l'expression de *GSO2*. Par ailleurs, le nombre important des cibles transcriptionnelles communes identifiées en aval de *GSO1/2* et de MYB30, souligne davantage l'interaction fonctionnelle entre ces gènes. L'ensemble de ces données sont cohérents avec *GSO1/2* et MYB30 faisant partie d'une même voie de signalisation (où MYB30 serait situé en aval de *GSO1/2*) au cours de la biosynthèse de la cuticule embryonnaire.

L'idée que MYB30, GSO1 et GSO2 soient génétiquement liés est renforcée par le fait que l'expression de *MYB30* est également régulée par ces deux RLK durant les **réponses immunitaires**. En effet, l'analyse d'expression de gènes réalisée dans le travail collaboratif présenté dans le chapitre précédent, a révélé que, suite à l'inoculation avec une bactérie avirulente, l'expression de *MYB30* est fortement réprimée chez les plantes *gso1-1 gso2-1* par rapport à la lignée sauvage (Figure 3.16).

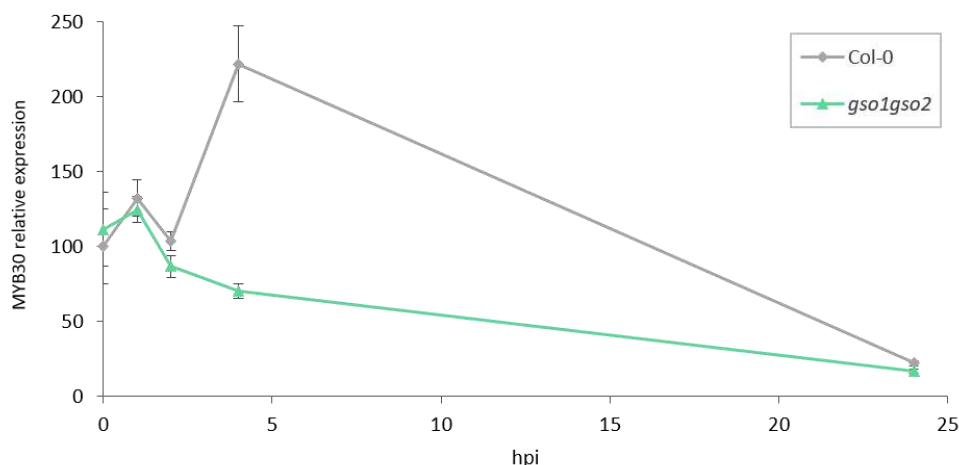


Figure 3.16 GSO1 and GSO2 sont nécessaires à l'induction de l'expression de MYB30 après inoculation bactérienne

Profils d'expression de *MYB30* chez les plantes sauvage d'*Arabidopsis* Col-0 (◆) et double mutantes *gso1-1 gso2-1* (▲), 0, 1, 2, 4 et 24 heures après inoculation (hpi) avec *Pst* AvrRpm1 (5×10^7 cfu/ml). Les valeurs d'expression ont été normalisées en utilisant le gène *MON1* comme standard interne puis divisées par la valeur de Col-0 à temps 0, qui est ajustée à 100%. Les valeurs de moyennes et d'erreurs-types ont été calculées à partir de 3 expériences indépendantes contenant chacune 4 réplicats.

Nos données indiquent qu'il n'y a pas d'effet additif des mutations *gso1/2* avec *myb30-67* sur le contrôle de la perméabilité de la cuticule, en accord avec l'idée que MYB30 agit dans la même voie génétique que les deux RLK pour l'intégrité de la cuticule embryonnaire. De plus, afin d'aller plus loin dans le positionnement de MYB30 dans la voie ECF, la génération des lignées surexprimant *MYB30* dans les fonds génétiques *gso1-1*, *gso2-1* et double mutant *gso1-1 gso2-1*, est en cours dans l'équipe, afin de vérifier si la surexpression de *MYB30* permet de compléter, au moins partiellement, le phénotype de défauts cuticulaires des plantules *gso1-1 gso2-1*.

Bien que nos travaux ne montrent pas d'effet additif des mutations *myb30* et *gso1/2* pour la formation de cuticule, MYB30, GSO1 et GSO2 semblent agir en synergie pour réguler la **croissance** de la plante, car à l'état adulte, le triple mutant *myb30 gso1-1 gso2-1* présente une croissance bien plus réduite que les mutants *myb30* ou *gso1-1 gso2-1* (Irene Serrano, données non publiées). En effet, la taille de la rosette du triple mutant est considérablement réduite, mais il est capable de produire des hampes florales et de se reproduire.

En amont de GSO1/2 dans la voie ECF se situe **ALE1**, une subtilase localisée dans l'albumen que l'on suppose produire le ligand reconnu par GSO1 et GSO2, et **ZOU**, un FT de l'albumen responsable de l'activation du gène *ALE1* (Xing *et al.*, 2013). Il serait intéressant d'étudier l'interaction génétique entre ALE1, ZOU et MYB30, et par exemple vérifier s'ils sont nécessaires à l'activation de *MYB30* par les gènes *GSO*. Dans ce but, la génération de lignées d'*Arabidopsis* multiple mutants est en cours dans notre équipe.

Au-delà de leur fonction dans la biosynthèse de la cuticule embryonnaire, ALE1, GSO1 et GSO2 jouent aussi un rôle dans le **détachement** entre albumen et embryon au cours

de l'embryogenèse. MYB30 ne semble pas nécessaire à ce phénomène, car aucun attachement entre ces deux tissus n'a pu être observé chez les graines *myb30*, probablement car les défauts cuticulaires de ces lignées sont plus faibles que ceux de *ale1-4* ou *gso1gso2*. D'autre part, le FT ZOU, situé en amont de GSO1 et GSO2 dans la voie de mise en place de la cuticule, a été récemment identifié dans la formation d'une **gaine extra-cuticulaire**. Cette structure nouvellement découverte entoure la cuticule de l'embryon pendant son développement et permet la séparation entre albumen et embryon (Moussu *et al.*, 2017). Les auteurs ont également montré que GSO1 et GSO2 sont nécessaires au dépôt de cette gaine, mais pas à sa formation. Il serait intéressant de vérifier si d'autres protéines impliquées dans la production de la cuticule embryonnaire, et notamment MYB30, sont également impliqués dans la formation de cette structure.

3.3. Matériel et Méthodes

Matériel végétal et conditions de culture

Toutes les lignées d'*Arabidopsis* utilisées dans cette étude sont dans le fond génétique Columbia (Col-0). Plusieurs génotypes décrits dans ce travail ont été publiés auparavant: *myb30-02* (SALK_027644) (Li *et al.*, 2009), *myb30-67* (lignée ADN-T GABIKAT 022F04), *MYB30^{OE}* (Raffaele *et al.*, 2008), *ale1-4* (SAIL_279_C04/N812918) (Xing *et al.*, 2013), et *gso1-1 gso2-1* (SALK_064029 x SALK_130637) (Tsuwamoto *et al.*, 2008). Afin de générer les lignées *p35S:GFP-MYB30*, le transgène *p35S:GFP-MYB30* a été introduit dans le fond génétique *myb30-67*.

Sauf indication contraire, les graines stérilisées ont été semées uniformément sur milieu Murashige Skoog (MS) contenant 0,5% de sucrose et 1% d'agar et stratifiées pendant 2 jours à l'obscurité, à 4°C. Après stratification, les graines ont été transférées en chambre de culture jour long (21°C, 16h jour/8h obscurité) pendant 7 jours, puis transférées sur terreau et cultivées en conditions de jour long (21°C, 16h jour/8h obscurité) en serre. Afin d'obtenir des graines synchronisées, les fleurs nouvellement ouvertes ont été marquées à l'aide de fils tous les jours pendant deux semaines.

Pour les expériences de coloration au Bleu de Toluidine et d'Auramine-O, les graines stérilisées ont été semées uniformément sur milieu Murashige Skoog (MS) 0,5X contenant 0,3% sucrose et 0,4% Phytigel (Sigma) (pH 5.8) et stratifiées pendant deux jours à l'obscurité, à 4°C. Après stratification, les graines ont été transférées en chambre de culture, et soit cultivées en conditions de jour long pendant (21°C, 16h jour/8h obscurité) 7 jours, soit incubées six heures sous lumière continue suivies de trois jours à l'obscurité.

Pour les expériences de ChIP, les graines stérilisées ont été semées uniformément sur milieu Murashige Skoog (MS) 0,5X contenant 0,5% de sucrose et 1% d'agar, stratifiées pendant deux jours à l'obscurité, à 4°C, puis cultivées sur terreau en conditions de jour long (21°C, 16h jour/8h obscurité) pendant 7 jours.

Analyses de perméabilité de la cuticule

L'analyse de perméabilité au Bleu de Toluidine a été adaptée de Xing *et al.*, 2013. Les boîtes contenant les plantules ont été inondées avec une solution de coloration [0,05% (poids/volume) Bleu de Toluidine + 0.4% (volume/volume) Tween-20] pendant 1 minute. La solution de coloration a ensuite été retirée en renversant les boîtes, puis celles-ci ont été rincées délicatement sous le robinet jusqu'à ce que l'eau excédante ne semblait plus bleue (1-2 minutes). Les plantules ont été photographiées ou récoltées pour quantification du Bleu de Toluidine. Pour la récolte, les plantules ont été prélevées individuellement à partir des boîtes et les racines ainsi que tout reste de téguments (qui se colorent fortement par au Bleu de Toluidine) ont été systématiquement retirés. Les plantules étio-lées ont été pesées à ce stade. L'hypocotyle et les cotylédons des plantules étio-lées et non étio-lées ont été immergées dans 1 mL d'éthanol à 80%. Les plantules ont été incu-bées sous agitation constante pendant 2 heures, jusqu'à ce que la couleur bleue et la chlorophylle soient parties des cotylédons. Enfin, le liquide résultant a été analysé à

l'aide d'un spectrophotomètre.

L'analyse de perméabilité à l'Auramine-O a été réalisée telle qu'elle est décrite dans Fiume *et al.*, 2016. Les plantules ont été immergées dans une solution aqueuse d'Auramine-O à 0,01% poids/volume (Sigma; 0,01% poids/volume dans du Tris/HCl 0,05 M, pH 7,2) pendant 10 minutes puis rincées délicatement à l'eau pendant 1-2 minutes. Les échantillons ont ensuite été photographiés à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Leica TCS-SP8 (Leica Microsystems, Allemagne) en utilisant un objectif de grossissement 25x à eau (0,9 d'ouverture).

Expériences de ChIP-qPCR

Environ 30 mL de plantules ont été infiltrées sous vide, 3 fois pendant 15 minutes, avec une solution de liaison de pontage (*cross-linking*) (1% formaldéhyde, 10 mM NaPi, pH 7,0, 50 mM NaCl, et 100 mM Suc) à température ambiante. La réaction de *cross-linking* a été arrêtée par l'ajout de glycine à une concentration finale de 0,1 M et infiltration sous-vide pendant 5 min. Les tissus ont été lavés trois fois avec de l'eau avant d'être réduits en poudre fine dans de l'azote liquide. La chromatine a été isolée en utilisant les tampons d'extraction 1, 2 et 3 (kit Plant ChIP-Seq; Diagenode) et resuspendue dans le tampon de lyse nucléaire (50 mM Tris-HCl, pH 8,1, 10 mM EDTA, et 1% SDS) et incubée pour sonication afin d'obtenir des fragments mesurant en moyenne entre 200 et 500 pb. Les débris cellulaires ont été retirés par centrifugation. La solution de chromatine a ensuite été diluée dans un volume de 2 mL avec le tampon de dilution ChIP Dilution buffer 1X (kit Plant ChIP-Seq) et pré-incubées avec 60 µL de billes d'agarose protéine-A (suspension à 50% dans du ChIP Dilution buffer 1X; Santa Cruz Biotechnology) pendant 90 min à 4°C. Cent microlitres de la solution de chromatine pré-incubée a ensuite été prélevée et stockée à -80°C afin d'être utilisée comme contrôle.

L'immunoprécipitation a été réalisée en ajoutant 4 µL d'anticorps anti-GFP Ab290 (Abcam) pendant 1h à 4°C, et 60 µL de billes d'agarose protéine-A (suspension à 50% dans du ChIP Dilution buffer 1X) a été ajouté à la solution chromatine-anticorps suivi d'une incubation de 2h à 4°C. Les billes ont ensuite été lavées deux fois à l'aide du tampon de lavage 1 (kit Plant ChIPSeq), et trois fois à l'aide du tampon de dilution ChIP Dilution buffer 1X (kit Plant ChIPSeq) avant que les immunocomplexes soient élués par l'ajout de 400 µL de tampon d'éluion 1 (kit Plant ChIPSeq) et incubés à 65°C pendant 30 min sous agitation à 1,300 rpm. Les échantillons ont été centrifugés afin de retirer les billes d'agarose restantes et 16 µL de tampon d'éluion 2 (kit Plant ChIPSeq) ont été ajoutés et les échantillons ont été incubés la nuit à 65°C sous agitation à 1,300 rpm. Les échantillons contrôles ont été traités de manière similaire, avec l'ajout de 400 µL de tampon d'éluion 1 et 16 µL de tampon d'éluion 2 (kit Plant ChIPSeq), suivi par l'incubation pendant la nuit à 65°C sous agitation à 1,300 rpm.

L'abondance relative des régions génomiques sélectionnées (voir [Table Supplémentaire 3.1](#) pour la liste des gènes et amorces utilisées) a été déterminée à l'aide d'un appareil Roche LightCycler 480 system et du kit LC480 SYBR Green I Master (Roche Applied Sciences). Les mesures ont été prises pour trois ensembles d'échantillons indépendants.

Les courbes de fusion LightCycler ont été obtenues pour chaque réaction, révélant un pic simple pour tous les produits d'amplification. Les données d'amplification ont été analysées en utilisant la méthode de *second derivative maximum*, et donnant des valeurs de Cp qui ont été converties en valeurs d'enrichissement relatif en utilisant la méthode de *comparative cycle threshold* où l'ADN contrôle a été utilisé pour normaliser les données (Livak and Schmittgen, 2001). Quatre régions génomiques (*REF1*, *TUB1*, *BRI1* et *MU*; Figure 3.7), ne contenant aucun site de liaison MYB connu, ont été utilisées pour normaliser les données. Leurs valeurs de Cp ont été moyennées pour chaque échantillon.

Coloration GUS

La méthode de *clearing* et la coloration GUS ont été réalisées selon le protocole décrit dans (Stangeland and Salehian, 2002).

Transmission electron microscopy analysis

Pour l'analyse de microscopie électronique à transmission (MET), les siliques ont été ouvertes à l'aide d'aiguilles, et les graines prélevées à l'aide de pinces. Les échantillons ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon de cacodylate de sodium à 0,5M (pH 7,1) pendant 3 heures à température ambiante, puis la nuit à 4°C. Ils ont ensuite été rincés dans le même tampon et progressivement déshydratés dans une série d'éthanol (20, 40, 60, 80% et deux bains d'éthanol purs, chacun pendant 1 heure à température ambiante). Puis, les échantillons ont été infiltrés avec une proportion croissante de résine LRW (London Resin White) dans de l'éthanol (1/3, 1/1, 3/1, chacun à température ambiante, 2h), et finalement dans de la résine pure, la nuit à 4°C. Les échantillons infiltrés ont été inclus dans des capsules de gélatine pour polymériser pendant 24h à 70°C. Les coupes ultrafines (de 80 nm d'épaisseur) ont été préparées à l'aide d'un ultramicrotome UltraCut E (Reichert-Leica, Germany), ramassées sur des grilles de nickel carbonées, colorées à température ambiante 3 min avec une goutte d'une solution aqueuse de tetroxide d'osmium à 4% puis lavées excessivement à l'eau. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi HT 7700 équipé d'une caméra CCD pour l'acquisition d'image.

Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* a été réalisée telle que décrite dans le Chapitre 2.

Analyse des monomères de cutine

L'analyse des monomères de cutine a été réalisée selon (Bourdenx *et al.*, 2011).

Chapitre 4

Un rôle potentiel
pour MYB30 dans
l'élongation cellulaire

4.1. Résultats

Au cours de la vie de la plante, *MYB30* est spécifiquement exprimé pendant les étapes précoces du développement, chez l'embryon et au stade jeune plantule. De plus, *MYB30* est plus fortement exprimé chez les jeunes plantules à l'obscurité (Li *et al.*, 2009); eFP browser, et comme suggéré par la Figure 3.12), une condition où l'élongation cellulaire est importante. Lors d'expériences précédentes, nous avons remarqué que l'hypocotyle des plantules étiolées de la lignée mutante d'*Arabidopsis myb30-02* semblaient plus courts que ceux du sauvage (Figure 4.1). Cette observation est en accord avec les résultats d'une précédente publication qui démontre que *MYB30* active l'expression de gènes de réponse aux Brassinostéroïdes, des hormones impliquées dans divers processus dont la croissance et l'élongation cellulaire (Li *et al.*, 2009).

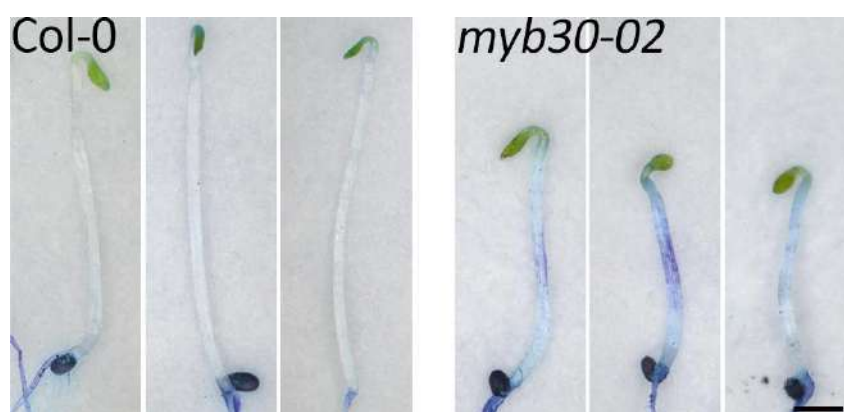


Figure 4.1 La croissance de la lignée mutante *myb30-02* est réduite en condition d'obscurité

Photos de plantules étiolées 3 jours après stratification et colorées au bleu de toluidine. Barre d'échelle = 1mm.

La paroi végétale est une structure dynamique, qui est constamment remodelée durant la croissance, le développement de la plante, et en réponse à l'environnement. Elle est formée par un assemblage complexe de microfibrilles de cellulose, hemicelluloses (tels que le xyloglucan et l'arabinoxylan), pectines, composés phénoliques et protéines dont la modification permet la croissance (Braidwood *et al.*, 2014). En effet, l'expansion cellulaire chez les plantes est déterminée par la pression de turgescence et implique la coordination délicate de cycles d'acidification et d'hydratation de la paroi cellulaire, le relâchement de liaisons de pontages dans la paroi, suivi de la formation de nouveaux composés pariétaux et de nouvelles liaisons de pontage (Wolf *et al.*, 2012). Nos données transcriptomiques indiquent que *MYB30* régule un ensemble de gènes avec des termes GO reliés à la biosynthèse et le métabolisme de la paroi cellulaire (voir Table 3.1) et codant pour des protéines telles que des pectin méthylestérases (PMEs), cellulose synthases, pectine lyases, enzymes hemicellulosiques et expansines (données non publiées). Nous avons donc cherché à déterminer si *MYB30* pouvait être impliqué dans le contrôle de l'élongation cellulaire, à travers la régulation du développement de la paroi cellulaire, chez les jeunes plantules.

4.1.1. La dérégulation de *MYB30* affecte la longueur de l'hypocotyle des plantules étiolées

Afin de vérifier et quantifier nos observations, nous avons réalisé des mesures de longueur d'hypocotyles étiolés sur les lignées utilisées dans les expériences de perméabilité au Bleu de Toluidine. En accord avec des données publiées (Tsuwamoto *et al.*, 2008), les plantules étiolées *gso1-1 gso2-1* présentent un hypocotyle en moyenne plus court que celui du sauvage. De plus, l'hypocotyle de la lignée *myb30-02* est plus court que le sauvage, d'environ 2 mm, soit 36%. En revanche, la lignée *myb30-67* possède un hypocotyle étiolé plus long que *myb30-02* mais aussi que le sauvage. De manière intéressante, les plantules *MYB30^{OE}* sont environ 50% plus long que les plantules sauvages. Enfin, les plantules d'*Arabidopsis* mutées pour *MIEL1*, un régulateur négatif de l'accumulation de *MYB30* (Marino *et al.*, 2013) possèdent un hypocotyle de taille similaire à celui de la lignée surexprimant *MYB30* (Figure 4.2).

Ces données ont permis de mettre en évidence une différence entre les deux mutants alléliques de *MYB30* dans l'étiollement des plantules et soulèverent également un rôle potentiel pour le FT dans ce processus.

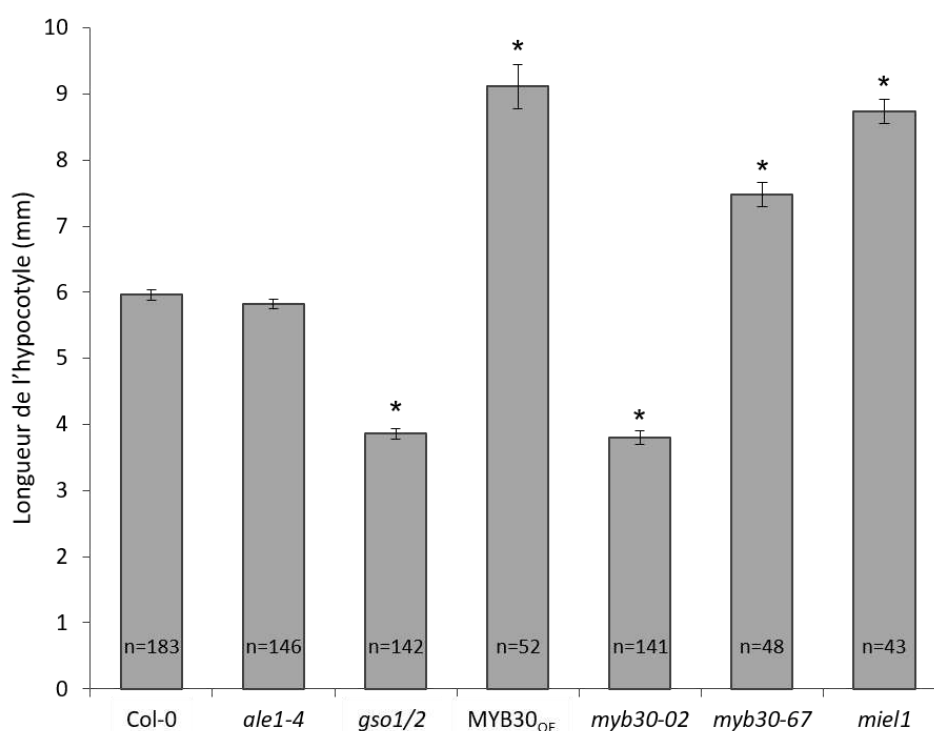


Figure 4.2 La dérégulation de l'expression de *MYB30* affecte la longueur de l'hypocotyle lors de l'étiollement

La longueur de l'hypocotyle a été mesurée chez des plantules de trois jours cultivées à l'obscurité. Les différences significatives par rapport au sauvage ont été évaluées par test de Student (* p-value < 0.001). n dénote le nombre total de plantules analysées par lignée.

4.1.2. La dérégulation de *MYB30* affecte la longueur des cellules de l'hypocotyle

Afin de vérifier si les différences de taille d'hypocotyle étioilé des lignées dérégulées pour l'expression de *MYB30* pourraient provenir d'une différence dans l'élongation cellulaire, nous avons mesuré la taille des cellules de l'hypocotyle chez ces lignées. Cette expérience fut réalisée en collaboration avec Alain Jauneau (Plateforme d'Imagerie TRI-Genotoul). Deux zones furent choisies pour les mesures, la première en haut de l'hypocotyle, où les cellules sont en cours d'élongation, et la deuxième à la base de l'hypocotyle, où les cellules ont fini leur croissance. En haut de l'hypocotyle, la taille des cellules des plantules *myb30-02* n'est pas significativement différente de celle du sauvage. En revanche, à la base, les cellules sont plus courtes que celles de Col-0. Les plantules *MYB30^{OE}* et *miel1* possèdent quant à elles des cellules plus longues que le sauvage, tout au long de l'hypocotyle (Figure 4.3). Ces données suggèrent donc un rôle positif de *MYB30* dans l'élongation cellulaire des cellules de l'hypocotyle lors de l'étiollement.

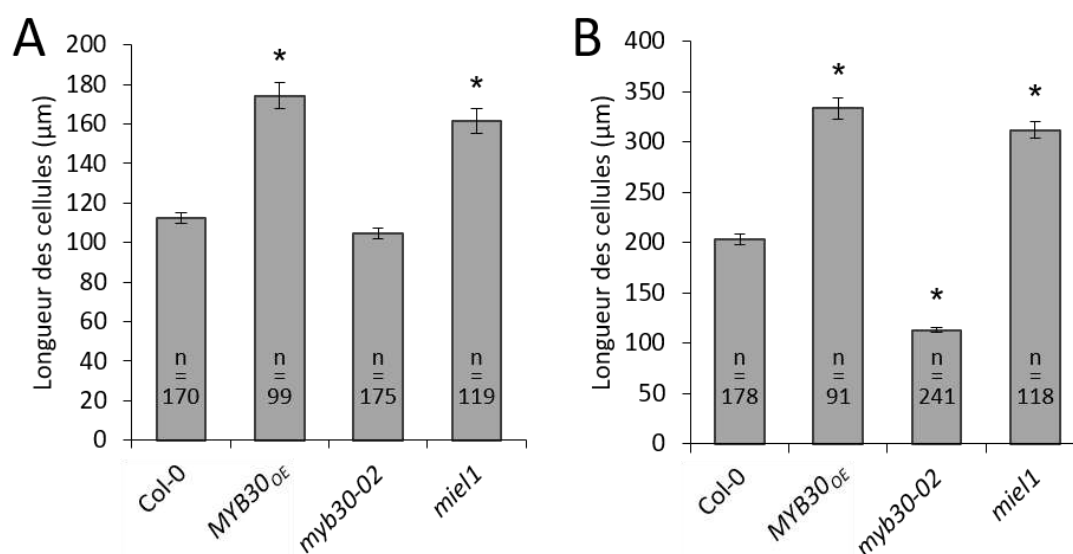


Figure 4.3 MYB30 régule positivement l'élongation cellulaire lors de l'étiollement

Cinq à sept plantules de trois jours par lignée ont été cultivées à l'obscurité, fixées et colorées au Rouge Congo. Plusieurs séries d'images ont été prises à l'aide d'un microscope confocal et la longueur des cellules a été mesurée avec le logiciel Image-Pro Plus en haut (**A**) et à la base de l'hypocotyle (**B**). Les différences significatives par rapport au sauvage ont été évaluées par test de Student (* p-value < 0.001). n dénote le nombre total de cellules analysées par lignée.

4.1.3. L'aspect de surface du mutant *myb30-02* n'est pas altéré

Étant donné que les plantules *myb30-02* produisent une cuticule imparfaite, et qu'elles semblent également impactées dans l'élongation cellulaire, nous avons examiné la surface des cellules épidermiques d'hypocotyles étioilés de cette lignée par microscopie

électronique à balayage (MEB), en collaboration avec Cécile Pouzet (Plateforme d'Imagerie TRI-Genotoul). Mis à part l'évidente réduction de la taille des cellules du mutant, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre la lignée sauvage et *myb30-02*. En effet, sur les différents hypocotyles observés pour chaque lignée, la forme et l'organisation des cellules épidermiques étaient similaires, tout comme l'aspect général de la surface (Figure 4.4).

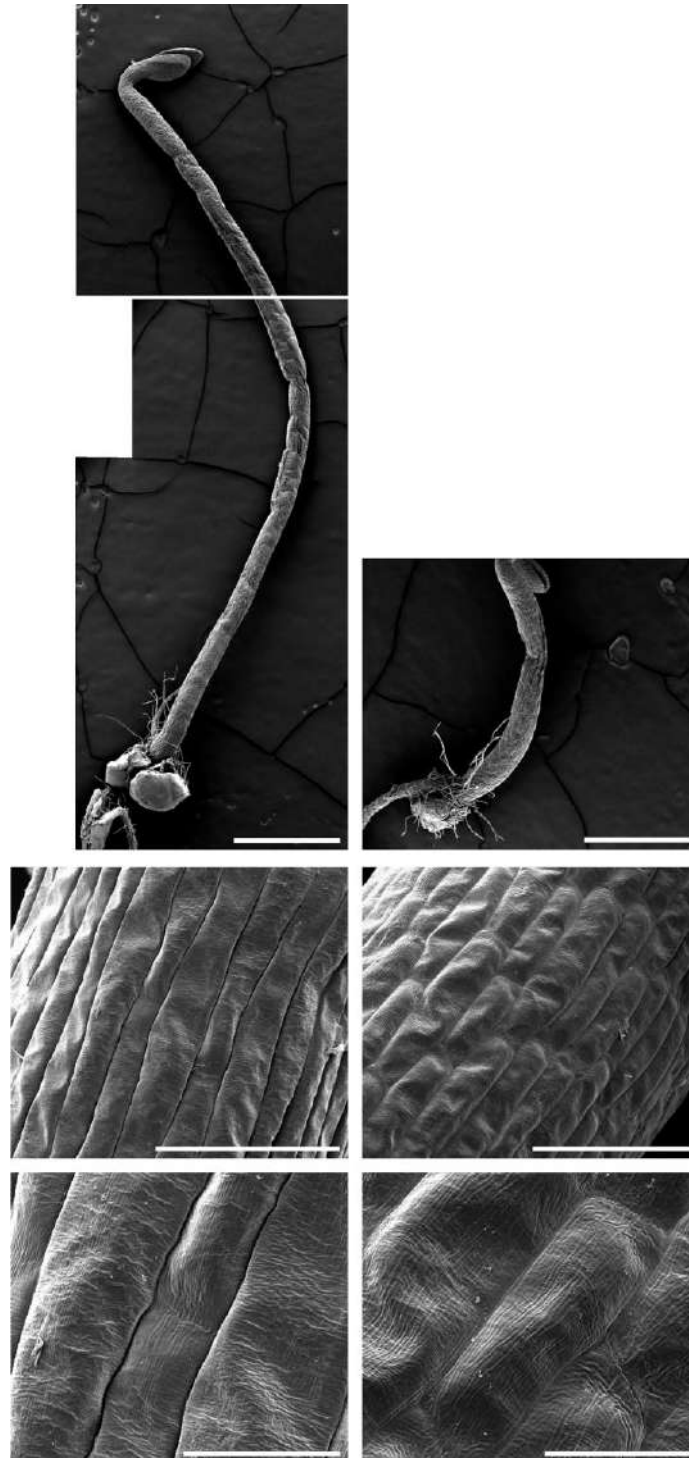


Figure 4.4 Observation en microscopie électronique à balayage d'hypocotyles étiolés de trois jours
L'aspect de la surface des cellules de la lignée sauvage (colonne de gauche) et de la lignée *myb30-02* (colonne de droite) a été comparée. Barres d'échelles = 1 mm (haut), 100 µm (centre), 30 µm (bas).

4.1.4. Le mutant *myb30-02* présente des dépôts de callose ectopiques

Comme la cellulose est le polymère majoritaire de la paroi végétale, la production de microfibrille de cellulose est une déterminante importante pour les propriétés physiques caractéristique de la paroi végétale. Des études réalisées sur des mutants très affectés dans leur croissance et modérément affectés dans la synthèse de cellulose suggèrent que la synthèse de cellulose contribue activement au contrôle de l'élongation cellulaire (Arioli *et al.*, 1998; Nicol *et al.*, 1998; Fagard *et al.*, 2000). Un moyen rapide de déterminer l'existence d'un défaut de synthèse de cellulose, est d'observer la présence de callose. En effet, l'accumulation de callose ectopique est cohérente avec un défaut de synthèse de la cellulose car cette accumulation a été montrée chez des plantules sauvages traitées avec des inhibiteurs de la synthèse de cellulose tels que le DCB ou l'isoxaben (Desprez *et al.*, 2002). C'est pourquoi nous avons réalisé une coloration au Bleu d'Aniline sur des plantules de 3 jours étiolées de Col-0, MYB30^{OE}, *myb30-02*, *myb30-67* et *miel1*. Cette expérience révéla que seules les plantules *myb30-02* présentaient une accumulation ectopique de callose, à la base de l'hypocotyle (Figure 4.5), suggérant que le défaut d'élongation cellulaire de ce mutant pourrait provenir d'un défaut de synthèse de cellulose. De manière cohérente, chez les autres lignées, dont la taille de l'hypocotyle n'est pas réduite, aucune accumulation de callose ectopique n'est visible.

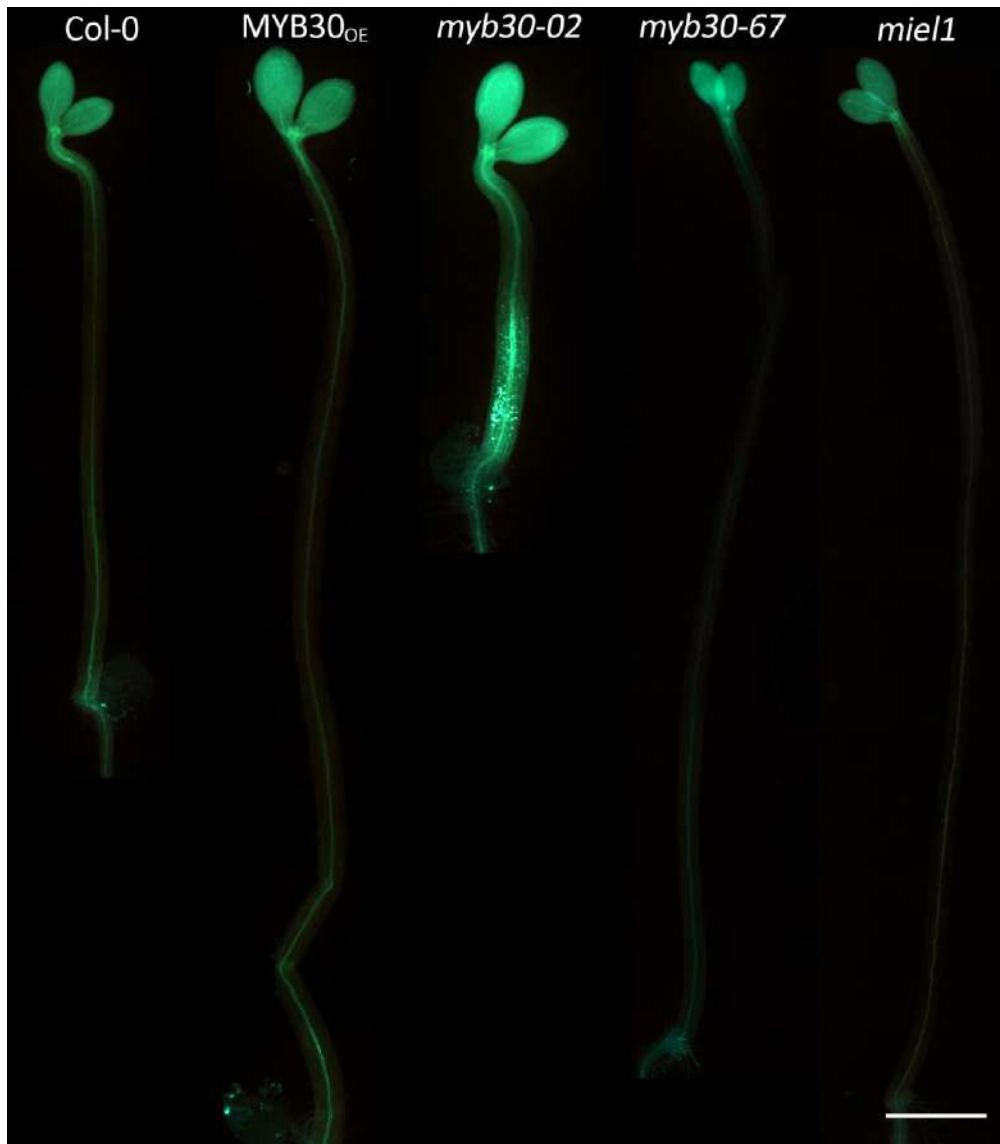


Figure 4.5 Le mutant *myb30-02*, mais pas le mutant *myb30-67* présente des dépôts de callose ectopiques

Images en microscopie photonique de plantules étiolées de 3 jours colorées au Bleu d'Aniline. Barre d'échelle = 500 μ m.

4.1.5. Le mutant *myb30-02* ne montre pas de défaut de synthèse de cellulose

Afin de confirmer l'idée que les plantules *myb30-02* pourraient être affectées dans la production de cellulose, nous avons ensuite mesuré la taille des hypocotyles de différentes lignées après traitement à l'isoxaben. De manière surprenante, la réduction de la longueur de l'hypocotyle des plantules *myb30-02* était similaire à celle des plantules sauvages (Figure 4.6), suggérant que la réduction de croissance de la lignée *myb30-02* n'est pas due à un défaut de production de cellulose, du moins par des cellulose synthases sensibles à l'isoxaben.

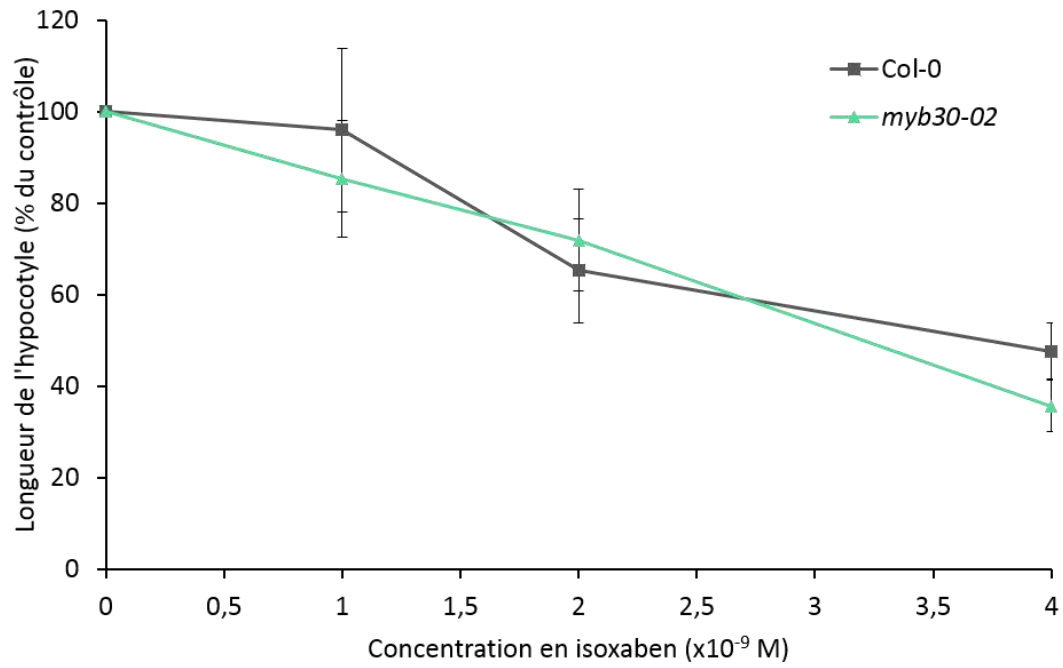


Figure 4.6 Le mutant *myb30-02* montre une sensibilité à l'isoxaben identique à celle du sauvage
 Courbe de dose-réponse à l'isoxaben pour la longueur de l'hypocotyle de plantules étiolées de 3 jours. Les valeurs sont exprimées en pourcentages du contrôle avec le solvant DMSO pour chaque lignée.

4.2. Discussion

Du fait que les plantes reposent sur la lumière comme source d'énergie, elles ont acquis au cours de l'évolution des mécanismes complexes afin de maximiser l'utilisation de la lumière disponible dans leur environnement. En effet, les plantes sont capables de réguler leur propre croissance et leur développement en réponse aux signaux lumineux qui les entourent, et peuvent notamment s'étioler lorsque la quantité ou la qualité de la lumière diminue. Cette stratégie permet aux végétaux d'augmenter leurs chances d'atteindre une source lumineuse lorsqu'ils sont sous le sol, sous des feuilles mortes, ou à l'ombre d'autres plantes compétitives. L'étiollement correspond à l'allongement de la tige de la plante, principalement par élongation rapide des cellules de l'hypocotyle, la croissance et le développement réduit des feuilles, une chlorose des tissus photosynthétiques, et la dédifférenciation et/ou non différenciation des chloroplastes.

Lors des expériences de perméabilité au Bleu de Toluidine (voir Chapitre 3), nous avons remarqué que les plantules étiolées du mutant *myb30-02* semblaient plus petites que les plantules sauvages. De plus, lors du développement précoce de la plante, MYB30 régule un ensemble de gènes avec des termes GO reliés à la biosynthèse et le métabolisme de la paroi (Table 3.1). Nous avons alors émis l'hypothèse que MYB30 pourrait agir sur l'élongation cellulaire des jeunes plantules, à travers la régulation du développement de la paroi.

4.2.1. La dérégulation de *MYB30* affecte l'élongation des cellules des hypocotyles étiolés

Un modèle couramment utilisé pour étudier l'élongation cellulaire est l'hypocotyle étiolé de jeunes plantules, car dû au phénomène d'étiollement, les cellules de ces hypocotyles croissent de manière rapide. La mesure de la longueur d'hypocotyles de plantules de trois jours, cultivées à l'obscurité a permis de quantifier la réduction de taille des hypocotyles de la lignée *myb30-02* par rapport à la lignée sauvage. De manière cohérente, la lignée surexprimant MYB30 et la lignée *miel1* (où la protéine MYB30 est sur-accumulée) possèdent un hypocotyle plus long. Ces observations sont corrélées avec une différence dans la taille des cellules épidermiques de *myb30-02* et MYB30_{OE}, qui sont respectivement plus courtes et plus longues que le sauvage. De plus, les ratios de diminution de longueur entre l'hypocotyle et les cellules épidermiques de *myb30-02* sont environ égaux, suggérant que la cause majeure de la taille réduite des hypocotyles est une répression de l'**expansion longitudinale** des cellules épidermiques. La zone d'élongation de l'hypocotyle en développement a été bien décrite. Trois jours après germination, les cellules en haut de l'hypocotyle sont en expansion tandis que celles de la base ont fini leur croissance (Gendreau *et al.*, 1997) et de manière intéressante, chez la lignée *myb30-02*, les cellules du haut de l'hypocotyle sont significativement plus courtes que celles du sauvage, tandis que celles de la base ne sont pas affectées. La taille réduite des plantules *myb30-02* pourrait également provenir d'un retard de germination de cette lignée, mais

un test de germination réalisé dans l'équipe a permis d'éliminer cette possibilité (C. Audran, données non publiées). L'ensemble de ces données suggèrent très fortement que MYB30 est un régulateur positif de l'élongation cellulaire.

De manière surprenante, la lignée *myb30-67* montre un phénotype opposé à celui de son variant allélique *myb30-02* pour le contrôle de l'élongation cellulaire. Une raison possible pour expliquer cette différence entre les deux lignées pourrait être qu'une des deux possède une insertion ADN-T supplémentaire, en plus de celle située dans le gène *MYB30*, dans un gène jouant un rôle dans l'élongation cellulaire. Cependant, une analyse q-RT-PCR réalisée sur les deux mutants a montré que les deux lignées ne possèdent qu'une seule insertion, excluant cette hypothèse (I. Serrano, données non publiées). Par précaution, des rétrocroisements des deux lignées avec le sauvage Col-0 sont actuellement en cours dans l'équipe.

D'autre part, chez les plantules étiolées de la lignée *myb30-67* (qui présente une insertion ADN-T située dans le deuxième exon de *MYB30*), l'expression de *MYB30* est équivalente à 35% de celle chez Col-0 (Figure 3.12). Bien que la protéine produite par les plantules *myb30-67* n'est pas prédite pour être fonctionnelle, il est possible que cette protéine tronquée soit capable d'interagir avec des partenaires protéiques, et que cette interaction interfère avec la fonction de l'allèle normal de *MYB30* résultant ainsi en un effet **dominant négatif** et une croissance accrue des hypocotyles. Dans le but de mieux comprendre la différence de phénotype entre les deux mutants alléliques de *MYB30* et afin de confirmer que le phénotype d'élongation cellulaire observé est bien dû à la mutation dans le gène *MYB30*, il serait intéressant de compléter le deux mutants *myb30-02* et *myb30-67* avec la séquence du gène *MYB30* sous le contrôle de son promoteur natif, et de vérifier si la différence de phénotype persiste.

Chez certains mutants d'*Arabidopsis* impactés dans l'élongation cellulaire, la forme et la surface des **cellules épidermiques** de l'hypocotyle est impactée. C'est le cas par exemple du mutant *kor1*, qui possède une quantité réduite de cellulose (Nicol *et al.*, 1998), ou des plantes qui surexpriment la protéine microtubule-destabilizing 25 (MDP25), qui dépolymérise les microtubules chez *Arabidopsis thaliana*, et donc régule négativement l'élongation cellulaire (Li *et al.*, 2011). Chez ces deux lignées, les cellules épidermiques sont plus larges ou organisées de façon anormale. Bien que l'observation en microscopie électronique à balayage n'ait pas révélé de tels défauts de surface chez *myb30-02*, elle a tout de même permis de confirmer la taille réduite des cellules de l'hypocotyle.

D'autre part, chez *Arabidopsis*, certains mutants défectifs pour la production de cuticule présentent des **fusions d'organes**, qui entraînent des une croissance réduite, de ces plantes (Yephremov *et al.*, 1999; Wellesen *et al.*, 2001; Krolkowski *et al.*, 2003; Kurdyukov, Faust, Trenkamp, *et al.*, 2006; Kurdyukov, Faust, Nawrath, *et al.*, 2006). De manière intéressante, quelques mutants d'*Arabidopsis* impactés dans la production de cutine ne montrent pas de fusions d'organes mais seulement une croissance légèrement réduite, tel que le double mutant *gpat4 gpat8*, affecté dans l'expression des protéines redondantes GPAT4 et GPAT8 (Li *et al.*, 2007). Le croisement de *gpat4 gpat8* avec le mutant du transporteur ABCG *pec1/abcg32*, également affecté dans la production de cutine mais

qui possède une taille normale, mène à une forte réduction de la croissance du triple mutant *gpat4 gpat8 pec1*, ainsi qu'à des fusions d'organes, ce qui suggère que la réduction de la croissance et les fusions d'organes peuvent refléter différents degrés de sévérité d'un même défaut de base (Fabre *et al.*, 2016). De plus, des lignées transgéniques de riz qui ont une expression réduite du gène orthologue de *ABCG31* montrent une corrélation importante entre la sévérité des défauts cuticulaires et la **réduction de la croissance** (Garroum *et al.*, 2016). Les raisons proposées pour expliquer ce lien étroit entre défaut de croissance et défauts cuticulaires sont multiples, incluant (i) une pression de turgescence diminuée à cause de pertes en eau à travers une cuticule perméable, (ii) un apport en CO₂ réduit dû à une fermeture des stomates causée par des pertes en eau, ou (iii) une reprogrammation transcriptionnelle importante en réponse à la présence d'une cuticule altérée dans sa structure et/ou sa fonction (Ingram and Nawrath, 2017). Les défauts de croissance de la lignée *myb30-02* ayant été observés dans des conditions élevées d'humidité, les hypothèses (i) et (ii) reliées à la perte en eau sont donc peu probables. On pourrait donc proposer que la reprogrammation transcriptionnelle importante chez *myb30-02* puisse être à l'origine de la réduction de croissance de la lignée *myb30-02*. Cependant, étant donné que les plantes *myb30-02* sont moins affectées dans la perméabilité cuticulaire que les plantes *myb30-67* ou *ale1-4* (qui n'est pas affecté dans la taille de plantules étiolées), et pourtant plus petites que ces dernières, il est peu probable que la croissance réduite de *myb30-02* soit corrélée à ses défauts cuticulaires.

Enfin, certains mutants d'*Arabidopsis* affectés dans l'élongation cellulaire ont une taille réduite tout au long de la vie de la plante. C'est le cas par exemple de *korrigan*, un mutant d'*Arabidopsis* affecté dans l'expression d'une β -1,4-glucanase (Nicol *et al.*, 1998). Même si nous n'avons pas mené d'étude détaillée sur ce point, les mutants *myb30* ne semblent pas altérés dans leur croissance à l'âge adulte, laissant penser que MYB30 n'agit sur l'élongation cellulaire que pendant les étapes précoces du développement, ce qui est cohérent avec son profil d'expression restreint à cette période.

4.2.2. Le mutant *myb30-02* présente des dépôts de callose ectopiques mais ne montre pas de résistance à l'isoxaben

Dans la littérature, de nombreux mutants affectés dans leur croissance sont en réalité affectés dans la production de composés pariétaux, et en particulier de **cellulose**. Par exemple, les mutants d'*Arabidopsis* *cesa6^{prc1-1}* *procuste* et *cesa2*, tous deux dérégulés dans l'expression de gènes codant pour des sous-unités catalytiques de cellulose synthase (CESA), montrent une élongation réduite de hypocotyle en condition d'obscurité continue (Desprez *et al.*, 2007; Fagard *et al.*, 2000). Par ailleurs, des mutations dans le gène *KOBITO* résultent dans des plantes déficientes en cellulose et montrant une orientation aléatoire des microfibrilles de cellulose. En accord avec ce phénotype, les plantules étiolées *kob1-1* ont un hypocotyle plus court que le sauvage (Pagant *et al.*, 2002).

Nos résultats indiquent que MYB30 régule l'expression de gènes de la synthèse de la paroi, et contrôle l'élongation cellulaire. La cellulose est le principal constituant de la

paroi des cellules végétales, et chez *Arabidopsis*, une déficience dans la production de cellulose est souvent accompagnée par une réduction de la taille des cellules, ainsi qu'une accumulation de lignine et de **callose** ectopique. Par exemple, l'accumulation de callose a été observée chez les embryons d'*Arabidopsis* mutés pour *CYT1* (Lukowitz *et al.*, 2001), et les plantules d'*Arabidopsis* mutées pour *KOB1* (Pagant *et al.*, 2002), deux gènes requis pour la production de cellulose. Une accumulation de callose ectopique a pu être observée chez les plantules de la lignée *myb30-02*, renforçant l'idée que MYB30 pourrait être nécessaire à la production de cellulose. Cependant, la lignée *myb30-02* n'est pas résistante à l'isoxaben, un inhibiteur de la production de cellulose, ce qui va à l'encontre de l'idée que la réduction de l'élongation cellulaire observée chez cette lignée soit due à une répression de la synthèse de cellulose. Par conséquent, MYB30 ne semble pas agir sur les CESA3 et 6, qui sont les enzymes ciblées par l'isoxaben (Desprez *et al.*, 2002) et l'accumulation de callose montrée par le mutant *myb30-02* devra être analysée avec plus de détail.

Les plantes d'*Arabidopsis* mutées pour le gène *DEFECTIVE GLYCOSYLATION* (*DGL1*) présentent un phénotype fortement similaire à celui des plantes *myb30-02*. Les plantes *dgl1-1* présentent une élongation cellulaire réduite, des dépôts de callose ectopiques, et une sensibilité à l'isoxaben similaire à celle du sauvage (Lerouxel *et al.*, 2005). La protéine DGL1 est un orthologue de la protéine OST48 chez l'humain et de la protéine WBP1 chez la levure, une sous-unité d'un complexe oligosaccharyltransferase (OST), qui est responsable pour le transfert dans le reticulum endoplasmique de précurseurs glycanes liés en N-terminal sur des résidus Asn de protéines candidates. Contrairement à d'autres mutants affectés dans la N-glycosylation, la lignée *dgl1-1* ne montre pas de changements dans le contenu en cellulose. En revanche, cette lignée présente des changements dans la composition en **polysaccharides non-cellulosiques**, mais pas dans leur quantité totale.

L'ensemble de ces résultats permet d'émettre l'hypothèse que MYB30 pourrait contrôler l'élongation cellulaire des jeunes plantules à travers la régulation de la production de composés pariétaux non-cellulosiques. En accord avec cette idée, nos données transcriptomiques non-publiées montrent que MYB30 régule l'expression de nombreux gènes codant pour des enzymes hemicellulosiques, en particulier un nombre important de xyloglucan endotransglucosylases/hydrolases. Le rôle de MYB30 dans l'élongation cellulaire et la paroi sera étudié dans notre équipe dans le futur.

4.3. Matériel et Méthodes

Matériel végétal et conditions de culture

Toutes les lignées d'*Arabidopsis* utilisées dans cette étude sont dans le fond génétique Columbia (Col-0). Tous les génotypes décrits dans ce travail ont été publiés auparavant: *myb30-02* (SALK_027644) (Li *et al.*, 2009), *myb30-67* (GABIKAT T-DNA line 022F04), MYB30OE (Raffaele *et al.*, 2008), *miel1-09* (SALK_097638) (Marino *et al.*, 2013), *ale1-4* (SAIL_279_C04/N812918) (Xing *et al.*, 2013), et *gso1-1 gso2-1* (SALK_064029 x SALK_130637) (Tsuwamoto *et al.*, 2008)

Les graines stérilisées ont été semées uniformément sur milieu Murashige Skoog (MS) 0.5X contenant 0.3% sucrose et 0.4% Phytigel (Sigma) (pH 5.8) et stratifiées pendant deux jours à l'obscurité, à 4°C. Après stratification, les graines ont été transférées en chambre de culture, incubées six heures sous lumière continue suivies de trois jours à l'obscurité.

Pour les tests de croissance sur milieu contenant de l'isoxaben, les plantes ont été cultivées dans les mêmes conditions que décrites précédemment, sur milieu identique, contenant en plus une solution d'Isoxaben PESTANAL® (SIGMA-ALDRICH, USA) dissout dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (SIGMA-ALDRICH, USA), ou additionné de DMSO aux mêmes concentrations (boîtes contrôles).

Mesure de la longueur de l'hypocotyle

Les plantules étiolées de trois jours ont été individuellement retirées des boîtes de milieu de croissance, et déposées sur un support humide puis photographiées à l'aide d'un microscope stéréoscopique Axiozoom V.16 (Carl Zeiss Microscopy, Allemagne). La longueur de l'hypocotyle de chaque plantule a ensuite été mesurée à l'aide du logiciel d'imagerie ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

Mesure de la longueur des cellules de l'hypocotyle

Les plantules d'*Arabidopsis* ont été fixées dans une solution de cacodylate de sodium 0.05 M à 2.5% de glutaraldéhyde. Après rinçage dans l'eau distillée, les plantules ont été colorées dans une solution aqueuse de rouge Congo (0.2%) pendant 10 min, rincées dans l'eau, et montées dans l'eau entre lame et lamelle. L'observation et la prise d'images ont été effectuées en microscopie confocale (Leica SP2 AOBS) laser 561 nm, objectif 10x à sec. La mesure des longueurs de cellules a été réalisée *via* le logiciel d'imagerie Image-Pro Plus (Media Cybernetics, USA).

Microscopie électronique à balayage

Les échantillons ont été fixés avec du glutaraldéhyde 2.5% préparé dans un tampon cacodylate de sodium 0.5M (pH7.1) pendant 3 heures à température ambiante puis la nuit à 4°C. Après 2 lavages dans le même tampon les échantillons ont été déshydratés dans des bains successifs d'alcool, séchés par la méthode de point critique avec un EMSCOPE CPD 750 puis métallisés avec un mélange or-palladium pendant 5 min à 100A.min-1. Les

échantillons ont finalement été observés avec un microscope électronique à balayage (SEM Quanta 250 FEG FEI) sous une tension d'accélération de 5kV.

Coloration de la callose

Les plantules de trois jours cultivées à l'obscurité ont été incubées dans une solution d'éthanol à 100% pendant trois bains successifs de 20 minutes puis laissées dans un bain d'éthanol à 100% pendant la nuit. Les échantillons ont ensuite été immergés dans des bains successifs d'éthanol à 50%, puis rincés par une solution de 150 mM K_2HPO_4 (pH 9,5) avant d'être colorés pendant 2h 30min à l'obscurité par une solution identique contenant en plus 0.01% de Bleu d'Aniline. La solution de coloration a ensuite été retirée et les plantules ont été montées dans du glycérol à 50% entre lame et lamelle. Les échantillons ont été observés à l'aide d'un microscope champ large à fluorescence LEICA DMIRBE (excitation entre 340 et 380 nm; émission après 425 nm). Les images ont été acquises *via* le logiciel L.A.S. (Leica Application Suite).

Chapitre 5

La protéine E3 ubiquitine-
ligase MIEL4 est requise
pour le développement
embryonnaire

5.1. Résultats et Discussion

Comme évoqué dans l'introduction, l'ubiquitination est une MPT qui joue un rôle essentiel dans de très nombreux processus cellulaires eucaryotes, et elle est notamment impliquée dans le développement (Sadanandom *et al.*, 2012) et les réponses aux stress biotiques (Duplan and Rivas, 2014; Marino *et al.*, 2012). Les protéines cibles de l'ubiquitination peuvent être de natures diverses, et en particulier, il est apparu que l'ubiquitination de FT est un processus prévalent afin de contrôler efficacement divers types de réponses cellulaires. Par exemple, des travaux montrent que l'ubiquitination de FT est parfois requise pour leur activation précédant leur dégradation (Conaway *et al.*, 2002). Dans d'autres cas, cette MPT est nécessaire à l'atténuation des signaux de transcription pour éviter une activation non contrôlée du système qui pourrait nuire à l'équilibre de l'organisme.

En accord avec ces observations, le FT MYB30 est régulé négativement par l'E3-Ligase de type RING MIEL1 lors des réponses de défense de la plante. Comme présenté précédemment, des travaux réalisés dans l'équipe ont permis de montrer que MIEL1 interagit avec MYB30 dans le noyau, menant à la dégradation de ce dernier par le protéasome, à une diminution de l'expression des gènes cibles de MYB30, et par conséquent, à l'atténuation des réponses de défense de la plante (Marino *et al.*, 2013). L'expression de *MIEL1* est rapidement réprimée dans les cellules inoculées, suggérant que (i) en l'absence de pathogène, MIEL1 régule négativement l'activation des défenses de la plante à travers la dégradation de MYB30 et que (ii) après inoculation avec un agent pathogène, la répression de l'expression de *MIEL1* libère MYB30 de sa régulation négative, permettant ainsi de déclencher la défense (Marino *et al.*, 2013).

D'autre part, la protéine MIEL1 fait partie d'une sous-famille de quatre membres (Figure 5.1 A), qui ont également été étudiés dans notre équipe et qui semblent aussi réguler négativement l'activité de MYB30 (D. Marino, V. Duplan, données non publiées). De manière intéressante, l'expression de *MIEL2* et *MIEL3* est réprimée lors de l'attaque par un agent pathogène, tout comme *MIEL1*, mais ***MIEL4*** suit un profil inverse, similaire à celui de MYB30 (Figure 5.1 B).

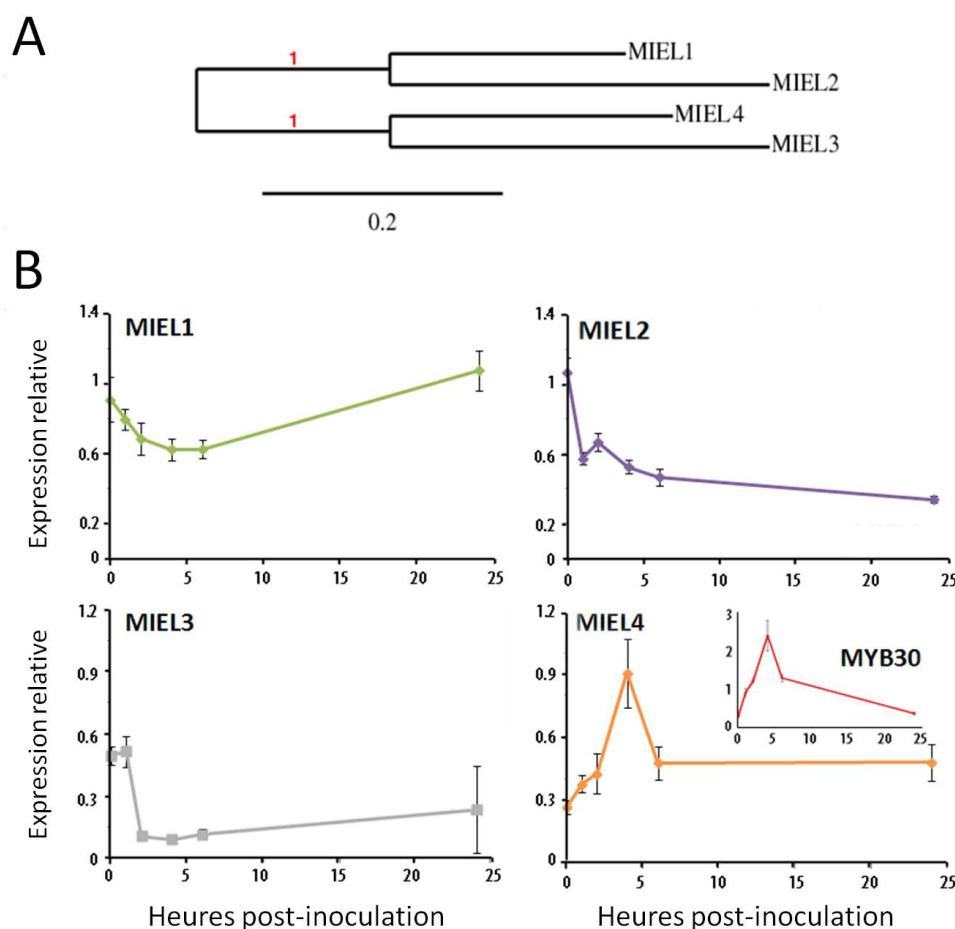


Figure 5.1 Membres de la famille *MIEL*

(A) Relations phylogénétiques entre les protéines de la famille *MIEL*. **(B)** Expression des gènes *MIEL* après inoculation avec la bactérie pathogène *Pst* DC3000 *AvrRpm1* (5×10^7 cfu/ml). Pour référence, l'expression du gène *MYB30* dans les mêmes conditions est montrée. Les valeurs d'expression ont été normalisées en utilisant le gène *MON1* comme standard interne. Les valeurs de moyennes et d'erreur-types ont été calculées à partir de 3 expériences indépendantes contenant chacune 4 réplicats.

Afin d'étudier le rôle de ces protéines dans la défense antibactérienne, des lignées d'*Arabidopsis* contenant une insertion T-DNA pour chacun de ces gènes ont été commandées et génotypées. Pour chaque gène *MIEL*, il a pu être obtenu une lignée ko homozygote correspondante, excepté pour *MIEL4*.

Deux lignées indépendantes contenant une insertion T-DNA dans le gène *MIEL4* ont été testées. La première, nommée *miel4-12* contient une insertion T-DNA située dans le dernier exon (exon 11) du gène, après la séquence codant pour le domaine catalytique de la protéine (Figure 5.2 A). Chez cette lignée, l'expression de *MIEL4* est équivalente à 40% de celle du sauvage au stade adulte (Figure 5.2 B), ce qui suggère que la lignée *miel4-12* pourrait exprimer une protéine catalytiquement active même si à un niveau réduit. La seconde lignée, appelée *miel4-07*, contient une insertion dans le quatrième intron (Figure 5.2 A) mais cette insertion n'a pu être obtenue qu'à l'état hétérozygote, suggérant ainsi que l'extinction de l'expression de *MIEL4* pourrait être létale.

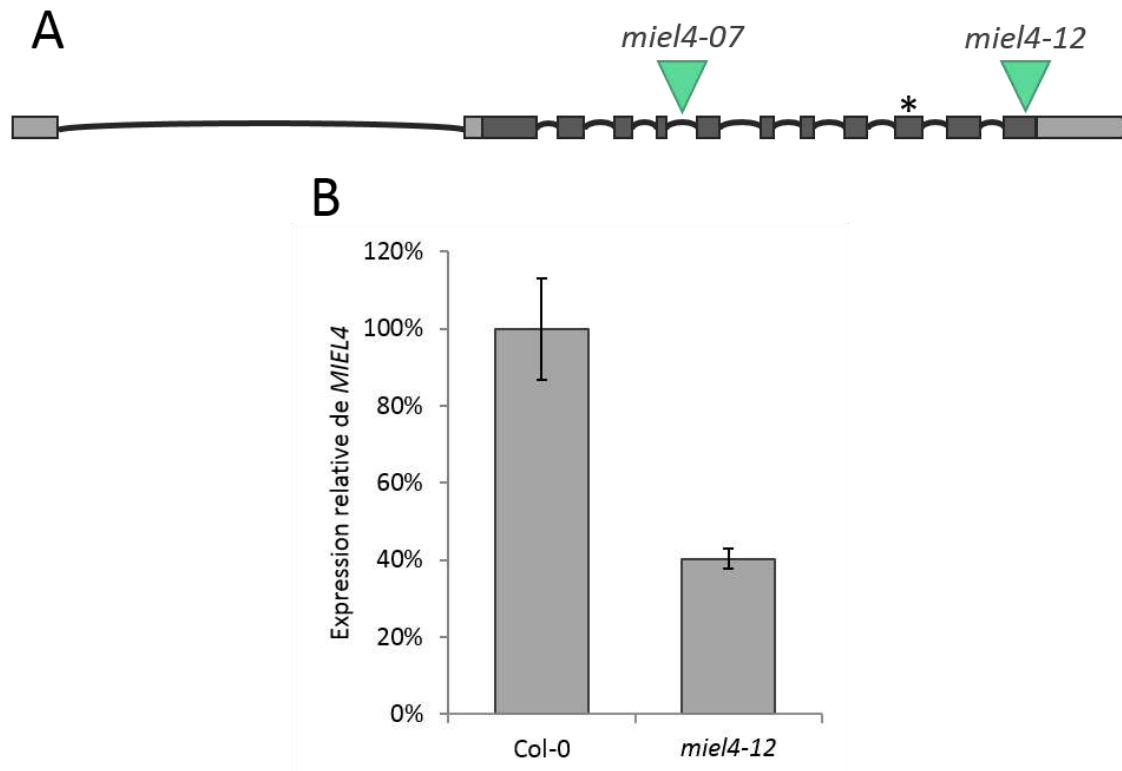


Figure 5.2 Position des insertions ADN-T des lignées mutantes *miel4-07* et *miel4-12* et analyse d'expression de *MIEL4* chez la plante adulte

(A) Sites d'insertions ADN-T de *miel4-07* et *miel4-12*. Les rectangles gris clairs et gris foncés représentent respectivement les régions UTR et les exons. Les lignes représentent les introns. La position de la séquence codante pour le domaine catalytique de la protéine est indiquée par un astérisque. (B) L'expression de *MIEL4* relative à celle du gène de référence *MON1* a été déterminée par RT-qPCR pour des plantules adultes de 4 semaines. Les résultats représentent les valeurs moyennes $\pm$ SE (n=4).

De façon intéressante, des données de micro-array publiques indiquent que le gène *MIEL4* est fortement exprimé dans les différents tissus de la graine au cours du développement embryonnaire (Figure 5.3; Belmonte *et al.*, 2013), suggérant un rôle pour cette E3-ligase lors du développement de la graine. Sur la base de ces observations, nous avons alors émis l'hypothèse que la suppression totale de l'expression de *MIEL4* pourrait inhiber la germination ou pourrait être létale pour l'embryon.

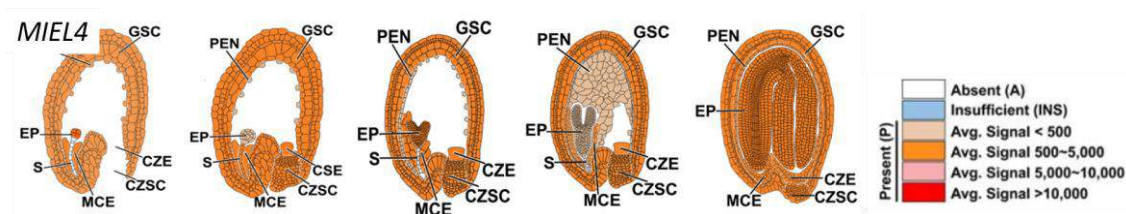


Figure 5.3 *MIEL4* est fortement exprimé pendant l'embryogenèse

Expression de *MIEL4* dans les différents tissus et au cours du développement de la graine d'après seedgenenetwork.net (Belmonte *et al.*, 2013). Les couleurs correspondent à l'intensité de signal moyen des réplicats biologiques, comme indiqué à droite. CZE : vésicule de l'albumen chalazal ; CZSC : chalaze ; EP : Embryon ; GSC : Téguments ; MCE : albumen mycropytaire ; PEN : albumen périphérique ; S : suspenseur.

5.1.1. Le gène *MIEL4* est requis pour le développement de l'embryon

Nous avons tout d'abord testé l'effet de la mutation *miel4-07* sur la germination de la graine. La mutation de la lignée *miel4-07* étant à l'état hétérozygote, seul un quart des plantes de la génération suivante pourraient présenter un phénotype, si l'effet de la mutation est récessif. Cependant, le test de germination a montré que 100% des graines issues d'une plante *miel4-07* sont capables de germer, montrant que la létalité de la mutation *miel4-07* n'est pas due à un défaut de germination de la graine.

Nous avons ensuite observé le développement embryonnaire des graines des plantes hétérozygotes *miel4-07*. Nous avons alors pu constater la létalité de 25% des graines dans des siliques matures. En effet, tandis que la majorité des graines étaient vertes et avaient atteint leur taille définitive, 25% d'entre elles environ étaient considérablement plus petites, apparaissaient dépourvues de tout contenu, et leurs tissus semblaient nécrosés (Figure 5.4 A). L'observation au microscope photonique à contraste interférentiel révéla que ces graines contenaient un embryon dont le développement s'était arrêté au stade cœur tardif, tandis que trois quarts environ contenaient un embryon mature (Figure 5.4 B et C). Ces résultats montrent donc que la protéine MIEL4 est requise pour le développement embryonnaire d'*Arabidopsis*.

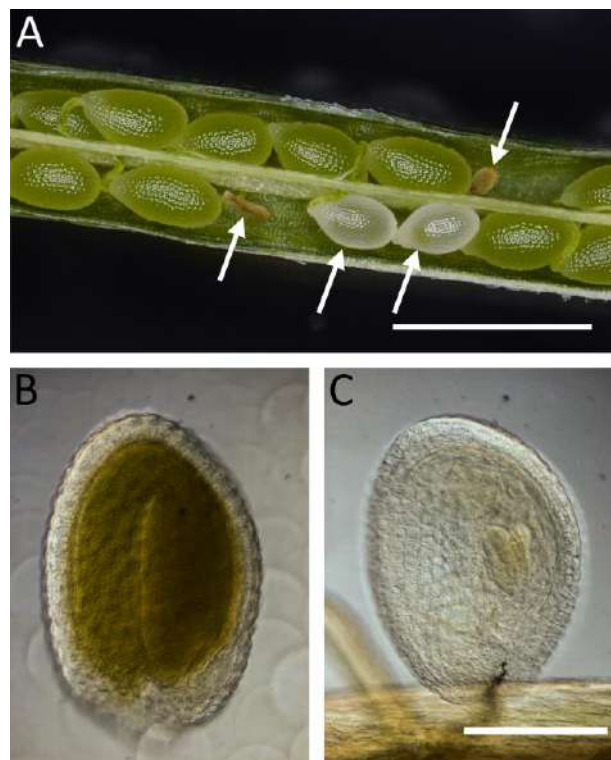


Figure 5.4 La mutation *knock-out* de *MIEL4* est létale pour l'embryon d'*Arabidopsis*

(A) Observation à la loupe binoculaire d'une silique hétérozygote *miel4-07*. Les flèches indiquent les graines nécrosées ou sur le point de l'être. Barre d'échelle = 1 mm. **(B-C)** Observation au microscope photonique à champs large de graines issues d'une plante hétérozygote *miel4-07*. La majorité des graines contiennent un embryon au stade mature (B) tandis qu'environ un quart d'entre elles contiennent un embryon dont le développement s'est arrêté au stade cœur tardif (C). Barre d'échelle = 250 µm.

Lors des premières étapes de l'embryogenèse, les angiospermes déterminent le plan d'organisation de la future plante grâce à une succession de divisions cellulaires bien spécifiques (Hove *et al.*, 2015). Compte-tenu de la létalité des embryons *miel4-07*, il est possible que MIEL4 soit impliqué dans la réalisation de ces divisions cellulaires. Par exemple, la mutation dans le gène *NAA10* crée des divisions cellulaires aberrante chez les embryons d'*Arabidopsis*, et leur létalité (Feng and Ma, 2016). Il serait intéressant d'observer l'embryon *miel4-07* au cours des stades précoces de développement afin de vérifier si les divisions cellulaires de ce mutant sont similaires à celles du sauvage.

5.1.2. Le rôle de MIEL4 sur le développement embryonnaire n'est pas dépendant de la présence de MYB30

Comme évoqué précédemment, MIEL4 est un régulateur négatif de l'accumulation de MYB30. De plus, MYB30 est (i) également exprimé durant l'embryogenèse, et particulièrement au stade cœur, (ii) un régulateur connu de la mort cellulaire et (iii) fortement contrôlé, de manière transcriptionnelle et post-traductionnelle. Sur la base de ces données, nous avons émis l'hypothèse que MIEL4 pourrait également être impliqué dans la dégradation de MYB30 dans l'embryon, et que chez les plantes *miel4ko*, la létalité de l'embryon pourrait être donc causée par une suraccumulation de la protéine MYB30.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé un croisement entre les lignées *miel4-07* et *myb30-02* pour vérifier s'il était possible d'obtenir une lignée double mutante. Cependant, après plusieurs générations testées, seules des plantes contenant la mutation pour *MYB30* à l'état homozygote et la mutation pour *MIEL4* à l'état hétérozygote ont pu être obtenues, mais aucune ne contenant les deux mutations à l'état homozygote. Par conséquent, la létalité des embryons *miel4-07* ne semble pas provenir d'un manque de régulation négative de l'activité de MYB30 par MIEL4.

5.1.3. La construction *pLEC2:MIEL4* ne suffit pas à compléter la létalité des embryons *miel4-07*

En vue de vérifier si MIEL4 n'est requis qu'au stade cœur du développement embryonnaire ou s'il est également nécessaire à des stades plus tardifs, nous avons transformé des plantes *miel4-07* hétérozygotes avec une construction *pLEC2:MIEL4*, contenant la séquence codante de *MIEL4* sous le contrôle du promoteur *pLEC2*, spécifique de l'embryogenèse (Berger *et al.*, 2011). De plus, une telle construction pourrait permettre en quelque sorte de compléter l'expression de *MIEL4* lors de l'embryogenèse uniquement, et éventuellement d'obtenir des plantes *miel4ko* adultes. Cependant, malgré la génération de plusieurs lignées indépendantes transgéniques *pLEC2:MIEL4*, aucune plante homozygote pour la mutation *miel4* n'a pu être obtenue parmi la descendance de ces lignées. L'analyse en microscopie photonique des siliques de ces plantes montra que de manière similaire aux plantes *miel4-07*, un quart environ des graines contenaient des embryons dont le développement s'était arrêté au stade cœur tardif (Figure 5.5).

Ces résultats suggèrent que (i) le niveau d'expression de *MIEL4* sous le contrôle du promoteur *pLEC2* n'est peut-être pas suffisant pour restaurer la fonction de *MIEL4* dans l'embryon, ou que (ii) la protéine tronquée produite par la lignée *miel4-07* pourrait jouer un effet dominant négatif sur le développement de l'embryon. Cependant, pour pouvoir conclure, il serait important de confirmer que *MIEL4* est bien exprimé dans la graine sous le contrôle du promoteur *pLEC2*.



Figure 5.5 La construction *pLEC2:MIEL4* ne suffit pas à compléter la létalité des embryons *miel4-07*

Observation au microscope photonique à champs large de graines issues d'une plante hétérozygote *miel4-07* portant la construction *pLEC2:MIEL4*. Barre d'échelle = 250 μ m.

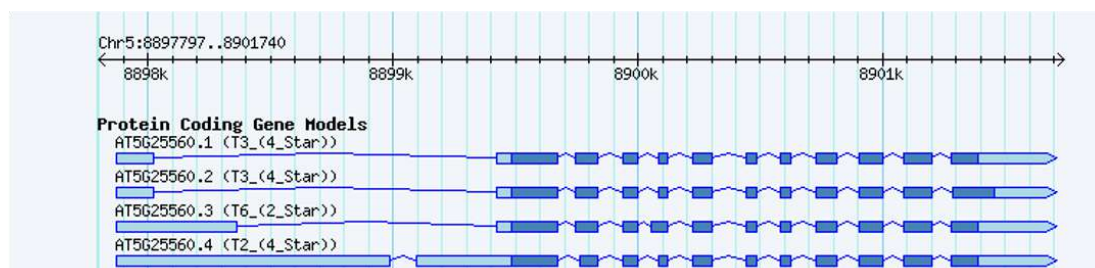
Nos résultats suggèrent que *MIEL4* est essentiel au développement de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*. Cependant, le rôle de cette E3 Ub-ligase dans le développement de la graine reste inconnu. Afin de répondre à cette question, l'observation d'autres mutants alléliques, *knock-down* pour l'expression de *MIEL4*, pourrait permettre d'étudier le rôle de *MIEL4* durant l'embryogenèse, notamment à des stades de développement plus tardifs que le stade cœur, où le développement des embryons *miel4-07* est arrêté. Il serait également intéressant de connaître plus précisément le profil d'expression spatio-temporel du gène *MIEL4* dans la graine, à l'aide d'une expérience d'hybridation *in situ* par exemple, ce qui permettrait de vérifier si *MIEL4* est exprimé dans l'épiderme de l'embryon comme *MYB30*. Par ailleurs, la même expérience d'hybridation *in situ* réalisée sur des graines issues d'une plante hétérozygote pour la mutation *miel4-07* permettrait de vérifier si les graines nécrosées ou sur le point de l'être correspondent au quart de la descendance qui n'exprime pas *MIEL4*, et donc de confirmer de manière directe que la mutation *miel4-07* est létale pour l'embryon. Enfin, *MIEL4* étant une E3 Ub-ligase, pour comprendre son rôle dans la graine d'*Arabidopsis*, il est essentiel d'identifier ses partenaires protéiques, et donc ses cibles potentielles. Dans ce but, une perspective de ce travail pourrait être de réaliser un crible double-hybride dans la levure, sur une banque cDNA générée à partir de graines d'*Arabidopsis* à des stades précoces de développement.

5.1.4. Le gène *MIEL4* est épissé de manière alternative

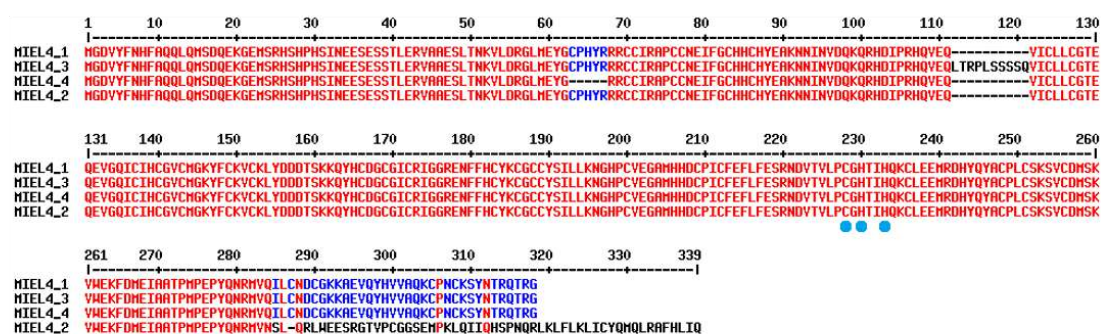
Des données *in silico* prédisent que le gène *MIEL4* pourrait être épissé alternativement, donnant lieu à quatre ARN messagers potentiels (arabidopsis.org; [Figure 5.6 A](#)). L'alignement des quatre protéines prédites montre que chaque forme contient les acides aminés composant le domaine RING d'activité de l'E3-Ub ligase, et notamment les résidus catalytiques essentiels, suggérant que toutes les formes potentielles pourraient être fonctionnelles ([Figure 5.6 B](#)). A l'aide d'amorces spécifiques à chaque forme, nous avons ensuite réalisé des PCR sur des cDNA provenant de différents tissus de la plante, et en condition d'inoculation ou non. La prédiction d'épissage alternatif de *MIEL4* assigne un indice de 4 étoiles aux isoformes 1, 2 et 4 de *MIEL4* et un indice de deux étoiles à l'isoforme 3 ([Figure 5.6 A](#)). De manière cohérente, nous avons pu prouver l'existence des formes 1, 2 et 4 dans toutes les conditions testées, mais pas de la forme 3 ([Figure 5.6 C et D](#)). Ces produits PCR ont ensuite été séquencés, permettant de confirmer que les séquences amplifiées correspondaient bien aux différentes formes de *MIEL4* attendues (données non montrées).

Chez les eucaryotes, l'épissage alternatif est un mécanisme qui a d'importantes conséquences pour la cellule, à la fois sur les niveaux d'ARN et de protéines. Tout d'abord, l'épissage alternatif peut introduire des codons stop prématurément, et ainsi conduire à la dégradation du transcrit (Nicholson and Mühlemann, 2010). La seconde conséquence majeure de l'épissage alternatif est la production de transcrits donnant lieu à des protéines qui varient dans leur séquence et l'arrangement de leurs domaines, et donc qui peuvent largement différer dans leur localisation subcellulaire, leur stabilité ou leur fonction (Syed *et al.*, 2012). L'épissage alternatif de *MIEL4* suggère que les différentes protéines issues des différents transcrits pourraient avoir des fonctions différentes, même si les différences de séquence entre les quatre isoformes sont assez limitées. L'étude de ces différences fonctionnelles est une perspective de recherche intéressante pour le futur.

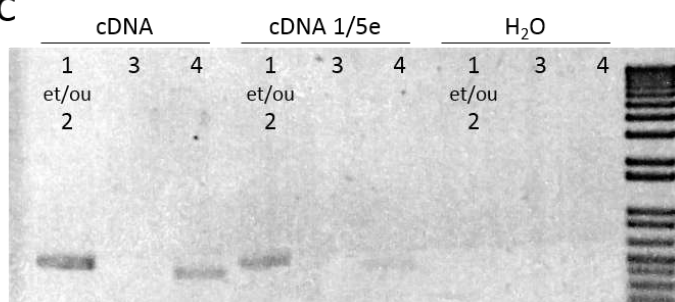
A



B



C



D

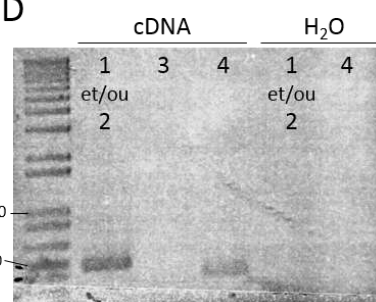


Figure 5.6 MIEL4 est épissé de façon alternative

(A) Prédiction du site TAIR (arabidopsis.org) à propos de la structure des ARN messagers du gène *MIEL4*. (B) Alignement des séquences prédites pour les quatre protéines issues de l'épissage alternatif de *MIEL4*. Les points bleus indiquent les résidus catalytiques du domaine RING. (C-D) RT-PCR sur des cDNAs générés à partir de feuilles (C) et de fleurs (D) d'*Arabidopsis*, utilisant des amorces spécifiques de chaque forme alternative de *MIEL4*. Les formes 1 et 2 sont indifférenciables sur gel, mais le sont après séquençage des produits de RT-PCR.

5.2. Matériel et Méthodes

Matériel végétal et conditions de culture

Toutes les lignées d'*Arabidopsis* utilisées dans cette étude sont dans le fond génétique Columbia (Col-0). Les lignées miel4-07 et miel4-12 correspondent respectivement aux lignées d'insertion SALK_073711 et SALK_121863. Les graines stérilisées ont été semées uniformément sur milieu Murashige Skoog (MS) contenant 0.5% sucrose et stratifiées pendant deux jours à l'obscurité, à 4°C. Après stratification, les plantes ont été cultivées en conditions de jour long (21°C, 16h jour/8h nuit) pendant sept jours, puis repiquées sur terreau et transférées en serre, en conditions de jour long (21°C, 16h jour/8h nuit).

Inoculation bactérienne

Les plantes d'*Arabidopsis* de 4 semaines ont été maintenues en condition d'humidité élevée pendant 12h avant inoculation. La face abaxiale des feuilles a été infiltrée avec une suspension bactérienne de *Pst* DC3000 AvrRpm1 (5×10^7 cfu/ml dans de l'eau). Les feuilles ont été collectées au temps indiqués après inoculation et gardées à -80°C jusqu'à l'étape suivante. Les échantillons ont ensuite été broyés dans de l'azote liquide, et l'ARN total a été isolé à l'aide du kit Nucleospin RNA plant (Macherey-Nagel) suivant les recommandations du fabricant. La transcription inverse a été réalisée en utilisant 1 µg d'ARN total. La PCR en temps réel a été réalisée à l'aide d'un appareil Light Cycler 480 II machine (Roche Diagnostics, France), un utilisant des réactifs Roches. L'expression relative a été calculée en tant que ΔC_p entre chaque gène et le contrôle interne [*MON1* (At2g28390)].

Microscopie

Afin d'observer les graines et d'évaluer leur stade de développement, les siliques ont été ouvertes à l'aide d'aiguilles, et les graines prélevées à l'aide de pinces, puis immergées dans une solution afin de les rendre transparentes (8 g chloral hydrate, 2 ml eau, 1 ml glycérol). Après montage entre lame et lamelle, les échantillons ont été incubés à 4°C durant la nuit puis observés à l'aide d'un microscope champ large à contraste interférentiel. Les images ont été acquises *via* le logiciel L.A.S. (Leica Application Suite)

Chapitre 6

Discussion générale
et perspectives

Le FT d'*Arabidopsis thaliana* MYB30, sujet d'étude de ce travail de thèse, a été longuement étudié. Son rôle certainement le mieux caractérisé est celui de régulateur positif des **réponses de défense** de la plante, à travers la biosynthèse des VLCFA et le déclenchement de la HR (Vaillau *et al.*, 2002; Raffaele *et al.*, 2008). Comme détaillé dans l'Introduction, diverses études ont montré que MYB30 est également impliqué dans de nombreux autres processus tels que la **floraison** (Liu *et al.*, 2014), la réponse à des hormones comme les **BR** ou l'**ABA** (Li *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2012), ou encore la réponse à des stress abiotiques comme l'**hypoxie**, le stress **oxydatif** et le stress **thermique** (Xie *et al.*, 2015; Liao *et al.*, 2017) (Figure 6.1). Venant compléter cette liste, cette thèse a permis d'identifier deux nouveaux rôles de MYB30: dans le contrôle de la formation de la **cuticule embryonnaire** et de l'**élongation cellulaire**. D'autre part, comme discuté dans le chapitre 3, il est probable que MYB30 puisse participer à la formation d'autres **couches cuticulaires** de la graine, de concert avec d'autres membres de sa sous-famille MYB, tels que MYB94 ou MYB96.

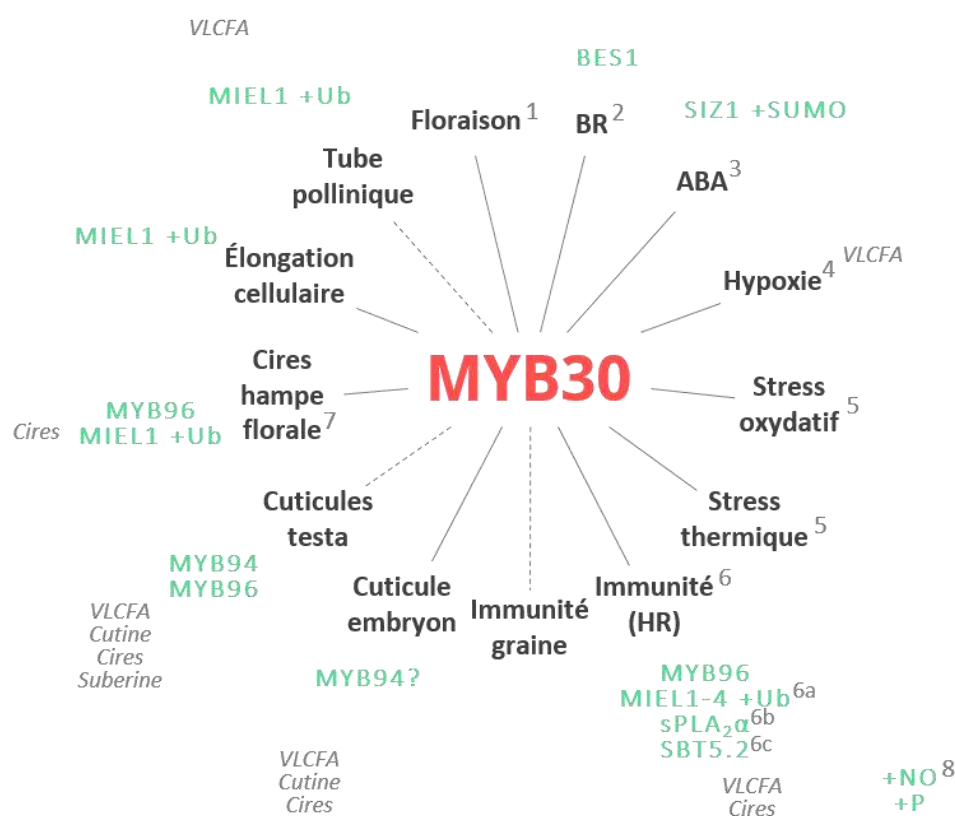


Figure 6.1 Les différentes facettes de MYB30

Le FT d'*Arabidopsis thaliana* MYB30 joue un rôle dans différents processus biotiques, abiotiques et développementaux (en noir), dans lesquels il est régulé par des partenaires protéiques ou des MPT (en vert). Deux MPT de MYB30, représentées en bas à droite, ont été démontrées mais ne sont pas à l'heure actuelle formellement reliées à un processus en particulier. Dans plusieurs processus dans lesquels il intervient, MYB30 active l'expression de gènes liés à la production des VLCFA ou de leurs dérivés (en gris). Les données publiées ou présentées dans cette thèse sont représentées par des traits pleins et les données supposées sont représentées par des pointillés ou le symbole "?". Ub: Ubiquitine; NO: Oxyde Nitrique; P: Phosphate. 1: Liu *et al.*, 2014; 2: Li *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2015; 5: Liao *et al.*, 2017; 6: Raffaele *et al.*, 2008; 6a: Marino *et al.*, 2013; 6b: Froidure *et al.*, 2010; 6c: Serrano *et al.*, 2016; 7: Gil *et al.*, 2017; 8: Tavares *et al.*, 2014

De plus, des données non publiées de notre équipe indiquent que MYB30 pourrait également jouer un rôle dans **l'élongation du tube pollinique**. En effet, les mutants *myb30-02* et *myb30-67* montrent un tube pollinique plus court que le sauvage, tout comme le mutant *miel1*. Les VLCFA sont des composés clés de la couche externe et de la membrane plasmique du pollen où ils jouent un rôle de protection et de signalisation au cours de la germination du pollen et d'élongation du tube pollinique (Jessen *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013; Edstam and Edqvist, 2014). De la même manière, la distribution spatiale contrôlée des composés pariétaux joue aussi un rôle central dans la croissance polarisée du tube pollinique. Sur la base de l'implication de MYB30 dans le contrôle transcriptionnel des gènes associés aux VLCFA et à la paroi cellulaire, notre équipe étudie à l'heure actuelle ce nouveau rôle de MYB30 (et de MIEL1) dans la croissance du tube pollinique. De plus, étant donnée l'importance de la voie florale dans la transmission verticale des agents pathogènes (capables de rentrer *via* le stigmate et traverser le style afin d'atteindre l'ovule), notre équipe cherche à déterminer si MYB30 et MIEL1 sont également impliqués dans la régulation de la sensibilité/résistance du pollen aux agents pathogènes.

Le rôle de MYB30 dans la formation de la cuticule embryonnaire est particulièrement intéressant car dû aux fonctions mêmes de la cuticule, il peut être vu comme un rôle développemental (la cuticule empêchant les fusions d'organes par exemple), ou immunitaire (la cuticule étant la première barrière de défense contre l'attaque d'agents pathogènes). De plus, nos données indiquent que lors de l'embryogenèse, en plus d'activer des gènes de biosynthèse de la cuticule, MYB30 active également un nombre important de gènes correspondant à des termes GO relatifs à la **défense** (Table 3.1). En plus de leur importance économique, les graines constituent un vecteur majeur de dissémination et de survie des agents pathogènes. En effet, la transmission à et par la semence est une étape critique dans l'épidémiologie de nombreuses maladies et permet aux microorganismes pathogènes de survivre et d'assurer leur dispersion (Darrasse *et al.*, 2010; Thiele *et al.*, 2012). La contamination des graines représente donc un facteur important de variabilité de la qualité des lots de semences, pouvant engendrer des pertes économiques majeures. Peu de choses sont connues sur les mécanismes de défense de la graine, mais l'activation des gènes de défense en réponse à une attaque par un agent pathogène a été décrite dans la graine, impactant le compromis (*trade-off*) entre immunité et développement (Terrasson *et al.*, 2015). De plus, certaines voies génétiques peuvent être conservées pour la régulation de processus immunitaires et développementaux, comme cela a pu être montré par exemple dans une étude où la construction d'un réseau de co-expression identifiant les gènes clés régulant l'acquisition de la longévité de la graine chez *Medicago* et *Arabidopsis* montre un nombre important de gènes avec une fonction connue dans la réponse aux stress biotiques (Righetti *et al.*, 2015). Cette même étude détaille le rôle de NF-X-LIKE 1 et WRKY3, deux FT d'*Arabidopsis* impliqués dans les réponses immunitaires, dont l'expression augmente durant la maturation de la graine. Ces FT régulent positivement l'expression de divers gènes clés de la maturation de la graine reliés à la défense, et leurs mutants respectifs sont affectés dans leur longévité et la perméabilité de leurs téguments (Righetti *et al.*, 2015). De manière similaire, nos données

viennent soutenir l'existence de ces liens entre des voies immunitaires et développementales en montrant un rôle de MYB30, GSO1 et GSO2 dans le renforcement de la cuticule embryonnaire et dans la défense. On peut donc supposer que MYB30 pourrait jouer un rôle dans la défense de la graine, et cette hypothèse est à l'étude dans notre équipe à l'heure actuelle.

L'ensemble des résultats de notre équipe et de la bibliographie révèle que MYB30 est capable d'agir à différents moments de la vie de la plante et au sein de différents tissus, tour à tour dans des contextes biotiques, abiotiques et développementaux, montrant un rôle majeur de ce FT dans la physiologie de la plante (Figure 6.1). Bien que nous soyons certainement encore loin de comprendre les détails moléculaires de son mode d'action ou de connaître tous ses rôles, on peut noter des **similitudes** dans les fonctions de MYB30 décrites jusqu'à présent. Par exemple, dans le cas des réactions immunitaires, de la production de cuticule embryonnaire ou de la réponse à l'hypoxie, MYB30 active l'expression de gènes reliés à la production de lipides de type VLCFA ou leurs dérivés (Raffaele *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2015). De plus, MYB30 semble s'associer avec d'autres FT, tels que BES1 lors de la réponse aux BR ou MYB96 pour la production de cires dans les hampe florales et pendant la HR (Li *et al.*, 2009; Gil *et al.*, 2017). En effet, nos données non publiées indiquent que MYB30 et MYB96 contrôlent un ensemble de gènes cibles communs reliés à la production de cires, après inoculation bactérienne.

Enfin, quel que soit le contexte, MYB30 semble **finement régulé**, aussi bien de manière transcriptionnelle que post-traductionnelle. Cela a pu être clairement démontré dans le contexte immunitaire, avec sept interacteurs protéiques et quatre MPT identifiées (voir section 1.5.6 de l'introduction), et il semblerait que l'on retrouve certains de ces interacteurs dans d'autres contextes, tels que MIEL1 dans l'élongation cellulaire, la biosynthèse des cires dans la hampe florale et la formation de tube pollinique. Ces interacteurs pourraient même être conservés pour la régulation de MYB30 chez d'autres espèces, car on retrouve les orthologues de plusieurs d'entre eux chez la Tomate (C. Audran, données non publiées) ou chez la Pomme (An *et al.*, 2017) notamment.

Cette régulation étroite a déjà été décrite pour certains FT animaux. Par exemple, les fonctions des protéines p53 et Forkhead box O3 (FOXO3a), deux FT régulant certaines fonctions cellulaires importantes comme la mitose ou l'apoptose et la protection contre la cancérisation pour la première, et l'apoptose, le maintien des cellules souches et le stress oxydatif pour la seconde, sont finement modulées par diverses MPT (Gu and Zhu, 2012; Calnan and Brunet, 2008). Cependant, moins d'exemples sont disponibles concernant les FT MYB végétaux. MYB30 représente donc un modèle intéressant pour l'étude des MPT et de leurs effets conjoints sur la régulation de l'activité d'un FT. Ces différentes MPT pourraient agir de concert pour contribuer à l'établissement d'une sorte de « **code-barre moléculaire** » complexe qui dicterait son comportement aux FT et les orientent dans le processus adéquat. En effet, certains FT sont multi-modifiés et des travaux montrent de façon élégante que ces modifications peuvent agir de manière combinée afin de réguler leur activité transcriptionnelle, par exemple en changeant leur capacité de

liaison à l'ADN, leur stabilité, leur structure tridimensionnelle ou en impactant leurs interactions avec des partenaires protéiques (Benayoun and Veitia, 2009; Lothrop *et al.*, 2013). Ce mécanisme serait comparable à "l'hypothèse du code histone" proposé par Strahl et Allis, suite à des travaux qui montrent que les MPT sur les queues des histones, seules ou en combinaison, définissent les spécificités de liaison à l'ADN ou d'interacteurs de ces protéines (Strahl and Allis, 2000). Ce modèle de « code-barre » pourrait notamment s'appliquer dans le cas de FT impliqués dans divers processus biologiques tel que MYB30, ce qui permettrait à la cellule végétale de n'utiliser qu'un seul gène pour l'activation de processus différents. Selon le contexte biologique, ces MPT pourraient entrer en compétition ou collaborer pour guider de façon différentielle l'activité de MYB30 et ainsi déclencher une réponse adéquate.

L'étude approfondie de ce mécanisme de régulation complexe est une perspective de recherche qu'il faudra aborder dans le futur.

Bibliographie

- Aharoni, A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., Arkel, G. van and Pereira, A.** (2004) The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2463–2480.
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N.R. and Yadav, R.C.** (2013) MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants Int. J. Funct. Plant Biol.*, **19**, 307–321.
- An, J.-P., Liu, X., Song, L.-Q., You, C.-X., Wang, X.-F. and Hao, Y.-J.** (2017) Apple RING finger E3 ubiquitin ligase MdMIEL1 negatively regulates salt and oxidative stresses tolerance. *J. Plant Biol.*, **60**, 137–145.
- Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A.R. and Fait, A.** (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci.*, **15**, 211–218.
- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., et al.** (1998) Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science*, **279**, 717–720.
- Bach, L., Michaelson, L.V., Haslam, R., et al.** (2008) The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 14727–14731.
- Barthlott, W., Mail, M. and Neinhuis, C.** (2016) Superhydrophobic hierarchically structured surfaces in biology: evolution, structural principles and biomimetic applications. *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.*, **374**.
- Bassel, G.W., Fung, P., Chow, T.F., Foong, J.A., Provart, N.J. and Cutler, S.R.** (2008) Elucidating the germination transcriptional program using small molecules. *Plant Physiol.*, **147**, 143–155.
- Baud, S., Boutin, J.-P., Miquel, M., Lepiniec, L. and Rochat, C.** (2002) An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol. Biochem.*, **40**, 151–160.
- Beaudoin, F., Wu, X., Li, F., Haslam, R.P., Markham, J.E., Zheng, H., Napier, J.A. and Kunst, L.** (2009) Functional characterization of the *Arabidopsis* beta-ketoacyl-coenzyme A reductase candidates of the fatty acid elongase. *Plant Physiol.*, **150**, 1174–1191.
- Beeckman, T., De Rycke, R., Viane, R. and Inzé, D.** (2000) Histological study of seed coat development in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.*, **113**, 139–148.
- Belmonte, M.F., Kirkbride, R.C., Stone, S.L., et al.** (2013) Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the *Arabidopsis* seed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, E435–E444.
- Benayoun, B.A. and Veitia, R.A.** (2009) A post-translational modification code for transcription factors: sorting through a sea of signals. *Trends Cell Biol.*, **19**, 189–197.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K. and Baulcombe, D.C.** (1999) The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*, **11**, 781–

- Berger, F.** (2003) Endosperm: the crossroad of seed development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**, 42–50.
- Berger, N., Dubreucq, B., Roudier, F., Dubos, C. and Lepiniec, L.** (2011) Transcriptional regulation of Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 involves RLE, a cis-element that regulates trimethylation of histone H3 at lysine-27. *Plant Cell*, **23**, 4065–4078.
- Berkey, R., Bendigeri, D. and Xiao, S.** (2012) Sphingolipids and Plant Defense/Disease: The “Death” Connection and Beyond. *Front. Plant Sci.*, **3**. Available at: http://www.frontiersin.org/Plant_Physiology/10.3389/fpls.2012.00068/abstract [Accessed May 3, 2013].
- Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., et al.** (2012) Reconstitution of plant alkane biosynthesis in yeast demonstrates that Arabidopsis ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 are core components of a very-long-chain alkane synthesis complex. *Plant Cell*, **24**, 3106–3118.
- Bernard, A. and Joubès, J.** (2013) Arabidopsis cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation. *Prog. Lipid Res.*, **52**, 110–129.
- Bessire, M., Borel, S., Fabre, G., et al.** (2011) A Member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE Family of ATP Binding Cassette Transporters Is Required for the Formation of a Functional Cuticle in Arabidopsis. *Plant Cell*, **23**, 1958–1970.
- Bhushan, B.** (2012) Bioinspired structured surfaces. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*, **28**, 1698–1714.
- Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., et al.** (2007) Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **52**, 485–498.
- Bird, S.M. and Gray, J.E.** (2003) Signals from the cuticle affect epidermal cell differentiation. *New Phytol.*, **157**, 9–23.
- 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.
- Bonaventure, G., Beisson, F., Ohlrogge, J. and Pollard, M.** (2004) Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with Arabidopsis epidermis: occurrence of octadeca-cis-6, cis-9-diene-1,18-dioate as the major component. *Plant J.*, **40**, 920–930.
- Bourdenx, B., Bernard, A., Domergue, F., et al.** (2011) Overexpression of Arabidopsis ECERIFERUM1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.*, **156**, 29–45.
- Boyer, L.A., Langer, M.R., Crowley, K.A., Tan, S., Denu, J.M. and Peterson, C.L.** (2002) Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol. Cell*, **10**, 935–942.
- Boyer, L.A., Latek, R.R. and Peterson, C.L.** (2004) The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 158–163.

- Braidwood, L., Breuer, C. and Sugimoto, K.** (2014) My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytol.*, **201**, 388–402.
- Buda, G.J., Isaacson, T., Matas, A.J., Paolillo, D.J. and Rose, J.K.C.** (2009) Three-dimensional imaging of plant cuticle architecture using confocal scanning laser microscopy. *Plant J.*, **60**, 378–385.
- Buscaill, P. and Rivas, S.** (2014) Transcriptional control of plant defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **20**, 35–46.
- Buschhaus, C. and Jetter, R.** (2012) Composition and physiological function of the wax layers coating Arabidopsis leaves: β -amyirin negatively affects the intracuticular water barrier. *Plant Physiol.*, **160**, 1120–1129.
- Calnan, D.R. and Brunet, A.** (2008) The FoxO code. *Oncogene*, **27**, 2276–2288.
- Canonne, J., Marino, D., Jauneau, A., Pouzet, C., Briere, C., Roby, D. and Rivas, S.** (2011) The Xanthomonas Type III Effector XopD Targets the Arabidopsis Transcription Factor MYB30 to Suppress Plant Defense. *Plant Cell*, **23**, 3498–3511.
- Chang, C., Yu, D., Jiao, J., Jing, S., Schulze-Lefert, P. and Shen, Q.-H.** (2013) Barley MLA immune receptors directly interfere with antagonistically acting transcription factors to initiate disease resistance signaling. *Plant Cell*, **25**, 1158–1173.
- Chassot, C.** (2006) *Cuticular defects or wounding lead to full immunity to a major plant pathogen*. Université de Fribourg. Available at: <https://doc.rero.ch/record/8222/files/ChassotC.pdf> [Accessed April 25, 2017].
- Chassot, C., Nawrath, C. and Métraux, J.-P.** (2007) Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen: Cuticle and immunity. *Plant J.*, **49**, 972–980.
- Chassot, C., Nawrath, C. and Métraux, J.-P.** (2008) The cuticle: Not only a barrier for plant defence. *Plant Signal. Behav.*, **3**, 142–144.
- Chen, X., Goodwin, S.M., Boroff, V.L., Liu, X. and Jenks, M.A.** (2003) Cloning and characterization of the WAX2 gene of Arabidopsis involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell*, **15**, 1170–1185.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.-H., Hong, X., Agarwal, M. and Zhu, J.-K.** (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes Dev.*, **17**, 1043–1054.
- Clapier, C.R. and Cairns, B.R.** (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 273–304.
- Coll, N.S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J.L. and Epple, P.** (2010) Arabidopsis Type I Metacaspases Control Cell Death. *Science*, **330**, 1393–1397.
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, S.L. and Tonelli, C.** (2005) A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Curr. Biol. CB*, **15**, 1196–1200.
- Cominelli, E., Sala, T., Calvi, D., Gusmaroli, G. and Tonelli, C.** (2008) Over-expression of

- the Arabidopsis AtMYB41 gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **53**, 53–64.
- Conaway, R.C., Brower, C.S. and Conaway, J.W.** (2002) Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science*, **296**, 1254–1258.
- Corbineau, F., Xia, Q., Bailly, C. and El-Maarouf-Bouteau, H.** (2014) Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Front. Plant Sci.*, **5**. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00539/full> [Accessed May 19, 2017].
- Creff, A., Brocard, L. and Ingram, G.** (2015) A mechanically sensitive cell layer regulates the physical properties of the Arabidopsis seed coat. *Nat. Commun.*, **6**, 6382.
- Cui, F., Brosché, M., Lehtonen, M.T., Amiryousefi, A., Xu, E., Punkkinen, M., Valkonen, J.P.T., Fujii, H. and Overmyer, K.** (2016) Dissecting Absciscic Acid Signaling Pathways Involved in Cuticle Formation. *Mol. Plant*, **9**, 926–938.
- Cui, H., Tsuda, K. and Parker, J.E.** (2015) Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **66**, 487–511.
- Daniel, X., Lacomme, C., Morel, J.-B. and Roby, D.** (1999) A novel myb oncogene homologue in Arabidopsis thaliana related to hypersensitive cell death. *Plant J.*, **20**, 57–66.
- Darrasse, A., Darsonval, A., Boureau, T., Brisset, M.-N., Durand, K. and Jacques, M.-A.** (2010) Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 6787–6796.
- De Giorgi, J., Piskurewicz, U., Loubery, S., Utz-Pugin, A., Bailly, C., Mène-Saffrané, L. and Lopez-Molina, L.** (2015) An Endosperm-Associated Cuticle Is Required for Arabidopsis Seed Viability, Dormancy and Early Control of Germination K. Bomblies, ed. *PLOS Genet.*, **11**, e1005708.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M. and Lepiniec, L.** (2003) Proanthocyanidin-Accumulating Cells in Arabidopsis Testa: Regulation of Differentiation and Role in Seed Development. *Plant Cell Online*, **15**, 2514–2531.
- Debono, A., Yeats, T.H., Rose, J.K.C., Bird, D., Jetter, R., Kunst, L. and Samuels, L.** (2009) Arabidopsis LTPG is a glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein required for export of lipids to the plant surface. *Plant Cell*, **21**, 1230–1238.
- Delude, C., Moussu, S., Joubès, J., Ingram, G. and Domergue, F.** (2016) Plant Surface Lipids and Epidermis Development. *Subcell. Biochem.*, **86**, 287–313.
- Denay, G., Creff, A., Moussu, S., Wagnon, P., Thévenin, J., Gérentes, M.-F., Chambrier, P., Dubreucq, B. and Ingram, G.** (2014) Endosperm breakdown in Arabidopsis requires heterodimers of the basic helix-loop-helix proteins ZHOUP1 and INDUCER OF CBP EXPRESSION 1. *Development*, **141**, 1222–1227.
- Deslandes, L. and Rivas, S.** (2012) Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci.*, **17**, 644–655.
- Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., Höfte, H.,**

- Gonneau, M. and Vernhettes, S.** (2007) Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 15572–15577.
- Desprez, T., Vernhettes, S., Fagard, M., Refregier, G., Desnos, T., Aletti, E., Py, N., Pelletier, S. and Hofte, H.** (2002) Resistance against Herbicide Isoxaben and Cellulose Deficiency Caused by Distinct Mutations in Same Cellulose Synthase Isoform CESA6. *PLANT Physiol.*, **128**, 482–490.
- Dodds, P.N. and Rathjen, J.P.** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 539–548.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J.A. and Heredia, A.** (2011) The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol.*, **189**, 938–949.
- Dou, D. and Zhou, J.-M.** (2012) Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe*, **12**, 484–495.
- Du, H., Wang, Y.-B., Xie, Y., Liang, Z., Jiang, S.-J., Zhang, S.-S., Huang, Y.-B. and Tang, Y.-X.** (2013) Genome-wide identification and evolutionary and expression analyses of MYB-related genes in land plants. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes*, **20**, 437–448.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C. and Lepiniec, L.** (2010) MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, **15**, 573–581.
- Duplan, V. and Rivas, S.** (2014) E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. *Plant Genet. Genomics*, **5**, 42.
- Edstam, M.M. and Edqvist, J.** (2014) Involvement of GPI-anchored lipid transfer proteins in the development of seed coats and pollen in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.*, **152**, 32–42.
- Eulgem, T. and Somssich, I.E.** (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **10**, 366–371.
- Fabre, G., Garroum, I., Mazurek, S., Daraspe, J., Mucciolo, A., Sankar, M., Humbel, B.M. and Nawrath, C.** (2016) The ABCG transporter PEC1/ABCG32 is required for the formation of the developing leaf cuticle in *Arabidopsis*. *New Phytol.*, **209**, 192–201.
- Fagard, M., Desnos, T., Desprez, T., et al.** (2000) PROCUSTE1 encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12**, 2409–2424.
- Fan, M., Bai, M.-Y., Kim, J.-G., et al.** (2014) The bHLH transcription factor HBI1 mediates the trade-off between growth and pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **26**, 828–841.
- Feng, J. and Ma, L.** (2016) NatA is required for suspensor development in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.*, **11**, e1231293.
- Fich, E.A., Segerson, N.A. and Rose, J.K.C.** (2016) The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **67**, 207–233.
- Fiume, E., Guyon, V., Remoué, C., Magnani, E., Miquel, M., Grain, D. and Lepiniec, L.**

- (2016) TWS1, a novel small protein, regulates various aspects of seed and plant development. *Plant Physiol.*
- Franke, R., Briesen, I., Wojciechowski, T., Faust, A., Yephremov, A., Nawrath, C. and Schreiber, L.** (2005) Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues--a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry*, **66**, 2643–2658.
- Froidure, S., Canonne, J., Daniel, X., Jauneau, A., Briere, C., Roby, D. and Rivas, S.** (2010) AtsPLA2- nuclear relocalization by the Arabidopsis transcription factor AtMYB30 leads to repression of the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 15281–15286.
- Froidure, Solène, Roby, D. and Rivas, S.** (2010) Expression of the Arabidopsis transcription factor AtMYB30 is post-transcriptionally regulated. *Plant Physiol. Biochem.*, **48**, 735–739.
- Garroum, I., Bidzinski, P., Daraspe, J., Mucciolo, A., Humbel, B.M., Morel, J.-B. and Nawrath, C.** (2016) Cuticular Defects in *Oryza sativa* ATP-binding Cassette Transporter G31 Mutant Plants Cause Dwarfism, Elevated Defense Responses and Pathogen Resistance. *Plant Cell Physiol.*, **57**, 1179–1188.
- Gassmann, W.** (2005) Natural variation in the Arabidopsis response to the avirulence gene hopPsyA uncouples the hypersensitive response from disease resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, **18**, 1054–1060.
- Gaume, L., Perret, P., Gorb, E., Gorb, S., Labat, J.-J. and Rowe, N.** (2004) How do plant waxes cause flies to slide? Experimental tests of wax-based trapping mechanisms in three pitfall carnivorous plants. *Arthropod Struct. Dev.*, **33**, 103–111.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M. and Hofte, H.** (1997) Cellular Basis of Hypocotyl Growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.*, **114**, 295–305.
- Gigolashvili, T., Berger, B., Mock, H.-P., Müller, C., Weisshaar, B. and Flügge, U.-I.** (2007) The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **50**, 886–901.
- Gigolashvili, T., Engqvist, M., Yatusevich, R., Müller, C. and Flügge, U.-I.** (2008) HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.*, **177**, 627–642.
- Gigolashvili, T., Yatusevich, R., Berger, B., Müller, C. and Flügge, U.-I.** (2007) The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **51**, 247–261.
- Gil, H.L., Kim, J., Chung, M.S. and Joon, P.S.** (2017) The MIEL1 E3 Ubiquitin Ligase Negatively Regulates Cuticular Wax Biosynthesis in Arabidopsis Stems. *Plant Cell Physiol.*, **58**, 1249–1259.
- Girard, A.-L., Mounet, F., Lemaire-Chamley, M., et al.** (2012) Tomato GDSL1 is required for cutin deposition in the fruit cuticle. *Plant Cell*, **24**, 3119–3134.
- Goslin, K., Zheng, B., Serrano-Mislata, A., et al.** (2017) Transcription Factor Interplay

- between LEAFY and APETALA1/CAULIFLOWER during Floral Initiation. *Plant Physiol.*, **174**, 1097–1109.
- Gou, M., Hou, G., Yang, H., Zhang, X., Cai, Y., Kai, G. and Liu, C.-J.** (2017) The MYB107 Transcription Factor Positively Regulates Suberin Biosynthesis. *Plant Physiol.*, **173**, 1045–1058.
- Gray, J.E., Holroyd, G.H., Lee, F.M. van der, Bahrami, A.R., Sijmons, P.C., Woodward, F.I., Schuch, W. and Hetherington, A.M.** (2000) The HIC signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature*, **408**, 713–716.
- Greer, S., Wen, M., Bird, D., Wu, X., Samuels, L., Kunst, L. and Jetter, R.** (2007) The cytochrome P450 enzyme CYP96A15 is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohols and ketones in stem cuticular wax of Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **145**, 653–667.
- Gu, B. and Zhu, W.-G.** (2012) Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int. J. Biol. Sci.*, **8**, 672–684.
- Guo, L., Yang, H., Zhang, X. and Yang, S.** (2013) Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, **64**, 1755–1767.
- Guo, Y.-L., Fitz, J., Schneeberger, K., Ossowski, S., Cao, J. and Weigel, D.** (2011) Genome-wide comparison of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **157**, 757–769.
- Haga, N., Kato, K., Murase, M., et al.** (2007) R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in Arabidopsis thaliana. *Dev. Camb. Engl.*, **134**, 1101–1110.
- Harwood, H.J.** (2005) Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition. *Expert Opin. Ther. Targets*, **9**, 267–281.
- Haughn, G. and Chaudhury, A.** (2005) Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.*, **10**, 472–477.
- Hegde, Y. and Kolattukudy, P.E.** (1997) Cuticular waxes relieve self-inhibition of germination and appressorium formation by the conidia of Magnaporthe grisea. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **51**, 75–84.
- Hegebarth, D., Buschhaus, C., Wu, M., Bird, D. and Jetter, R.** (2016) The composition of surface wax on trichomes of Arabidopsis thaliana differs from wax on other epidermal cells. *Plant J.*, **88**, 762–774.
- Heidrich, K., Wirthmueller, L., Tasset, C., Pouzet, C., Deslandes, L. and Parker, J.E.** (2011) Arabidopsis EDS1 connects pathogen effector recognition to cell compartment-specific immune responses. *Science*, **334**, 1401–1404.
- Hoang, M.H.T., Nguyen, X.C., Lee, K., Kwon, Y.S., Pham, H.T.T., Park, H.C., Yun, D.-J., Lim, C.O. and Chung, W.S.** (2012) Phosphorylation by AtMPK6 is required for the biological function of AtMYB41 in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **422**, 181–186.
- Höfer, R., Briesen, I., Beck, M., Pinot, F., Schreiber, L. and Franke, R.** (2008) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved

- in suberin monomer biosynthesis. *J. Exp. Bot.*, **59**, 2347–2360.
- Holmes, M.G.** (2002) An outdoor multiple wavelength system for the irradiation of biological samples: analysis of the long-term performance of various lamp and filter combinations. *Photochem. Photobiol.*, **76**, 158–163.
- Hong, L., Brown, J., Segerson, N.A., Rose, J.K.C. and Roeder, A.H.K.** (2017) CUTIN SYNTHASE 2 Maintains Progressively Developing Cuticular Ridges in Arabidopsis Sepals. *Mol. Plant*, **10**, 560–574.
- Hooker, T.S., Millar, A.A. and Kunst, L.** (2002) Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **129**, 1568–1580.
- Hove, C.A. ten, Lu, K.-J. and Weijers, D.** (2015) Building a plant: cell fate specification in the early Arabidopsis embryo. *Development*, **142**, 420–430.
- Ingram, G. and Nawrath, C.** (2017) The roles of the cuticle in plant development: organ adhesions and beyond. *J. Exp. Bot.* Available at: <https://academic-oup-com.insb.bib.cnrs.fr/jxb/article/doi/10.1093/jxb/erx313/4157303/The-roles-of-the-cuticle-in-plant-development> [Accessed September 19, 2017].
- Ingram, G.C.** (2017) Dying to live: cell elimination as a developmental strategy in angiosperm seeds. *J. Exp. Bot.*, **68**, 785–796.
- Ingram, G.C.** (2010) Family life at close quarters: communication and constraint in angiosperm seed development. *Protoplasma*, **247**, 195–214.
- Isaacson, T., Kosma, D.K., Matas, A.J., et al.** (2009) Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **60**, 363–377.
- Ito, M.** (2005) Conservation and diversification of three-repeat Myb transcription factors in plants. *J. Plant Res.*, **118**, 61–69.
- Jacob, F., Vernaldi, S. and Maekawa, T.** (2013) Evolution and Conservation of Plant NLR Functions. *Front. Immunol.*, **4**, 297.
- Jakobson, L., Lindgren, L.O., Verdier, G., Laanemets, K., Brosché, M., Beisson, F. and Kollist, H.** (2016) BODYGUARD is required for the biosynthesis of cutin in Arabidopsis. *New Phytol.*, **211**, 614–626.
- Javelle, M., Vernoud, V., Rogowsky, P.M. and Ingram, G.C.** (2011) Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytol.*, **189**, 17–39.
- Jeffree, C.E.** (2006) The fine structure of the plant cuticle. *Biol. Plant Cuticle*, **23**, 11–125.
- Jenks, M.A., Tuttle, H.A., Eigenbrode, S.D. and Feldmann, K.A.** (1995) Leaf Epicuticular Waxes of the Eceriferum Mutants in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **108**, 369–377.
- Jessen, D., Olbrich, A., Knüfer, J., Krüger, A., Hoppert, M., Polle, A. and Fulda, M.** (2011) Combined activity of LACS1 and LACS4 is required for proper pollen coat formation in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **68**, 715–726.
- Jetter, R., Kunst, L. and Samuels, A.L.** (2006) Composition of Plant Cuticular Waxes. In rkus Riederer and C. Müller, eds. *Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the*

Plant Cuticle. Blackwell Publishing Ltd, pp. 145–181. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470988718.ch4/summary> [Accessed October 8, 2017].

- Jia, L., Clegg, M.T. and Jiang, T.** (2004) Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from rice subspecies indica and japonica genomes. *Plant Physiol.*, **134**, 575–585.
- Jiang, J., Zhang, Z. and Cao, J.** (2013) Pollen wall development: the associated enzymes and metabolic pathways. *Plant Biol. Stuttg. Ger.*, **15**, 249–263.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323–329.
- Kanaoka, M.M., Pillitteri, L.J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N.L., Takabayashi, J., Zhu, J.-K. and Torii, K.U.** (2008) SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to arabidopsis stomatal differentiation. *Plant Cell*, **20**, 1775–1785.
- Kang, Y.H., Kirik, V., Hulskamp, M., Nam, K.H., Hagely, K., Lee, M.M. and Schiefelbein, J.** (2009) The MYB23 gene provides a positive feedback loop for cell fate specification in the Arabidopsis root epidermis. *Plant Cell*, **21**, 1080–1094.
- Karasov, T.L., Kniskern, J.M., Gao, L., et al.** (2014) The long-term maintenance of a resistance polymorphism through diffuse interactions. *Nature*, **512**, 436–440.
- Kim, H., Lee, S.B., Kim, H.J., Min, M.K., Hwang, I. and Suh, M.C.** (2012) Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein 2 (LTPG2) and overlapping function between LTPG/LTPG1 and LTPG2 in cuticular wax export or accumulation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.*, **53**, 1391–1403.
- Kim, T.H., Park, J.H., Kim, M.C. and Cho, S.H.** (2008) Cutin monomer induces expression of the rice OsLTP5 lipid transfer protein gene. *J. Plant Physiol.*, **165**, 345–349.
- Kolattukudy, P.E., Rogers, L.M., Li, D., Hwang, C.S. and Flaishman, M.A.** (1995) Surface signaling in pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 4080–4087.
- Kondou, Y., Nakazawa, M., Kawashima, M., et al.** (2008) RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth. *Plant Physiol.*, **147**, 1924–1935.
- Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lü, S., Joubès, J. and Jenks, M.A.** (2009) The Impact of Water Deficiency on Leaf Cuticle Lipids of Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **151**, 1918–1929.
- Krauss, P., Markstädter, C. and Riederer, M.** (1997) Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant Cell Environ.*, **20**, 1079–1085.
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., et al.** (2010) Perception of the Arabidopsis Danger Signal Peptide 1 Involves the Pattern Recognition Receptor At PEPR1 and Its Close Homologue At PEPR2. *J. Biol. Chem.*, **285**, 13471–13479.
- Krolikowski, K.A., Victor, J.L., Wagler, T.N., Lolle, S.J. and Pruitt, R.E.** (2003) Isolation and characterization of the Arabidopsis organ fusion gene HOTHEAD. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **35**, 501–511.
- Kurdyukov, S., Faust, A., Nawrath, C., et al.** (2006) The Epidermis-Specific Extracellular

- BODYGUARD Controls Cuticle Development and Morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, **18**, 321–339.
- Kurdyukov, S., Faust, A., Trenkamp, S., et al.** (2006) Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain α , ω -dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta*, **224**, 315–329.
- Lacomme, C. and Roby, D.** (1999) Identification of new early markers of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **459**, 149–153.
- Le, B.H., Cheng, C., Bui, A.Q., et al.** (2010) Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 8063–8070.
- Lee, B., Henderson, D.A. and Zhu, J.-K.** (2005) The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell*, **17**, 3155–3175.
- Lee, H.G. and Seo, P.J.** (2016) The Arabidopsis MIEL1 E3 ligase negatively regulates ABA signalling by promoting protein turnover of MYB96. *Nat. Commun.*, **7**, ncomms12525.
- Lee, H.G. and Seo, P.J.** (2015) The MYB96-HHP module integrates cold and abscisic acid signaling to activate the CBF-COR pathway in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **82**, 962–977.
- Lee, K., Lee, H.G., Yoon, S., Kim, H.U. and Seo, P.J.** (2015) The Arabidopsis MYB96 Transcription Factor Is a Positive Regulator of *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE4* in the Control of Seed Germination. *Plant Physiol.*, **168**, 677–689.
- Lee, K. and Seo, P.J.** (2015) Coordination of seed dormancy and germination processes by MYB96. *Plant Signal. Behav.*, **10**, e1056423.
- Lee, M.W., Qi, M. and Yang, Y.** (2001) A novel jasmonic acid-inducible rice myb gene associates with fungal infection and host cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, **14**, 527–535.
- Lee, S.B., Kim, H., Kim, R.J. and Suh, M.C.** (2014) Overexpression of Arabidopsis MYB96 confers drought resistance in *Camelina sativa* via cuticular wax accumulation. *Plant Cell Rep.*, **33**, 1535–1546.
- Lee, S.B., Kim, H.U. and Suh, M.C.** (2016) MYB94 and MYB96 Additively Activate Cuticular Wax Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, **57**, 2300–2311.
- Lee, S.B. and Suh, M.C.** (2015) Cuticular Wax Biosynthesis is Up-Regulated by the MYB94 Transcription Factor in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, **56**, 48–60.
- Leide, J., Hildebrandt, U., Reussing, K., Riederer, M. and Vogg, G.** (2007) The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: effects of a deficiency in a beta-ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6). *Plant Physiol.*, **144**, 1667–1679.
- Leliaert, F., Verbruggen, H. and Zechman, F.W.** (2011) Into the deep: New discoveries at the base of the green plant phylogeny. *BioEssays*, **33**, 683–692.
- Lenfant, N., Hotelier, T., Bourne, Y., Marchot, P. and Chatonnet, A.** (2013) Proteins with

an alpha/beta hydrolase fold: Relationships between subfamilies in an ever-growing superfamily. *Chem. Biol. Interact.*, **203**, 266–268.

- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. and Caboche, M.** (2006) Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 405–430.
- Lerouxel, O., Mouille, G., Andème-Onzighi, C., Bruyant, M.-P., Séveno, M., Loutelier-Bourhis, C., Driouich, A., Höfte, H. and Lerouge, P.** (2005) Mutants in DEFECTIVE GLYCOSYLATION, an Arabidopsis homolog of an oligosaccharyltransferase complex subunit, show protein underglycosylation and defects in cell differentiation and growth. *Plant J.*, **42**, 455–468.
- L’Haridon, F., Besson-Bard, A., Binda, M., et al.** (2011) A permeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity. *PLoS Pathog.*, **7**, e1002148.
- Li, F., Wu, X., Lam, P., Bird, D., Zheng, H., Samuels, L., Jetter, R. and Kunst, L.** (2008) Identification of the wax ester synthase/acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **148**, 97–107.
- Li, J., Wang, X., Qin, T., et al.** (2011) MDP25, A Novel Calcium Regulatory Protein, Mediates Hypocotyl Cell Elongation by Destabilizing Cortical Microtubules in Arabidopsis. *Plant Cell Online*, **23**, 4411–4427.
- Li, L., Yu, X., Thompson, A., Guo, M., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J. and Yin, Y.** (2009) Arabidopsis MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression. *Plant J.*, **58**, 275–286.
- Li, Y., Beisson, F., Koo, A.J.K., Molina, I., Pollard, M. and Ohlrogge, J.** (2007) Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 18339–18344.
- Liao, C., Zheng, Y. and Guo, Y.** (2017) MYB30 transcription factor regulates oxidative and heat stress responses through ANNEXIN-mediated cytosolic calcium signaling in Arabidopsis. *New Phytol.* Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/nph.14679> [Accessed July 25, 2017].
- Libault, M., Wan, J., Czechowski, T., Udvardi, M. and Stacey, G.** (2007) Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, **20**, 900–911.
- Li-Beisson, Y., Pollard, M., Sauveplane, V., Pinot, F., Ohlrogge, J. and Beisson, F.** (2009) Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 22008.
- Lipsick, J.S., Manak, J., Mitiku, N., Chen, C.K., Fogarty, P. and Guthrie, E.** (2001) Functional evolution of the Myb oncogene family. *Blood Cells. Mol. Dis.*, **27**, 456–458.
- Liu, L., Zhang, J., Adrian, J., Gissot, L., Coupland, G., Yu, D. and Turck, F.** (2014) Elevated Levels of MYB30 in the Phloem Accelerate Flowering in Arabidopsis through the Regulation of FLOWERING LOCUS T. *PLOS ONE*, **9**, e89799.
- 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 San Diego Calif*, **25**, 402–408.
- Lolle, S.J., Hsu, W. and Pruitt, R.E.** (1998) Genetic analysis of organ fusion in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **149**, 607–619.
- López-Bucio, J.S., Dubrovsky, J.G., Raya-González, J., Ugartechea-Chirino, Y., López-Bucio, J., Luna-Valdez, L.A. de, Ramos-Vega, M., León, P. and Guevara-García, A.A.** (2014) *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J. Exp. Bot.*, **65**, 169–183.
- Lothrop, A.P., Torres, M.P. and Fuchs, S.M.** (2013) Deciphering post-translational modification codes. *FEBS Lett.*, **587**, 1247–1257.
- Lozano-Durán, R., Macho, A.P., Boutrot, F., Segonzac, C., Somssich, I.E. and Zipfel, C.** (2013) The transcriptional regulator BZR1 mediates trade-off between plant innate immunity and growth. *eLife*, **2**, e00983.
- Lü, S., Song, T., Kosma, D.K., Parsons, E.P., Rowland, O. and Jenks, M.A.** (2009) *Arabidopsis* CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **59**, 553–564.
- Lukowitz, W., Nickle, T.C., Meinke, D.W., Last, R.L., Conklin, P.L. and Somerville, C.R.** (2001) *Arabidopsis* cyt1 mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 2262–2267.
- Macho, A.P. and Zipfel, C.** (2014) Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Mol. Cell*, **54**, 263–272.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L. and Dietrich, R.A.** (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.*, **26**, 403–410.
- Malinovsky, F.G., Batoux, M., Schwessinger, B., Youn, J.H., Stransfeld, L., Win, J., Kim, S.-K. and Zipfel, C.** (2014) Antagonistic regulation of growth and immunity by the *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factor homolog of brassinosteroid enhanced expression2 interacting with increased leaf inclination1 binding bHLH1. *Plant Physiol.*, **164**, 1443–1455.
- Marian, C.O. and Bass, H.W.** (2005) The Terminal acidic SANT 1 (Tacs1) gene of maize is expressed in tissues containing meristems and encodes an acidic SANT domain similar to some chromatin-remodeling complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1727**, 81–86.
- Marino, D., Froidure, S., Canonne, J., Ben Khaled, S., Khafif, M., Pouzet, C., Jauneau, A., Roby, D. and Rivas, S.** (2013) *Arabidopsis* ubiquitin ligase MIEL1 mediates degradation of the transcription factor MYB30 weakening plant defence. *Nat. Commun.*, **4**, 1476.
- Marino, D., Peeters, N. and Rivas, S.** (2012) Ubiquitination during Plant Immune Signaling. *Plant Physiol.*, **160**, 15–27.

- McFarlane, H.E., Döring, A. and Persson, S.** (2014) The Cell Biology of Cellulose Synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **65**, 69–94.
- McFarlane, H.E., Shin, J.J.H., Bird, D.A. and Samuels, A.L.** (2010) Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell*, **22**, 3066–3075.
- Mengiste, T., Chen, X., Salmeron, J. and Dietrich, R.** (2003) The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell*, **15**, 2551–2565.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H. and Michelmore, R.W.** (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, **15**, 809–834.
- Millar, A.A., Clemens, S., Zachgo, S., GIBLIN, E.M., Taylor, D.C. and Kunst, L.** (1999) CUT1, an Arabidopsis gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell*, **11**, 825–838.
- Miura, K., Jin, J.B., Lee, J., et al.** (2007) SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**, 1403–1414.
- Moussu, S.A., Doll, N.M., Chamot, S., Brocard, L., Creff, A., Fourquin, C., Widiez, T., Nimchuk, Z.L. and Ingram, G.C.** (2017) ZHOUP1 and KERBEROS Mediate Embryo/Endosperm Separation by Promoting the Formation of an Extra-Cuticular Sheath at the Embryo Surface. *Plant Cell*, tpc.00016.2017.
- Mulroy, T.W.** (1979) Spectral properties of heavily glaucous and non-glaucous leaves of a succulent rosette-plant. *Oecologia*, **38**, 349–357.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H. and Prats, E.** (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.*, **59**, 501–520.
- Nagarajan, V.K., Satheesh, V., Poling, M.D., Raghothama, K.G. and Jain, A.** (2016) Arabidopsis MYB-Related HHO2 Exerts a Regulatory Influence on a Subset of Root Traits and Genes Governing Phosphate Homeostasis. *Plant Cell Physiol.*, **57**, 1142–1152.
- Nakayama, T., Shinohara, H., Tanaka, M., Baba, K., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y.** (2017) A peptide hormone required for Casparian strip diffusion barrier formation in Arabidopsis roots. *Science*, **355**, 284–286.
- Nawrath, C.** (2006) Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 281–287.
- Nemie-Feyissa, D., Olafsdottir, S.M., Heidari, B. and Lillo, C.** (2014) Nitrogen depletion and small R3-MYB transcription factors affecting anthocyanin accumulation in Arabidopsis leaves. *Phytochemistry*, **98**, 34–40.
- Nguyen, N.H. and Lee, H.** (2016) MYB-related transcription factors function as regulators of the circadian clock and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.*, **11**, e1139278.
- Nicholson, P. and Mühlemann, O.** (2010) Cutting the nonsense: the degradation of PTC-containing mRNAs. *Biochem. Soc. Trans.*, **38**, 1615–1620.

- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H. and Höfte, H.** (1998) A plasma membrane-bound putative endo-1,4- β -d-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in Arabidopsis. *EMBO J.*, **17**, 5563–5576.
- Nonogaki, H.** (2014) Seed dormancy and germination—emerging mechanisms and new hypotheses. *Front. Plant Sci.*, **5**. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00233/full> [Accessed May 19, 2017].
- Ogata, K., Kanei-Ishii, C., Sasaki, M., et al.** (1996) The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 178–187.
- Oh, J.E., Kwon, Y., Kim, J.H., Noh, H., Hong, S.-W. and Lee, H.** (2011) A dual role for MYB60 in stomatal regulation and root growth of Arabidopsis thaliana under drought stress. *Plant Mol. Biol.*, **77**, 91–103.
- Ohlrogge, J. and Browse, J.** (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, **7**, 957–970.
- Okada, S., Nagabuchi, M., Takamura, Y., Nakagawa, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J. and Tanaka, K.** (2009) Reconstitution of Arabidopsis thaliana SUMO Pathways in E. coli: Functional Evaluation of SUMO Machinery Proteins and Mapping of SUMOylation Sites by Mass Spectrometry. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1049–1061.
- Oshima, Y., Shikata, M., Koyama, T., Ohtsubo, N., Mitsuda, N. and Ohme-Takagi, M.** (2013) MIXTA-Like Transcription Factors and WAX INDUCER1/SHINE1 Coordinately Regulate Cuticle Development in Arabidopsis and Torenia fournieri[C][W]. *Plant Cell*, **25**, 1609–1624.
- Pabo, C.O. and Sauer, R.T.** (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 1053–1095.
- Pagant, S., Bichet, A., Sugimoto, K., Lerouxel, O., Desprez, T., McCann, M., Lerouge, P., Vernhettes, S. and Höfte, H.** (2002) KOBITO1 Encodes a Novel Plasma Membrane Protein Necessary for Normal Synthesis of Cellulose during Cell Expansion in Arabidopsis. *Plant Cell Online*, **14**, 2001–2013.
- Panikashvili, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., Yifhar, T., Franke, R.B., Höfer, R., Schreiber, L., Chory, J. and Aharoni, A.** (2007) The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol.*, **145**, 1345–1360.
- Park, J.H., Suh, M.C., Kim, T.H., Kim, M.C. and Cho, S.H.** (2008) Expression of glycine-rich protein genes, AtGRP5 and AtGRP23, induced by the cutin monomer 16-hydroxypalmitic acid in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol. Biochem. PPB*, **46**, 1015–1018.
- Park, J.-S., Kim, J.-B., Cho, K.-J., Cheon, C.-I., Sung, M.-K., Choung, M.-G. and Roh, K.-H.** (2008) Arabidopsis R2R3-MYB transcription factor AtMYB60 functions as a transcriptional repressor of anthocyanin biosynthesis in lettuce (Lactuca sativa). *Plant Cell Rep.*, **27**, 985–994.
- Parsons, E.P., Popovskiy, S., Lohrey, G.T., Lü, S., Alkalai-Tuvia, S., Perzelan, Y., Paran, I., Fallik, E. and Jenks, M.A.** (2012) Fruit cuticle lipid composition and fruit post-harvest water loss in an advanced backcross generation of pepper (Capsicum sp.).

Physiol. Plant., **146**, 15–25.

- Pesch, M. and Hülskamp, M.** (2009) One, two, three...models for trichome patterning in Arabidopsis? *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**, 587–592.
- Pighin, J.A., Zheng, H., Balakshin, L.J., Goodman, I.P., Western, T.L., Jetter, R., Kunst, L. and Samuels, A.L.** (2004) Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science*, **306**, 702–704.
- Pineau, E., Xu, L., Renault, H., et al.** (2017) Arabidopsis thaliana EPOXIDE HYDROLASE1 (AtEH1) is a cytosolic epoxide hydrolase involved in the synthesis of poly-hydroxylated cutin monomers. *New Phytol.*, n/a-n/a.
- Pireyre, M. and Burow, M.** (2015) Regulation of MYB and bHLH transcription factors: a glance at the protein level. *Mol. Plant*, **8**, 378–388.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y. and Ohlrogge, J.B.** (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci.*, **13**, 236–246.
- Pruitt, R.E., Vielle-Calzada, J.P., Ploense, S.E., Grossniklaus, U. and Lolle, S.J.** (2000) FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in Arabidopsis, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 1311–1316.
- Racolta, A., Bryan, A.C. and Tax, F.E.** (2014) The receptor-like kinases GSO1 and GSO2 together regulate root growth in *arabidopsis* through control of cell division and cell fate specification: Roles of GSO1 and GSO2 in roots. *Dev. Dyn.*, **243**, 257–278.
- Radchuk, V. and Borisjuk, L.** (2014) Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. *Front. Plant Sci.*, **5**. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00510/full> [Accessed May 19, 2017].
- Raffaele, S. and Rivas, S.** (2013) Regulate and be regulated: integration of defense and other signals by the AtMYB30 transcription factor. *Front. Plant Sci.*, **4**. Available at: http://www.frontiersin.org/Plant-Microbe_Interaction/10.3389/fpls.2013.00098/abstract [Accessed May 3, 2013].
- Raffaele, S., Rivas, S. and Roby, D.** (2006) An essential role for salicylic acid in AtMYB30-mediated control of the hypersensitive cell death program in Arabidopsis. *FEBS Lett.*, **580**, 3498–3504.
- Raffaele, S., Vaillau, F., Leger, A., et al.** (2008) A MYB Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in Arabidopsis. *Plant Cell*, **20**, 752–767.
- Rautengarten, C., Ebert, B., Ouellet, M., et al.** (2012) Arabidopsis Deficient in Cutin Ferulate encodes a transferase required for feruloylation of ω -hydroxy fatty acids in cutin polyester. *Plant Physiol.*, **158**, 654–665.
- Riederer, M. and Muller, C.** (2008) *Annual Plant Reviews, Biology of the Plant Cuticle*, John Wiley & Sons.
- Riederer, M. and Schreiber, L.** (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J. Exp. Bot.*, **52**, 2023–2032.
- Righetti, K., Vu, J.L., Pelletier, S., et al.** (2015) Inference of Longevity-Related Genes from

- a Robust Coexpression Network of Seed Maturation Identifies Regulators Linking Seed Storability to Biotic Defense-Related Pathways. *Plant Cell Online*, **27**, 2692–2708.
- Rosinski, J.A. and Atchley, W.R.** (1998) Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *J. Mol. Evol.*, **46**, 74–83.
- Rowland, O., Lee, R., Franke, R., Schreiber, L. and Kunst, L.** (2007) The CER3 wax biosynthetic gene from *Arabidopsis thaliana* is allelic to WAX2/YRE/FLP1. *FEBS Lett.*, **581**, 3538–3544.
- Rowland, O., Zheng, H., Hepworth, S.R., Lam, P., Jetter, R. and Kunst, L.** (2006) CER4 encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **142**, 866–877.
- Rozema, J., Staaij, J. van de, Björn, L.O. and Caldwell, M.** (1997) UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends Ecol. Evol.*, **12**, 22–28.
- Russell, S.D.** (1993) The Egg Cell: Development and Role in Fertilization and Early Embryogenesis. *Plant Cell*, **5**, 1349–1359.
- Sadanandom, A., Bailey, M., Ewan, R., Lee, J. and Nelis, S.** (2012) The ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signalling. *New Phytol.*, **196**, 13–28.
- Saladié, M., Matas, A.J., Isaacson, T., et al.** (2007) A Reevaluation of the Key Factors That Influence Tomato Fruit Softening and Integrity. *Plant Physiol.*, **144**, 1012–1028.
- Samuels, L., Kunst, L. and Jetter, R.** (2008) Sealing Plant Surfaces: Cuticular Wax Formation by Epidermal Cells. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**, 683–707.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W.** (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, **9**, 671–675.
- Schnurr, J., Shockey, J. and Browse, J.** (2004) The Acyl-CoA Synthetase Encoded by LACS2 Is Essential for Normal Cuticle Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online*, **16**, 629–642.
- Schweizer, P., Jeanguenat, A., Whitacre, D., Métraux, J.-P. and Mösing, E.** (1996) Induction of resistance in barley against *Erysiphe graminis* f.sp. *hordeiby* free cutin monomers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **49**, 103–120.
- Seo, P.J., Lee, S.B., Suh, M.C., Park, M.-J., Go, Y.S. and Park, C.-M.** (2011) The MYB96 Transcription Factor Regulates Cuticular Wax Biosynthesis under Drought Conditions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **23**, 1138–1152.
- Seo, P.J. and Park, C.-M.** (2010) MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *New Phytol.*, **186**, 471–483.
- Seo, P.J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J.-Y., Lee, Y.N., Kim, S.-G., Lee, Y.-H., Park, W.J. and Park, C.-M.** (2009) The MYB96 Transcription Factor Mediates Absciscic Acid Signaling during Drought Stress Response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **151**, 275–289.
- Serrano, I., Buscaill, P., Audran, C., Pouzet, C., Jauneau, A. and Rivas, S.** (2016) A non

- canonical subtilase attenuates the transcriptional activation of defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, **5**, e19755.
- Shepherd, T. and Wynne Griffiths, D.** (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol.*, **171**, 469–499.
- Shi, J.X., Malitsky, S., Oliveira, S.D., Branigan, C., Franke, R.B., Schreiber, L. and Aharoni, A.** (2011) SHINE Transcription Factors Act Redundantly to Pattern the Archetypal Surface of *Arabidopsis* Flower Organs. *PLOS Genet.*, **7**, e1001388.
- Shim, J.S. and Choi, Y.D.** (2013) Direct regulation of WRKY70 by AtMYB44 in plant defense responses. *Plant Signal. Behav.*, **8**, e20783.
- Shin, R., Burch, A.Y., Huppert, K.A., Tiwari, S.B., Murphy, A.S., Guilfoyle, T.J. and Schachtman, D.P.** (2007) The *Arabidopsis* transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction. *Plant Cell*, **19**, 2440–2453.
- Shirakawa, M., Ueda, H., Nagano, A.J., Shimada, T., Kohchi, T. and Hara-Nishimura, I.** (2014) FAMA is an essential component for the differentiation of two distinct cell types, myrosin cells and guard cells, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **26**, 4039–4052.
- Sieber, P., Schorderet, M., Ryser, U., Buchala, A., Kolattukudy, P., Métraux, J.P. and Nawrath, C.** (2000) Transgenic *Arabidopsis* plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. *Plant Cell*, **12**, 721–738.
- Stangeland, B. and Salehian, Z.** (2002) An improved clearing method for GUS assay in *Arabidopsis* endosperm and seeds. *Plant Mol. Biol. Report.*, **20**, 107–114.
- Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G.A., Van Kammen, A. and De Vries, S.C.** (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, **3**, 907–921.
- Stone, S.L., Hauksdóttir, H., Troy, A., Herschleb, J., Kraft, E. and Callis, J.** (2005) Functional Analysis of the RING-Type Ubiquitin Ligase Family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **137**, 13–30.
- Stracke, R., Werber, M. and Weisshaar, B.** (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 447–456.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D.** (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41–45.
- Sugimoto, K., Takeda, S. and Hirochika, H.** (2000) MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes. *Plant Cell*, **12**, 2511–2528.
- Suh, M.C., Samuels, A.L., Jetter, R., Kunst, L., Pollard, M., Ohlrogge, J. and Beisson, F.** (2005) Cuticular Lipid Composition, Surface Structure, and Gene Expression in *Arabidopsis* Stem Epidermis. *Plant Physiol.*, **139**, 1649–1665.
- Syed, N.H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A. and Brown, J.W.S.** (2012) Alternative splicing in plants—coming of age. *Trends Plant Sci.*, **17**, 616–623.
- Tanaka, H., Onouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Machida, C. and**

- Machida, Y.** (2001) A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in Arabidopsis embryos and juvenile plants. *Dev. Camb. Engl.*, **128**, 4681–4689.
- Tanaka, T., Tanaka, H., Machida, C., Watanabe, M. and Machida, Y.** (2004) A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in Arabidopsis. *Plant J.*, **37**, 139–146.
- Tang, D., Simonich, M.T. and Innes, R.W.** (2007) Mutations in LACS2, a Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase, Enhance Susceptibility to Avirulent *Pseudomonas syringae* But Confer Resistance to *Botrytis cinerea* in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **144**, 1093–1103.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G. and Katagiri, F.** (2003) Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, **15**, 317–330.
- Tavares, C.P., Vernal, J., Delena, R.A., Lamattina, L., Cassia, R. and Terenzi, H.** (2014) S-nitrosylation influences the structure and DNA binding activity of AtMYB30 transcription factor from Arabidopsis thaliana. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, **1844**, 810–817.
- Terrasson, E., Darrasse, A., Righetti, K., et al.** (2015) Identification of a molecular dialogue between developing seeds of *Medicago truncatula* and seedborne xanthomonads. *J. Exp. Bot.*, **66**, 3737–3752.
- Thiele, K., Smalla, K., Kropf, S. and Rabenstein, F.** (2012) Detection of *Acidovorax valerianellae*, the causing agent of bacterial leaf spots in corn salad [*Valerianella locusta* (L.) Laterr.], in corn salad seeds. *Lett. Appl. Microbiol.*, **54**, 112–118.
- To, A., Joubès, J., Barthole, G., Lécureuil, A., Scagnelli, A., Jasinski, S., Lepiniec, L. and Baud, S.** (2012) WRINKLED transcription factors orchestrate tissue-specific regulation of fatty acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, **24**, 5007–5023.
- Todd, J., Post-Beittenmiller, D. and Jaworski, J.G.** (1999) KCS1 encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **17**, 119–130.
- Tsuda, K. and Katagiri, F.** (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 459–465.
- Tsuda, K. and Somssich, I.E.** (2015) Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytol.*, **206**, 932–947.
- Tsukaya, H., Tsuge, T. and Uchimiya, H.** (1994) The cotyledon: A superior system for studies of leaf development. *Planta*, **195**, 309–312.
- Tsuwamoto, R., Fukuoka, H. and Takahata, Y.** (2008) GASSHO1 and GASSHO2 encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in Arabidopsis embryos. *Plant J.*, **54**, 30–42.
- Vailleau, F., Daniel, X., Tronchet, M., Montillet, J.-L., Triantaphylidès, C. and Roby, D.**

- (2002) A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 10179–10184.
- Van der Ent, S., Verhagen, B.W.M., Van Doorn, R., et al.** (2008) MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **146**, 1293–1304.
- Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.-S., Loon, L.C. van and Pieterse, C.M.J.** (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, **17**, 895–908.
- Wang, S. and Chen, J.-G.** (2014) Regulation of cell fate determination by single-repeat R3 MYB transcription factors in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.*, **5**, 133.
- Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H. and Yephremov, A.** (2001) Functional analysis of the LAC-ERATA gene of Arabidopsis provides evidence for different roles of fatty acid omega -hydroxylation in development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 9694–9699.
- Weng, H., Molina, I., Shockey, J. and Browse, J.** (2010) Organ fusion and defective cuticle function in a lacs1 lacs2 double mutant of Arabidopsis. *Planta*, **231**, 1089–1100.
- West, M. and Harada, J.J.** (1993) Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *Plant Cell Online*, **5**, 1361–1369.
- Wettstein-Knowles, P.M. von** (1982) Elongase and epicuticular wax biosynthesis. *Physiol Veg*, **20**, 797–809.
- Wilson, Z.A., Song, J., Taylor, B. and Yang, C.** (2011) The final split: the regulation of anther dehiscence. *J. Exp. Bot.*, **62**, 1633–1649.
- Wilson, Z.A. and Zhang, D.-B.** (2009) From Arabidopsis to rice: pathways in pollen development. *J. Exp. Bot.*, **60**, 1479–1492.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. and Provart, N.J.** (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*, **2**, e718.
- Wolf, S., Hématy, K. and Höfte, H.** (2012) Growth control and cell wall signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **63**, 381–407.
- Woloshuk, C.P. and Kolattukudy, P.E.** (1986) Mechanism by which contact with plant cuticle triggers cutinase gene expression in the spores of *Fusarium solani* f. sp. pisi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 1704–1708.
- Xiao, F., Goodwin, S.M., Xiao, Y., Sun, Z., Baker, D., Tang, X., Jenks, M.A. and Zhou, J.-M.** (2004) Arabidopsis CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO J.*, **23**, 2903–2913.
- Xie, L.-J., Yu, L.-J., Chen, Q.-F., et al.** (2015) Arabidopsis acyl-CoA-binding protein ACBP3 participates in plant response to hypoxia by modulating very-long-chain fatty acid metabolism. *Plant J.*, **81**, 53–67.
- Xing, Q., Creff, A., Waters, A., Tanaka, H., Goodrich, J. and Ingram, G.C.** (2013) ZHOUP

- controls embryonic cuticle formation via a signalling pathway involving the subtilisin protease ABNORMAL LEAF-SHAPE1 and the receptor kinases GASSHO1 and GASSHO2. *Development*, **140**, 770–779.
- Yadav, V., Molina, I., Ranathunge, K., Castillo, I.Q., Rothstein, S.J. and Reed, J.W.** (2014) ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in Arabidopsis. *Plant Cell*, **26**, 3569–3588.
- Yang, S., Johnston, N., Talideh, E., Mitchell, S., Jeffree, C., Goodrich, J. and Ingram, G.** (2008) The endosperm-specific ZHOUP1 gene of Arabidopsis thaliana regulates endosperm breakdown and embryonic epidermal. *Development*, **135**, 3501–3509.
- Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., et al.** (2006) The MYB Transcription Factor Superfamily of Arabidopsis: Expression Analysis and Phylogenetic Comparison with the Rice MYB Family. *Plant Mol. Biol.*, **60**, 107–124.
- Yeats, T.H., Huang, W., Chatterjee, S., Viart, H.M.-F., Clausen, M.H., Stark, R.E. and Rose, J.K.C.** (2014) Tomato Cutin Deficient 1 (CD1) and putative orthologs comprise an ancient family of cutin synthase-like (CUS) proteins that are conserved among land plants. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **77**, 667–675.
- Yeats, T.H., Martin, L.B.B., Viart, H.M.-F., et al.** (2012) The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 609–611.
- Yeats, T.H. and Rose, J.K.C.** (2013) The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiol.*, **163**, 5–20.
- Yephremov, A., Wisman, E., Huijser, P., Huijser, C., Wellesen, K. and Saedler, H.** (1999) Characterization of the FIDDLEHEAD gene of Arabidopsis reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *Plant Cell*, **11**, 2187–2201.
- Zeiger, E.** (1972) Direct measurement of stomatal cell production in barley. *Planta*, **108**, 359–362.
- Zhang, J.-Y., Broeckling, C.D., Blancaflor, E.B., Sledge, M.K., Sumner, L.W. and Wang, Z.-Y.** (2005) Overexpression of WXP1, a putative Medicago truncatula AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (Medicago sativa). *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **42**, 689–707.
- Zhang, J.-Y., Broeckling, C.D., Sumner, L.W. and Wang, Z.-Y.** (2007) Heterologous expression of two Medicago truncatula putative ERF transcription factor genes, WXP1 and WXP2, in Arabidopsis led to increased leaf wax accumulation and improved drought tolerance, but differential response in freezing tolerance. *Plant Mol. Biol.*, **64**, 265–278.
- Zhang, Z. and Laux, T.** (2011) The asymmetric division of the Arabidopsis zygote: from cell polarity to an embryo axis. *Sex. Plant Reprod.*, **24**, 161–169.
- Zheng, H., Rowland, O. and Kunst, L.** (2005) Disruptions of the Arabidopsis Enoyl-CoA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *Plant Cell*, **17**, 1467–1481.

- Zheng, Y., Schumaker, K.S. and Guo, Y.** (2012) Sumoylation of transcription factor MYB30 by the small ubiquitin-like modifier E3 ligase SIZ1 mediates abscisic acid response in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, 12822–12827.
- Zhou, X., Hua, D., Chen, Z., Zhou, Z. and Gong, Z.** (2009) Elongator mediates ABA responses, oxidative stress resistance and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **60**, 79–90.
- Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I., Grier, D.G. and Preuss, D.** (1999) Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Dev. Camb. Engl.*, **126**, 5431–5440.
- Zipfel, C.** (2014) Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.*, **35**, 345–351.

Author: Vincent Duplan

Title: New developmental roles of the *Arabidopsis thaliana* immune regulator MYB30

PhD supervisor: Dr Susana Rivas

Abstract

MYB30 is an *Arabidopsis thaliana* transcription factor known for its role of positive regulator of defense responses through the production of very long chain fatty acids (VLCFAs). The cuticle, a hydrophobic and protective layer that covers the aerial parts of the plant, is mainly composed of VLCFA-derived lipid molecules. In this thesis, we have shown that the *MYB30* gene is expressed in the epidermal cells of the embryo, at a developmental stage that corresponds to the establishment of the embryonic cuticle. Our work reveals that during embryogenesis, MYB30 controls the expression of cuticle biosynthetic genes and the production of cuticular compounds. In agreement, we have shown that MYB30 is required for the formation of a functional embryonic cuticle. In addition, *MYB30* expression is dependent on GASSHO1 and GASSHO2 (*GSO1/2*), two Receptor Like Kinases (RLKs) involved a seed-specific signaling pathway, necessary for the cuticle formation in the embryo. Our data also indicates that MYB30 negatively regulates *GSO2* expression and that MYB30 may act downstream of the two RLKs in embryonic cuticle formation. Moreover, we have shown that these two RLKs also play a positive role in the activation of immune responses in adult plants. Finally, our study indicates that MYB30 is additionally involved in cell elongation in etiolated seedlings, likely by regulating the production of cell wall components. In conclusion, this work identifies new roles of MYB30, placing it at a crossroads between defense responses and plant development.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, MYB30, cuticle, embryogenesis, development, immunity

Discipline: Interactions plantes-microorganismes

Institute: Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM)
UMR CNRS/INRA 2594/441, 24 Chemin de Borde Rouge – Auzeville, CS 52627, 31326
Castanet-Tolosan cedex, France.

Auteur: Vincent Duplan

Titre : Nouveaux rôles du régulateur de l'immunité MYB30 dans le développement d'*Arabidopsis thaliana*

Directrice de thèse : Dr Susana Rivas

Résumé

MYB30 est un facteur de transcription d'*Arabidopsis thaliana* connu pour son rôle de régulateur positif des défenses *via* la production d'acides gras à très longue chaîne (VLCFA). La cuticule, une couche hydrophobe protectrice qui recouvre les parties aériennes de la plante, est composée majoritairement de molécules lipidiques dérivées des VLCFA. Dans cette thèse, nous avons montré que le gène *MYB30* est exprimé dans les cellules épidermiques de l'embryon, à une étape du développement qui coïncide avec la mise en place de la cuticule embryonnaire. Nos travaux révèlent que lors de l'embryogenèse, MYB30 contrôle l'expression de gènes de biosynthèse de la cuticule et la production de composés cuticulaires. En accord avec cela, nous avons montré que MYB30 est requis pour la formation d'une cuticule embryonnaire fonctionnelle. De plus, l'expression de *MYB30* est dépendante de GASSHO1 et GASSHO2 (*GSO1/2*), deux récepteurs de type *Receptor Like Kinase* (RLK) impliqués dans une voie de signalisation spécifique à la graine, nécessaire pour la formation de la cuticule chez l'embryon. Nos données indiquent également que MYB30 régule négativement l'expression de *GSO2*, et que MYB30 pourrait agir en aval des deux RLK pour la formation de la cuticule embryonnaire. D'autre part, nous avons montré que ces deux RLK jouent également un rôle positif dans l'activation des réponses immunitaires de la plante adulte. Enfin, notre étude indique que MYB30 est aussi impliqué dans l'élongation cellulaire chez les plantules étiolées probablement *via* la régulation de la production de composés pariétaux.

En conclusion, ces travaux identifient de nouveaux rôles pour MYB30, et le placent à l'interface entre les réponses de défense et le développement de la plante.

Mots clés : *Arabidopsis thaliana*, MYB30, cuticule, embryogenèse, développement, immunité

Discipline : Interactions plantes-microorganismes

Unité de recherche : Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM)
UMR CNRS/INRA 2594/441, 24 Chemin de Borde Rouge – Auzeville, CS 52627, 31326
Castanet-Tolosan cedex, France.