



HAL
open science

Rôle de la protéine de la signalisation du calcium CML8 dans la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à de multiples stress : implication dans l'immunité contre plusieurs pathogènes et importance de l'auxine

Julie Mazard

► To cite this version:

Julie Mazard. Rôle de la protéine de la signalisation du calcium CML8 dans la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à de multiples stress : implication dans l'immunité contre plusieurs pathogènes et importance de l'auxine. Biologie végétale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30199 . tel-03663092

HAL Id: tel-03663092

<https://theses.hal.science/tel-03663092v1>

Submitted on 9 May 2022

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 l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Julie MAZARD

Le 16 décembre 2021

Rôle de la protéine de la signalisation du calcium CML8 dans la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à de multiples stress : implication dans l'immunité contre plusieurs pathogènes et importance de l'auxine

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries**

Spécialité : **Développement des plantes**

Unité de recherche :

LRSV - Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales

Thèse dirigée par

Jean-philippe GALAUD et Richard BERTHOME

Jury

Mme Valérie LEGUÉ, Rapporteur

M. David WENDEHENNE, Rapporteur

Mme Céline LAVIRE, Examinatrice

M. Jean-Philippe GALAUD, Directeur de thèse

M. Richard BERTHOMÉ, Co-directeur de thèse

M. Bernard DUMAS, Président



THÈSE

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

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Julie MAZARD

Le 16 décembre 2021

Rôle de la protéine de la signalisation du calcium CML8 dans la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à de multiples stress : implication dans l'immunité contre plusieurs pathogènes et importance de l'auxine

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries**

Spécialité : **Développement des plantes**

Unité de recherche :

LRSV - Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales

Thèse dirigée par

Jean-philippe GALAUD et Richard BERTHOME

Jury

Mme Valérie LEGUÉ, Rapporteur

M. David WENDEHENNE, Rapporteur

Mme Céline LAVIRE, Examinatrice

M. Jean-Philippe GALAUD, Directeur de thèse

M. Richard BERTHOMÉ, Co-directeur de thèse

M. Bernard DUMAS, Président

**Rôle de la protéine de la signalisation du calcium
CML8 dans la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à de
multiples stress : implication dans l'immunité
contre plusieurs pathogènes et importance de
l'auxine**

Sommaire

| | |
|--|-------|
| Résumé | p. 7 |
| Abstract | p. 9 |
| Remerciements | p. 11 |
| Liste des abréviations | p. 15 |
| Liste des figures et tables | p. 23 |
| CHAPITRE 1 - INTRODUCTION | p. 29 |
| Partie I : L'immunité végétale | p. 31 |
| 1) Les défenses préformées | p. 31 |
| 2) Les défenses induites | p. 35 |
| (a) Le renforcement de la paroi végétale | p. 35 |
| (b) Les phytoalexines | p. 35 |
| (c) Les PR protéines | p. 37 |
| (d) La réponse hypersensible | p. 39 |
| 3) Les mécanismes de perception des plantes face aux pathogènes | p. 39 |
| (a) La PTI (« PAMP-Triggered Immunity ») | p. 39 |
| (b) L'ETI (« Effector-Triggered Immunity ») | p. 43 |
| (c) La QDR (« Quantitative Disease Resistance ») | p. 45 |
| 4) Les voies de signalisation activées par la perception des pathogènes | p. 47 |
| (a) Les flux d'ions | p. 47 |
| (b) Les ROS | p. 49 |
| (c) Les cascades de signalisation des MAPKs | p. 51 |
| (d) Les hormones végétales | p. 53 |
| 5) Le pathosystème <i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Ralstonia solanacearum</i> | p. 69 |
| (a) La plante <i>Arabidopsis thaliana</i> | p. 69 |

| | |
|---|--------|
| (b) La bactérie <i>Ralstonia solanacearum</i> | p. 71 |
| 6) Les mécanismes de résistance de la plante à <i>Rs</i> | p. 75 |
| 7) Influence de la température sur l'issue de l'interaction entre <i>A. thaliana</i> et <i>Rs</i> | p. 77 |
| Partie II : La signalisation calcique chez les plantes au cours des interactions plantes-microorganismes | p. 79 |
| 1) La diversité des messages calciques | p. 79 |
| 2) Le décodage des messages calciques par les protéines senseurs de Ca^{2+} | p. 83 |
| (a) La Calmoduline | p. 83 |
| (b) Les protéines « Calcineurine B-Like » | p. 87 |
| (c) Les protéines kinases dépendantes du Ca^{2+} | p. 87 |
| (d) Les protéines kinases dépendantes du Ca^{2+} et de la Calmoduline | p. 89 |
| 3) La diversité des CaMs et des protéines « Calmoduline-Like » chez les plantes | p. 91 |
| 4) Les rôles physiologiques des CMLs chez les plantes | p. 95 |
| (a) Les CMLs au cours du développement | p. 95 |
| (b) Les CMLs au cours des stress abiotiques | p. 97 |
| (c) Les CMLs au cours des stress biotiques | p. 99 |
| (d) Les CMLs au cours des stress combinés | p. 103 |
| Partie III : Travaux antérieurs sur CML8 et objectifs de thèse | p. 107 |
| CHAPITRE 2 - RÉSULTATS | p. 115 |
| Partie I : Article Zhu, Mazard <i>et al.</i> (2021) « The same against many: AtCML8, a Ca^{2+} sensor acting as a positive regulator of defense responses against several plant pathogens » | p. 117 |
| 1) Avant-propos | p. 117 |
| 2) Article Zhu, Mazard <i>et al.</i> , 2021 | p. 117 |
| Partie II : Résultats complémentaires non intégrés dans l'article Zhu, Mazard <i>et al.</i> (2021) | p. 143 |

| | |
|--|--------|
| 1) Avant-propos | p. 143 |
| 2) Analyse des lignées transgéniques <i>CML8</i> infectées avec deux champignons nécrotrophes <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | p. 143 |
| 3) Analyse des lignées mutantes correspondant aux gènes candidats sélectionnés par RNA-sequencing en réponse à l'infection par <i>Rs</i> | p. 149 |
| 4) Analyse des lignées transgéniques <i>CML8</i> lors d'un stress combiné | p. 155 |
| 5) Etude de l'interaction entre <i>CML8</i> et deux « strictosidine synthase-like » (SSL) | p. 157 |
| Partie III : Discussion | p. 161 |
| 1) Est-ce que <i>CML8</i> pourrait être une protéine multifonctionnelle face à des pathogènes de différents types trophiques ? | p. 161 |
| 2) Est-ce que <i>CML8</i> pourrait être une protéine multifonctionnelle lors de stress combinés ? | p. 163 |
| 3) Est-ce que les gènes dont l'expression semble dépendre de <i>CML8</i> lors d'une infection sont impliqués dans la réponse de la plante à <i>Rs</i> ? | p. 165 |
| 4) Quelles sont les protéines interagissant avec <i>CML8</i> ? | p. 167 |
| CHAPITRE 3 - RÉSULTATS | p. 171 |
| Partie I : Rôle de l'auxine dans l'interaction entre la bactérie <i>Rs</i> avec la plante <i>A. thaliana</i> | p. 173 |
| 1) Avant-propos | p. 173 |
| 2) Détection de la production d'IAA par <i>Rs</i> | p. 175 |
| 3) Effet de l'auxine de <i>Rs</i> sur l'architecture racinaire d' <i>A. thaliana</i> | p. 179 |
| 4) Analyse de l'induction de gènes de virulence bactériens par l'auxine | p. 179 |
| 5) Analyse de la croissance bactérienne après un traitement exogène d'auxine | p. 181 |
| 6) Analyse de la sensibilité des plantes transgéniques <i>CML8</i> à <i>Rs</i> après un traitement auxinique | p. 185 |
| Partie II : Vers l'identification des voies de biosynthèse de l'auxine chez <i>Rs</i> | p. 189 |

| | |
|---|--------|
| 1) Analyse de la production d'IAA chez des souches mutantes de <i>Rs</i> disponibles | p. 189 |
| 2) Reconstruction des voies de biosynthèse de l'auxine chez <i>Rs</i> | p. 193 |
| (a) Analyse de la littérature et des bases de données métaboliques | p. 193 |
| (b) Prédiction des voies de biosynthèse de l'IAA présentes chez <i>Rs</i> | p. 197 |
| (c) Recherche des gènes candidats | p. 197 |
| (d) Reconstruction et intégration des voies dans le réseau métabolique de <i>Rs</i> | p. 201 |
| (e) Analyse de la robustesse de la biosynthèse de l'IAA chez <i>Rs</i> | p. 201 |
| 3) Génération des souches mutantes de <i>Rs</i> | p. 203 |
| Partie III : Discussion | p. 207 |
| 1) Est-ce que la souche GMI1000 de <i>Rs</i> produit de l'IAA ? | p. 207 |
| 2) Comment la souche GMI1000 de <i>Rs</i> produit-elle de l'IAA ? | p. 209 |
| 3) Pourquoi la souche GMI1000 de <i>Rs</i> produit-elle de l'IAA ? | p. 215 |
| CHAPITRE 4 - DISCUSSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES | p. 221 |
| 1) CML8 : un régulateur positif des défenses face à de multiples pathogènes ? | p. 223 |
| 2) CML8 : un régulateur majeur chez les plantes ? | p. 227 |
| 3) CML8 : une CML au carrefour entre l'immunité et le développement ? | p. 235 |
| 4) CML8 : cible de manipulation pour l'auxine de <i>Rs</i> ? | p. 239 |
| CHAPITRE 5 - MATÉRIELS & MÉTHODES | p. 251 |
| 1) Avant-propos | p. 253 |
| 2) Phénotypage des lignées transgéniques <i>CML8</i> lors d'inoculations avec <i>S. sclerotiorum</i> et <i>B. cinerea</i> | p. 253 |
| 3) Sélection, génotypage et phénotypage avec <i>Rs</i> des lignées mutantes pour les sept gènes candidats | p. 255 |
| 4) Phénotypage des lignées transgéniques <i>CML8</i> lors d'un stress combiné et simultané (inoculation avec <i>Rs</i> x élévation de la température) | p. 255 |

| | |
|---|--------|
| 5) Test d'interaction par levure double-hybride | p. 257 |
| 6) Matériels bactériens et conditions de culture | p. 257 |
| 7) Détection d'IAA à partir de milieux de culture bactériens par analyse LC-MS/MS | p. 259 |
| 8) Test d'activité de l'IAA bactérienne sur des plantules d' <i>A. thaliana</i> | p. 261 |
| 9) Analyse de l'induction de gènes de virulence bactériens par dosage enzymatique de la β -galactosidase | p. 261 |
| 10) Analyse de la croissance bactérienne sur plaque après un traitement auxinique | p. 263 |
| 11) Phénotypage des lignées transgéniques <i>CML8</i> lors d'une inoculation avec <i>Rs</i> après un traitement auxinique | p. 263 |
| Références | p. 265 |

Résumé

Le calcium est un second messager universel impliqué dans l'adaptation des plantes aux changements de l'environnement. Les variations de concentration de calcium dans la cellule végétale sont décodées et relayées par des protéines senseurs de calcium. Parmi ces protéines, on retrouve les CMLs ou protéines « Calmoduline-Like ». Au cours de ma thèse, nous avons identifié que CML8 participe aux réponses immunitaires de la plante face à de multiples microorganismes pathogènes dont la bactérie du sol *Ralstonia solanacearum* capable d'infecter plus de 200 espèces de plantes (*Arabidopsis thaliana*, tomate, banane), la bactérie foliaire *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et l'oomycète racinaire *Phytophthora capsici*. Mon projet de thèse a eu pour objectif de préciser la fonction de CML8 pour comprendre son rôle dans l'immunité végétale, et plus précisément dans la réponse de défense de la plante *Arabidopsis thaliana* à *Ralstonia solanacearum*. Pour cela, une approche de transcriptomique par RNA-sequencing a permis d'identifier les mécanismes moléculaires dépendants de CML8 en réponse à une infection par *Ralstonia solanacearum*. Egalement, CML8 est exprimé préférentiellement au niveau de l'émergence des racines latérales et contrôle l'architecture racinaire de manière auxine-dépendante. Ces émergences sont le lieu d'accumulation de l'auxine endogène de la plante mais également le point d'entrée de *Ralstonia solanacearum* dans la plante. Sachant cela et sachant aussi que le séquençage du génome de *Ralstonia solanacearum* a montré qu'il était possible que cette bactérie puisse synthétiser de l'auxine, nous avons choisi d'étudier les processus d'infection de *Ralstonia solanacearum* en cherchant à identifier la ou les voies de biosynthèse putatives de l'auxine chez *Ralstonia solanacearum* pour déterminer le rôle de l'auxine produite par la bactérie au cours de l'interaction avec la plante.

Abstract

Calcium is a universal second messenger involved in the adaptation of plants to environmental changes. Variations in calcium concentration in the plant cell are decoded and relayed by calcium sensor proteins. Among these proteins, we find the CMLs or "Calmodulin-Like" proteins. During my thesis, we identified that CML8 participates in the immune responses of the plant to multiple pathogenic microorganisms including the soil bacterium *Ralstonia solanacearum* capable of infecting more than 200 species of plants (*Arabidopsis thaliana*, tomato, banana), the leaf bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and the root oomycete *Phytophthora capsici*. The objective of my thesis project was to clarify the function of CML8 in order to understand its role in plant immunity, and more precisely in the defense response of the plant *Arabidopsis thaliana* to *Ralstonia solanacearum*. To achieve this purpose, a transcriptomic approach by RNA-sequencing allowed to identify the molecular mechanisms dependent on CML8 in response to an infection by *Ralstonia solanacearum*. Also, CML8 is preferentially expressed at the level of lateral root emergences and controls the root architecture in an auxin-dependent manner. These emergences are the site of accumulation of endogenous auxin in the plant but also the point of entries of *Ralstonia solanacearum* into the plant. Knowing this and also knowing that the sequencing of *Ralstonia solanacearum*'s genome has shown that it was possible that this bacterium could synthesize auxin, we chose to study the infection processes of *Ralstonia solanacearum* by seeking to identify the putative auxin biosynthetic pathway(s) in *Ralstonia solanacearum* in order to determine the role of auxin produced by the bacterium during the interaction with the plant.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier chaleureusement les membres du jury, Valérie Legué, David Wendehenne, Céline Lavire et Bernard Dumas, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Un grand merci à Jean-Philippe Galaud et Richard Berthomé pour leur aide, leurs conseils et leur supervision tout au long de ce travail de thèse. Je les remercie d'avoir accompagné mes expériences, mon travail de réflexion et de rédaction tout au long de ces trois ans. Merci à Richard pour son appui à l'occasion de mes expériences et merci à Jean Philippe pour sa vigilance dans la tenue des étapes et deadlines de la thèse, tous deux ont été très soutenant pour moi. Je tiens également à les remercier particulièrement pour leur soutien et leur patience avec mon projet singulier de césure au milieu de la thèse même s'il n'a pas pu aboutir.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Fabien Mounet et Mathilde Fagard, pour leurs critiques toujours constructives sur mon travail ainsi que la bienveillance de leurs retours

Un grand merci à toute l'équipe calcium de m'avoir accueilli pendant ses trois ans. Merci à Didier pour m'avoir envoyé depuis mon stage de Master 2 et sans se lasser un grand nombre de publications en rapport avec mon sujet de thèse qui ont enrichi ma réflexion et mes écrits. Un grand merci à Christian, chef de notre équipe tout au long de ma thèse pour sa gentillesse, sa bonne humeur, et son écoute envers les doctorants dont je faisais partie. Merci à Amandine, avec qui j'ai partagé paillasse de laboratoire, joies et déboires de jeunes chercheuses, toujours avec le sourire ! Je remercie Eugénie qui m'a assisté avec patience et persévérance dans les nombreuses manipulations que nous avons effectuées ensemble, et sans qui ce travail de thèse n'aurait pas pu aller à son terme. Merci à Sabine, avec qui j'ai partagé pendant 3 ans un bureau petit, mais super organisé, trop chaud ou trop froid selon les saisons, mais toujours accueillant grâce à elle. Je remercie Malick pour son accompagnement pédagogique lors de mes premiers pas d'enseignante en TP L2. Merci à Benoit, le sage au fond du couloir, pour nos échanges sur l'école doctorale SEVAB qui ont nourri mon travail de représentante des doctorants.

Je tiens à remercier également toute l'équipe REACH, toujours disponible pour répondre à mes questions et pour tous les bons moments partagés autour des barbecues et pendant les repas d'équipe.

Un grand merci à tous les services communs du LRSV : l'administration (David, Catherine et Odile), le service laverie (Jean-Louis et Olivier), le service culture (Rémi et Wandrille), la plateforme de microscopie (Cécile, Aurélie et Yves), la plateforme Métatoul (Sylvie) et le service informatique (Hervé) pour leur disponibilité et leur aide tout au long de ma thèse.

Des remerciements particuliers à Marielle et Hélène pour leur aide précieuse dans l'analyse des données de transcriptomique et qui avec beaucoup de patience m'ont guidé dans les méandres de la bioinformatique et des statistiques. Merci encore pour tous ces bons moments de discussion, de rires et de petites choses du quotidien partagés dans votre bureau.

Je renouvelle mes remerciements à Stéphane Genin et Patrick Barberis pour leurs connaissances et leurs expertises sur *Ralstonia* qu'ils ont bien voulu partager et pour leur relecture attentive de ce manuscrit.

Merci à Manue Lauber, Elodie Belmas, Rémi Pendaries et Marie Didelon qui m'ont fait découvrir chacun leur pathogène préféré, m'ont donné accès à leurs matériels, chambres de culture et protocoles sans lesquels cette thèse n'aurait pas été la même.

Merci à l'AJS pour tous les événements organisés, les nombreux verres bus ensemble après le travail, et l'ambiance chaleureuse des fins de semaine.

Je veux aussi remercier les non-permanents du LRSV : Camille, Ayla, Nico, Charlène, Quentin, Tatiana, Mélanie R, Duchesse, Nathanaël, Jean, Simon, Nina, Bastien, Mélanie O, et tous les autres... Merci à vous tous pour tous les bons moments partagés, le tarot de midi en particulier ! Avec une dédicace spéciale pour Sébastien et Maxime pour nos nombreux repas sushis !

Sans oublier les non-permanents du LIPM : Nargess, Chogagh, Tessa, Bram, Matilda, David, Bryan, Noé, Daniela, Thibault, Jean, et particulièrement Virginie

pour nos soirées de jeux de société depuis le M2 et nos savoureuses pauses goûters !

Aux Représentants SEVAB, Alex Grenouille, Benoit, Manon, Marie-Aurore, Anna, Charlotte, Younes, Ahmed, Alexandre, Paul, Julie, Léo, Margot, E-Ping, un grand merci pour les projets et combats que nous avons menés ensemble et le défoulement salubre de nos réunions au Dubliner.

A Sophie Bel-Vialar, ma mentore, toute ma gratitude pour m'avoir soutenue et rassurée dans les moments compliqués et avoir toujours gardé le contact avec moi.

Un grand merci à mes amis, Yaëlle, Florine, Marine, Marie, Léa Mi, Valentine, Antoine, Mallory, Léa B, Caitlin et Sarah qui sont toujours là pour moi, qui m'ont écouté râler quand tout allait de travers et m'ont apporté la bouffée d'oxygène nécessaire aux bons moments.

J'aimerais également et surtout remercier Julien d'avoir été à mes côtés, pour m'avoir épaulée et supportée pendant ma thèse.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, qui va apprécier d'avoir un autre sujet de conversation à Noël que la biologie végétale, et mes parents qui m'ont toujours encouragé et soutenu pour entreprendre mes projets même quand je ne m'en pensais pas capable. Merci pour tout !

Liste des abréviations

1-aminocyclopropane-1-carboxylate :
ACC

3-Amino-1,2,4-Triazol : 3-AT

ACC Oxydase : ACO

ACC Synthase : ACS

Acide Abscissique : ABA

Acide Gibbérellique : GA

Acide Indole-3-acétique : IAA

Acide Jasmonique : JA

Acide Salicylique : SA

Acide-1-Naphtalacétique : NAA

Acide-2,4-Dichlorophénoxyacétique :
2,4-D

Activation Domain : AD

Adénosine Triphosphate : ATP

ADN de Transfert : ADN-T

Arabidopsis Autoinhibited Calcium-
ATPase : ACA

Arabidopsis Biological Resource
Centre : ABRC

Arabidopsis thaliana : *A. thaliana*

Auxin Response Factor : ARF

Bacto-Agar Glucose

Triphenyltetrazolium Chloride : BGT

Basic Local Search Tool : BLAST

Binding Domain : BD

Botrytis cinerea : *B. cinerea*

Brassinostéroïde : BR

Calcineurin-B Like : CBL

Calcium : Ca²⁺

Calcium Dependent Protein Kinase :
CDPK

Calcium-Calmodulin Dependent
Protein Kinase : CCaMK

Calmoduline : CaM

Calmodulin-Like : CML

CBL-Interacting Protein Kinase : CIPK

CDPK-Related Kinase : CRK

Chlore : Cl⁻

Chromatographie en Phase Liquide
Haute Performance : HPLC

Chromatographie Liquide -
Spectrométrie de Masse : LC-MS

Coiled Coil : CC

Colony Forming Unit : CFU

Columbia 8 : Col-8

Cyclic Nucleotide-Gated Channel :
CNGC

Cytokinines : CK

Densité Optique : OD

Differentially Expressed Genes : DEGs

Effector Triggered Immunity : ETI

Effector Triggered Susceptibility : ETS

EIN3-Like : EIL

Enzyme Commission : EC

Ethylène : ET

Exopolysaccharides : EPS

Facteur d'avirulence : Avr

Factor d'Elongation Tu : EF-Tu

False Discovery Rate: FDR

Flagellin 22 : flg22

Flagellin-Sensing 2 : FLS2

Genome-Wide Association Study :
GWAS

Germination Stimulant 24 : GR24

Glutamate Receptor Channel : GLR

Glycoprotéine Riche en
Hydroxyproline : HRP

Histone DeAcetylase : HDAC

HrpB-Dependent Factor : HDF

Indole-3-Acetaldehyde : IAAld

Indole-3-Acetaldoxime : IAOx

Indole-3-Acetamide : IAM

Indole-3-acetonitrile : IAN

Indole-3-Glycerol Phosphate : IGP

Indole-3-Pyruvique : IPA

Indolepyruvate décarboxylase : ipdC

Inoculum Growth Content : IGC

Internally Transcribed Spacer : ITS

International Journal of Molecular
Sciences : IJMS

Invasion Pattern : IP

Invasion Pattern Receptor : IPR

JA-isoleucine : JA-Ile

Knock-Down : KD

Leucine Rich Repeats : LRR

Levure double-hybride : Y2H

Lysine Motif : LysM

MAPK kinase kinase : MEK

MAPK kinase : MPKK

MAPK phosphatase : MKP

Méthyljasmonate : MeJA

microARN artificiel : amiRNA

Microbial-Associated Molecular
Patterns : MAMPs

Mitogen-Activated Protein Kinases :
MAPKs

Murashige et Skoog : MS

Nitrate : NO_3^-

Nottingham Arabidopsis Stock Centre
: NASC

Nucléotide Binding Site : NBS

Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich
Repeats : NLR

Oxyde nitrique : NO

PAMP Triggered Immunity : PTI

Pathogen-Associated Molecular
Patterns : PAMPs

Pathogenesis-Related : PR

Peroxyde d'hydrogène : H_2O_2

Phenylalanine Ammonia Lyase : PAL

Phytophthora capsici : Pc

Phytosulfokine : PSK

Plant-Growth Promoting

Rhizobacteria : PGPRs

Plasma Membrane Depolarization-
Activated Calcium Channel : DACC

Plasma Membrane Hyperpolarization-
Activated Calcium Channel : HACC

PolyGalacturonase-Inhibiting Protein :
PGIP

Potassium : K^+

Potato Dextrose Agar : PDA

Programmed Cell Death : PCD

Protein Data Bank : PDB

Protéine Arabinogalactane : AGP

Proton : H^+

Pseudomonas syringae pv. *tomato* :
Pst

Quantitative Disease Resistance :
QDR

Quantitative Trait Loci : QTL

Racine Latérale : LR

Ralstonia solanacearum : Rs

Reactive Oxygen Species : ROS

Récepteur EF-Tu : EFR

Receptor-Like Kinase : RLK

Receptor-Like Protein : RLP

Réponse Hypersensible : HR

Résistance Systémique Acquisée : SA

Résistance : R

Reverse Transcription - Quantitative PCR : RT-qPCR

RNA-sequencing : RNA-seq

Rubelzhoë : Rub

Sclerotinia sclerotiorum : S.
sclerotiorum

Solanum lycopersicum : S.
lycopersicum

Strictosidine Synthase-Like : SSL

Sur-Expresseur : OE

Système de Sécrétion de Type II :
T2SS

Système de Sécrétion de Type III :
T3SS

Système de Sécrétion de Type VI :
T6SS

Tobacco Mosaic Virus : TMV

Toll Interleukine Receptor : TIR

Tryptamine : TPM

Tryptophan Side chain Oxidase : TSO

Tryptophane : Trp

Two-Pore Calcium Channel : TPC

Voie de biosynthèse de l'IAA I : PI

Voie de biosynthèse de l'IAA II : PII

Voie de biosynthèse de l'IAA III : PIII

Voie de biosynthèse de l'IAA IV : PIV

Voie de biosynthèse de l'IAA V : PV

Voie de biosynthèse de l'IAA VI : PVI

Wild Type : WT

Xanthomonas campestris pv.
campestris : Xcc

β -glucuronidase : GUS

Liste des figures et tables

Figure 1. Schéma du système immunitaire de la plante.

Figure 2. Composants des mécanismes de résistance impliqués dans la détection des agents pathogènes, transduction du signal et réponses de défense.

Figure 3. Schéma du réseau des voies de signalisation des phytohormones dans la réponse immunitaire des plantes.

Figure 4. Cycle de vie d'*Arabidopsis thaliana*.

Figure 5. Cycle infectieux de *Ralstonia solanacearum*.

Figure 6. Symptômes du flétrissement bactérien causés par *Rs*.

Figure 7. Mécanismes d'action et de reconnaissance de l'effecteur PopP2 de *Rs*.

Figure 8. Diversité génétique de la réponse des plantes à *Rs* GMI1000 dans la population locale TOU-A.

Figure 9. Signatures calciques induites par différents stimuli dans le cytosol et les organites des cellules de plantes.

Figure 10. Structure 3D du motif de liaison au Ca^{2+} (EF-Hand) et schémas de la structure des protéines participant à la signalisation calcique.

Figure 11. CaMs et CMLs chez *Arabidopsis*.

Figure 12. Composition des motifs EF-hand des protéines CaM et CML d'*Arabidopsis*.

Figure 13. Représentation schématique des fonctions des CMLs dans les cellules végétales.

Figure 14. Analyse comparative des réponses des lignées transgéniques *CML8* après inoculation avec *B. cinerea*.

Figure 15. Analyse comparative des réponses des lignées transgéniques *CML8* après inoculation avec *S. sclerotiorum*.

Figure 16. Analyse comparative des réponses des lignées mutantes pour les gènes candidats sélectionnés suite à l'analyse RNA-seq après inoculation avec *Rs*.

Figure 17. Analyse comparative de réponse des lignées transgéniques *CML8* après inoculation de *Rs* à 30°C.

Figure 18. Tests d'auto-activation de levure double-hybride (A) et tests d'interactions positives et négatives (B).

Figure 19. Tests d'interaction par levure double-hybride entre *SSL4* et *SSL5* avec *CaM3*, *CML9* et *CML8*.

Figure 20. Détection d'auxine (IAA) dans les milieux de culture de *Rs* analysés par LC-MS/MS.

Figure 21. Effet des extraits du milieu de culture bactérien contenant de l'auxine produite par *Rs*.

Figure 22. Effet d'un traitement auxinique sur l'expression des principaux régulateurs de virulence *HrpB* et *HrpG* de *Rs*.

Figure 23. Effet d'un traitement auxinique sur la croissance bactérienne de *Rs*.

Figure 24. Analyse comparative des réponses des lignées transgéniques *CML8* suite à l'inoculation de *Rs* avec ou sans traitement auxinique.

Figure 25. Représentation schématique des voies de biosynthèse de l'IAA hypothétiquement présentes chez *Rs*.

Figure 26. Détection des composés intermédiaires des voies de biosynthèse de l'IAA hypothétiquement présentes chez *Rs*.

Figure 27. Enchaînement des étapes des différentes analyses réalisées par iMEAN pour identifier les gènes et les voies métaboliques putatifs impliqués dans la biosynthèse de l'auxine chez *Rs*.

Figure 28. Principales voies dépendantes du Trp pour la synthèse d'IAA.

Figure 29. Caractéristiques des voies de biosynthèse de l'auxine reconstituées dans le modèle *in silico* iMEAN de *Rs* souche GMI1000.

Figure 30. Combinaisons des mutants KO à générer dans la souche GMI1000 de *Rs* pour abolir la capacité de production d'auxine.

Figure 31. Transformation de *Rs* par recombinaison homologue.

Figure 32. Modèle de fonctionnement des réponses immunitaires PTI et ETI des plantes en fonction de la température.

Figure 33. Le nœud EDS1-PAD4-ADR1 médie à la fois la PTI et l'ETI.

Figure 34. Modèle simplifié pour l'interaction des BRs avec les voies de l'immunité chez les plantes.

Figure 35. Classification par phylotype et diversité de spectre d'hôte des souches de *Rs*.

Figure 36. Présentation du système d'analyse Navautron pour les inoculations avec *S. sclerotiorum*.

Figure 37. Cartes des vecteurs pGAD-NX-C et pGBG-NSC utilisés pour les constructions des tests d'interaction par levure double-hybride.

Tableau 1. Détection par LC-MS/MS de la présence ou non d'IAA dans les milieux de culture des souches de *Rs* GMI1000, GMI1300, GMI1605, GRS407 et GRS471.

Tableau S1. Récapitulatif des lignées mutantes homozygotes pour les phénotypages avec *Rs*.

Tableau S2. Liste des amorces utilisées pour les PCR de génotypage des lignées mutantes.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Partie I : L'immunité végétale

Les plantes sont des organismes sessiles soumises aux changements de leur environnement. Ces variations des conditions environnementales peuvent être des sources de stress pour les plantes et donc entraîner des conséquences au niveau de leur développement et de leur survie. Ces stress peuvent être de deux natures : abiotique tel que des déséquilibres climatiques comme des épisodes de sécheresse ou de grand froid et biotique tel que des attaques par des herbivores, des insectes et des microorganismes pathogènes. Ces derniers sont responsables de nombreuses maladies présentant des symptômes variés comme le chancre causé par le champignon *Seiridium cardinale*, la pourriture causée par le champignon *Botrytis cinerea*, la gale causée par la bactérie *Streptomyces scabies* ou encore le flétrissement causé par la bactérie *Ralstonia solanacearum* (Rs). Néanmoins, si l'on considère le nombre considérable d'organismes qui interagissent avec les plantes dans leurs environnements naturels ou agronomiques, le développement d'une maladie reste un phénomène assez rare, notamment parce que les plantes possèdent de nombreux mécanismes de défense, parmi lesquels on distingue les défenses préformées et les défenses induites.

1) Les défenses préformées

La première ligne de défense correspond aux défenses préformées qui sont à la fois structurales et chimiques. Les défenses structurales se rapportent à des barrières physiques limitant l'entrée des pathogènes dans la plante telles que la cuticule et l'épiderme à la surface des feuilles. En effet, la cuticule est composée de cutines et de cires très hydrophobes qui permettent d'éviter la multiplication des pathogènes dans des gouttes d'eau. Au niveau des racines, le rhizoderme et la coiffe racinaire jouent également ce rôle (Reina-Pinto & Yephremov, 2009). La paroi des cellules végétales, composée de polysaccharides de lignine et de silice, constitue également une barrière physique efficace contre les microorganismes (Bacete *et al.*, 2018). Si les pathogènes réussissent à franchir cette barrière, notamment en utilisant des ouvertures naturelles telles que des blessures à la surface des tissus de la plante,

les stomates au niveau des feuilles ou les blessures au niveau de la pointe des racines ou de la zone d'émergence des racines latérales dans le sol (Malinovsky *et al.*, 2014), ils seront alors confrontés aux défenses préformées « biochimiques », présentes dans l'apoplasme et les cellules végétales.

Les défenses préformées « biochimiques » reposent sur des composés organiques produits par la plante ayant des propriétés antimicrobiennes appelés métabolites secondaires. Ces composés sont stockés parfois sous des formes inactives, généralement dans la vacuole, et sont relargués et/ou deviennent actifs lors de la dégradation de la cellule au cours de l'infection par le pathogène. Parmi eux, on trouve des composés phénoliques appelés phytoanticipines dont l'oxydation au contact de l'air participe aux défenses des plantes. Les alcaloïdes, comme la nicotine, sont efficaces contre les insectes et les herbivores (Piasecka *et al.*, 2015). Les glucosinolates sont des composés de glucose associés à un acide aminé, du soufre et de l'azote. Ils sont stockés dans des compartiments subcellulaires différents de l'enzyme myrosinase, qui est une β -glucosidase, dont l'activité augmente en réponse aux blessures. Lorsque l'intégrité cellulaire est altérée, les glucosinolates sont dégradés par la myrosinase en composés toxiques actifs contre une variété de pathogènes : le thiocyanate, l'isothiocyanate et le nitrile (Brown & Hampton, 2011). Enfin, les saponines, quant à elles, sont des composés antifongiques actifs sur les membranes riches en stérols des champignons (Piasecka *et al.*, 2015).

Ces composés sont produits en amont de toute attaque de pathogène au niveau des sites potentiels d'infection mais certains d'entre eux, comme les glucosinolates, sont induits au moment de l'infection après la reconnaissance du pathogène par la plante (Brown & Hampton, 2011). Ces mécanismes induits après la reconnaissance et la transmission du signal de danger par des cascades de signalisation permettent des réactions de défenses plus efficaces qui impliquent des processus complexes et variés.

2) Les défenses induites

(a) Le renforcement de la paroi végétale

A la suite du signal suivant la perception d'un microorganisme pathogène se déclenche l'activation des mécanismes de défenses induites. En premier lieu se produit un épaissement de la paroi végétale grâce à la production de callose, un polymère de β -1,3-glucanes, de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRPG) telles que les extensines, les protéines arabinogalactanes (AGP) et les lectines, et enfin de lignine et de subérine. Tout cela permet de consolider de manière physique la paroi des cellules végétales. Par exemple, les dépôts de callose au niveau des plasmodesmes permettent de limiter physiquement la propagation des virus de cellule en cellule. La production et l'accumulation d'HRPG qui créent des liaisons intra- et inter-moléculaires dans la paroi végétale participent à son renforcement (Deepak *et al.*, 2007). De son côté, la lignification imperméabilise et solidifie la cellule grâce à la formation d'un réseau complexe de monolignols avec la cellulose (Bacete *et al.*, 2018).

(b) Les phytoalexines

Au côté des phytoanticipines préformées, les plantes sont capables de synthétiser des molécules antibiotiques efficaces contre un large spectre de pathogènes appelées phytoalexines. Plus de 300 molécules d'origine biochimiques variées composent cette large famille (Agrios, 2005). Chez *Arabidopsis*, une des phytoalexines la mieux caractérisée est la camalexine dont la synthèse est induite par de nombreux pathogènes et qui agit probablement en déséquilibrant l'intégrité de leurs membranes plasmiques. Les gènes participant à sa biosynthèse sont fortement induits aux sites de contact entre la plante et les microorganismes. Certains champignons sont par contre capables de contrecarrer l'action de la camalexine en la modifiant chimiquement pour la rendre inactive ou en produisant des transporteurs de type ABC qui acheminent la camalexine hors de la cellule (Jeandet, 2015).

(c) Les PR protéines

Parmi les molécules produites lors de l'activation des défenses induites, on retrouve les PR (« Pathogenesis-Related ») protéines. Ces protéines sont induites par des éliciteurs, qui sont des molécules produites par les pathogènes qui déclenchent les réponses immunitaires des plantes. Les PR protéines s'accumulent dans la vacuole et l'apoplasme après l'attaque d'un pathogène et sont résistantes à leurs protéases. Elles ont des activités biologiques variées et présentent deux modes d'actions principaux : direct en ralentissant le développement des microorganismes et indirect en relarguant des molécules issues des parois fongiques qui activeront les défenses végétales. Certaines sont des hydrolases comme la chitinase qui digère les parois des champignons et les glucanases qui lysent les membranes des bactéries. D'autres sont des inhibiteurs des enzymes des pathogènes comme la « polygalacturonase-inhibiting protein » qui inhibe les pectinases fongiques. Enfin, certaines sont des protéines qui lient la chitine comme l'hévéine et les lectines qui inhibent la croissance des champignons et des insectes, des peptides antifongiques comme les défensines, ou encore des thionines comme l'hordothionine qui inhibe la croissance des champignons et des bactéries (Ali *et al.*, 2018).

La PR protéine PR1, dont la fonction est encore inconnue même si son activité biologique correspond à une activité antifongique, est très souvent accumulée avec la β -1,3-glucanase PR2 et la « thaumatin-like » PR5. Les gènes codants pour ces protéines sont des gènes marqueurs de la voie de signalisation de l'acide salicylique (SA) via le gène *NPR1*. La voie de signalisation du SA est activée par des pathogènes de types biotrophes (qui conservent les cellules végétales vivantes lors de l'infection) et hemibiotrophes (qui sont des pathogènes avec une première phase biotrophe au début de l'infection puis une seconde phase nécrotrophe) et elle est responsable de l'établissement de la Résistance Systémique Acquise (« Systemic Acquired Resistance » ou SAR). Les pathogènes de type nécrotrophe (qui tuent les cellules végétales avant de s'y multiplier) activent préférentiellement la voie de signalisation de l'acide jasmonique (JA) qui déclenche l'accumulation d'autres PR protéines : les chitinases PR3 et PR4 et la défensine PR12. Les défensines sont des petits peptides riches en cystéine dont l'activité est principalement antifongique.

Parmi les PR protéines efficaces dans la résistance aux champignons, on trouve des inhibiteurs d'enzymes fongiques comme les inhibiteurs de polygalacturonases (PGIP) (Ali *et al.*, 2018). Les PGIP sont des protéines à domaine LRR (« Leucine-Rich Repeats ») présentes dans la paroi des plantes qui empêchent la dégradation de la pectine et favorise la formation d'oligogalacturonides qui sont connus pour être des éliciteurs des défenses des plantes (Haeger *et al.*, 2020).

(d) La réponse hypersensible

Un des mécanismes de défenses les plus efficaces et les mieux conservés chez les plantes est la Réponse Hypersensible (HR). La HR se caractérise par le développement de lésions nécrotiques qui se produisent au site de l'infection et restreignent le développement du microorganisme pathogène. Quand elle se met en place, les cellules attaquées par les microorganismes relarguent des toxines, des ROS (« Reactive Oxygen Species ») et de l'oxyde nitrique (NO) contenues dans la vacuole pour créer un environnement ultra-oxydé qui peut endommager les structures cellulaires de la plante et celles des pathogènes. Ensuite, l'ADN et les membranes de la cellule végétale sont dégradés par des enzymes spécifiques et des signaux sont produits afin d'induire la SAR, qui va permettre à la plante entière de mieux se défendre de manière efficace et généralisée (Greenberg & Yao, 2004). L'activation des réponses de défense est un processus énergétiquement coûteux étroitement lié au développement et à la physiologie de la plante. La frontière nette de la HR, limitée au site d'infection, nécessite l'existence de mécanismes efficaces contrôlant à la fois la mort et la survie cellulaire (Balint-Kurti, 2019).

3) Les mécanismes de perception des plantes face aux pathogènes

(a) La PTI (« PAMP-Triggered Immunity »)

Face aux microorganismes, il est essentiel pour les plantes de pouvoir détecter très rapidement leur présence et de les reconnaître afin de mettre en place les réponses les plus adaptées. Les plantes sont capables de reconnaître les signaux

envoyés par les microorganismes dans un échange considéré comme un « dialogue moléculaire » (Jones & Dangl, 2006). Ces signaux capables d'activer les réponses immunitaires de la plante sont appelés des éliciteurs. Les éliciteurs sont de nature et d'origine diverses : des oligo- et polysaccharides comme l'oligochitine, des enzymes comme les pectinases, cellulases et xylanases et des stérols comme l'ergosterol des champignons, des lipides comme l'acide arachidonique des oomycètes, des protéines et des peptides comme la flagelline des bactéries. Les éliciteurs peuvent également être d'origine végétale, notamment les polysaccharides relargués lors de la digestion de la paroi végétale par les enzymes des pathogènes (Malik *et al.*, 2020).

La plante reconnaît un motif conservé à l'intérieur d'une molécule élicitrice que l'on appelle un PAMP (« Pathogen-Associated Molecular Pattern »). Les PAMPs sont issus d'une molécule importante dans la biologie du parasite donc nécessairement conservée dans leur évolution. Par exemple, le PAMP de la flagelline est un peptide synthétique de 22 acides aminés appelé flg22 suffisant pour déclencher les réponses immunitaires de la plante. La détection des PAMPs se fait par des récepteurs (« Pattern Recognition Receptors » ou PRR) localisés à la membrane plasmique des cellules végétales. Les PRR sont des protéines transmembranaires dont la partie extracellulaire est composée de domaines pouvant reconnaître les PAMPs et la partie intracellulaire est capable de transmettre le signal détecté, soit directement lorsqu'elles possèdent des domaines kinases (ces protéines sont alors appelées RLK pour « Receptor-Like Kinase »), soit indirectement si elles ne possèdent pas d'activité kinase (elles sont dans ce cas appelées RLP pour « Receptor-Like Protein »). Elles fonctionnent alors en interagissant avec des protéines qui possèdent une activité enzymatique et peuvent ainsi transmettre le signal. Par exemple, chez *Arabidopsis*, le PAMP flg22 est perçu par le PRR LRR-RLK FLS2 qui possède au niveau extracellulaire un domaine « Leucine-Rich Repeats » qui lie flg22 et au niveau intracellulaire un domaine RLK qui transmet le signal. FLS2 s'associe en complexe avec un autre LRR-RLK BAK1 et une serine/thréonine kinase cytoplasmique BIK1. La phosphorylation de tous ces domaines kinases déclenche les cascades de signalisation nécessaires à l'activation des réponses immunitaires

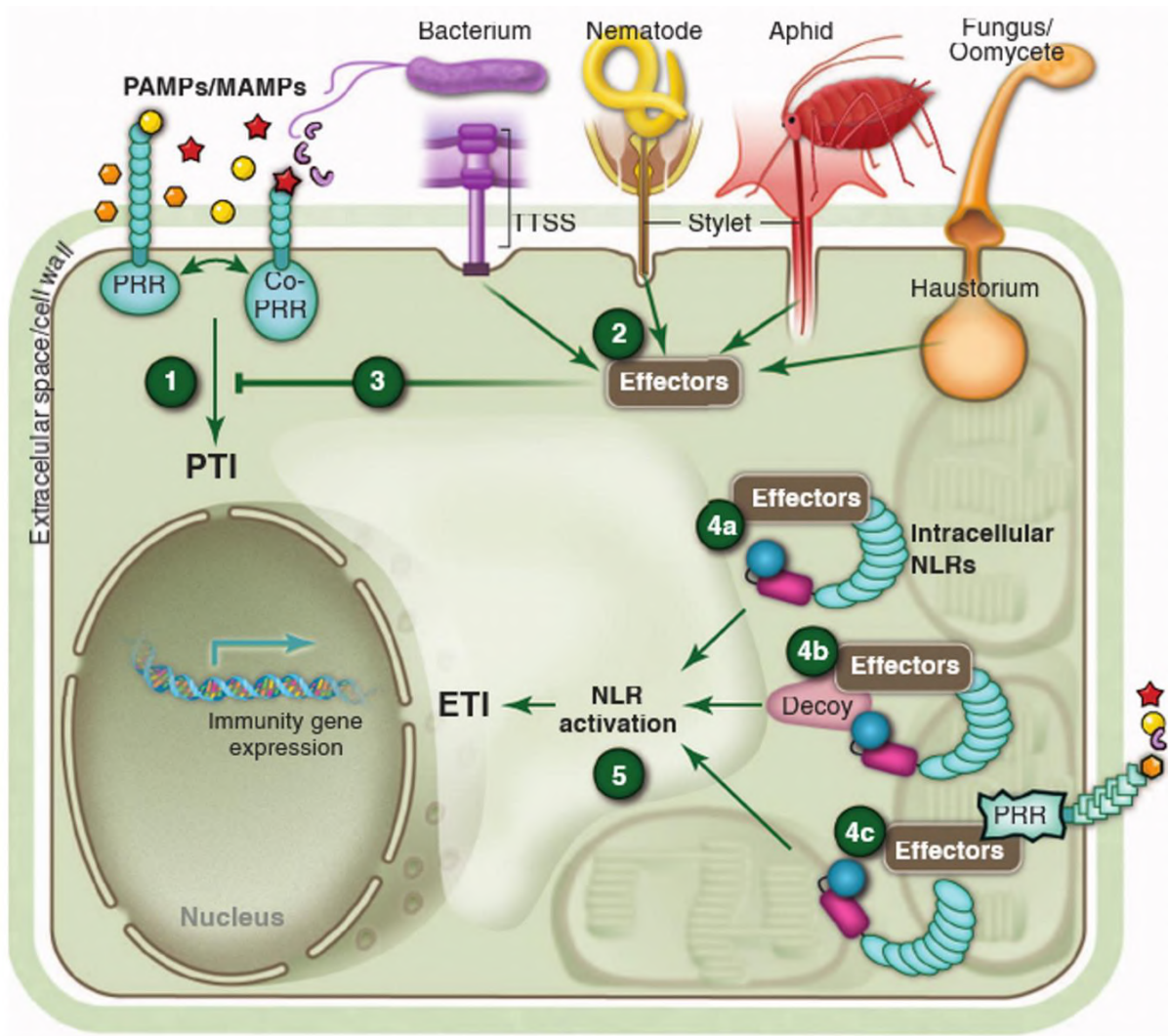


Figure 1. Schéma du système immunitaire de la plante. Des pathogènes de tous les modes de vie expriment des PAMPs lorsqu'ils colonisent les plantes (les formes sont codées par couleur des agents pathogènes). Les plantes les perçoivent via les PRR extracellulaires et initient la PTI (étape 1). Les agents pathogènes délivrent des effecteurs de virulence à la fois dans l'apoplaste des cellules végétales pour bloquer la perception des PAMP (non illustré) et à l'intérieur de la cellule (étape 2). Ces effecteurs sont adressés à des emplacements subcellulaires spécifiques où ils peuvent supprimer la PTI et faciliter la virulence (étape 3). Les récepteurs NLR intracellulaires peuvent détecter les effecteurs de trois manières principales : premièrement, par interaction récepteur-ligand (étape 4a); deuxièmement, en détectant une altération médiée par un effecteur dans une protéine leurre qui imite structurellement une cible effectrice mais n'a aucune autre fonction dans la cellule végétale (étape 4b) ; et troisièmement, en détectant une altération produite par un effecteur sur une cible de virulence chez l'hôte, comme le domaine cytosolique d'un PRR (étape 4c). Chacun de ces modes d'activation déclenche l'ETI (Dangl *et al.*, 2013).

appropriées (Monaghan & Zipfel, 2012; Bigeard *et al.*, 2015). Chez le riz, CERK1, un RLK au domaine extracellulaire de type « Lysin Motif » (LysM), se lie aux PAMPs chitooligosaccharides avec l'aide de la LysM-RLP de haute affinité CeBIP. Si la détection des PAMPs par les PRR est spécifique, les voies de signalisation induites en suivant qui vont activer les réponses de défense et les mécanismes de résistance basale de la plante ou PTI sont eux efficaces contre un large spectre de pathogènes (Monaghan & Zipfel, 2012) (Figure 1).

(b) L'ETI (« Effector-Triggered Immunity »)

Cependant, certains pathogènes sont capables de produire des toxines et des protéines de virulence qu'on appelle effecteurs qu'ils injectent dans les cellules végétales de façon à contrecarrer la PTI. Pour ce faire, les bactéries possèdent un système de sécrétion de type III (T3SS). On parle alors d'« Effector-Triggered Sensibility » (ETS) lorsque la maladie s'installe. Au cours de la longue évolution commune entre les plantes et leurs pathogènes, une « course à l'armement » moléculaire, décrite par Jones & Dangl (2006), s'est installée. Afin de s'opposer à l'ETS, les plantes reconnaissent les effecteurs pathogènes, qui deviennent alors des facteurs d'avirulence (Avr), grâce à des protéines de résistance (R). Cette résistance est connue sous le nom de résistance gène pour gène qui induit des réactions de défense plus fortes que lors de la PTI, et qui sont souvent accompagnées de la HR. On parle alors d'« Effector-Triggered Immunity » (ETI) (Miller *et al.*, 2017). Il existe quatre types de gènes codant pour des protéines R représentant 80% des gènes R. On trouve les RLP et les RLK à la membrane plasmique et dans le cytosol se trouvent les protéines de type NBS (« Nucleotide Binding Site »)-LRR (NLR) avec, à leur extrémité N-terminale, soit un domaine « Toll Interleukin Receptor » (TIR), soit un domaine « Coiled Coil » (CC). Le domaine NBS sert à fixer et hydrolyser l'ATP, le domaine LRR permet les interactions protéines-protéines, le domaine CC sert aux interactions intramoléculaires avec le domaine NBS et le domaine TIR est potentiellement impliqué dans les mécanismes de signalisation. L'architecture des NLRs semblent ainsi variable avec plusieurs domaines pouvant être associés les uns aux autres de manière flexible, permettant l'évolution de diverses stratégies de

perception des effecteurs pathogènes. Ainsi, des études ont montrée l'importance du recrutement d'autres protéines et l'importance des domaines TIR et CC dans l'oligomérisation de ces protéines (Cesari, 2018).

Comme assez peu d'interactions directes entre les protéines R et les Avr ont été démontrées, un autre modèle pour expliquer ces mécanismes et l'efficacité de l'ETI a été développé dans lequel les protéines ne reconnaissent pas directement l'effecteur pathogène mais les modifications qu'ils causent sur ses protéines végétales cibles telles qu'une phosphorylation ou un clivage d'une partie de la protéine (Głowacki *et al.*, 2011). Également, La reconnaissance indirecte peut se produire lorsque les NLRs surveillent les modifications causées par les effecteurs sur les protéines cibles des effecteurs (la protéine cible est alors appelée protéine gardée) ou les protéines leurres. Les leurres sont souvent intégrés dans la structure des NLR, permettant la détection des effecteurs par liaison directe. Certaines protéines de type NLR, dépourvues de domaines régulateurs tels que le NBS et le LRR, fonctionnent également comme des capteurs d'effecteurs, mais leur mode d'action n'est pas clair (Cesari, 2018) (Figure 1).

(c) La QDR (« Quantitative Disease Resistance »)

Les réponses immunitaires liées à la PTI et ETI peuvent impliquer des mécanismes similaires tels que la production de ROS, la signalisation via des protéines kinases et la reprogrammation transcriptionnelle. La distinction entre ces réponses de défense reste donc ambiguë et il a été suggéré que la résistance des plantes se situe plutôt dans un continuum entre la PTI et l'ETI (Thomma *et al.*, 2011). Comme de nombreuses réponses de résistance partielle sont plus fréquemment observées que l'ETI dans les populations naturelles et les cultures en champs (Young, 1996; Bartoli & Roux, 2017), plusieurs études ont proposé d'expliquer ce phénomène par ce qu'on appelle la QDR (ou Résistance Quantitative aux maladies). Contrairement à l'ETI, qui est définie comme une résistance qualitative, la QDR est caractérisée par une distribution continue de phénotypes de résistance au sein d'une population plutôt que par une absence totale de maladie et impliquent de

nombreux gènes aux effets partiels à la base de la durabilité de cette résistance, dont les fonctions, lorsqu'elles sont connues, ne sont pas toujours associées à des mécanismes de défenses (Roux *et al.*, 2014; French *et al.*, 2016; Delplace *et al.*, 2020).

4) Les voies de signalisation activées par la perception des pathogènes

(a) Les flux d'ions

Après la reconnaissance du microorganisme pathogène par les éliciteurs, différentes voies de signalisation s'activent dans la cellule pour garantir la mise en place de réponses cellulaires et physiologiques adaptées de la part de la plante. De manière très précoce, on trouve des flux d'ions notamment des efflux de potassium (K^+), de chlore (Cl^-) et de nitrate (NO_3^-) et des influx de calcium (Ca^{2+}) et de protons (H^+) qui entraînent une dépolarisation de la membrane plasmique (Zimmermann *et al.*, 1997; Wendehenne *et al.*, 2002; White & Broadley, 2003). Ces flux entrants et sortants induisent une acidification du cytoplasme en amont du déclenchement d'autres composants des voies de signalisation : un choc oxydatif liés à la production de NO et de ROS et l'activation des MAP Kinases (MAPKs) et des « Ca^{2+} -Dependent Protein Kinases » (CDPKs) (Sakano, 2001).

Le Ca^{2+} joue un rôle majeur dans la signalisation et le déclenchement des réponses immunitaires. Les variations intracellulaires de Ca^{2+} , que ce soit au niveau du cytoplasme ou du noyau, déclenchées de manière très précoces, entre 30 secondes et deux minutes après la perception du pathogène, sont spécifiques des différentes situations de stress rencontrées par la plante et sont considérés comme des éléments clés dans la spécificité de la réponse déployée. Ces variations diffèrent en termes de durée, de fréquence et d'intensité de la réponse. Elles ont donc donné naissance au concept de signature calcique (Ranf *et al.*, 2011). Le Ca^{2+} joue un rôle sur tous les aspects des réponses de défense de la plante. Par exemple, il induit l'activité des NADPH oxydases, via l'activation transitoire des CDPKs, responsables de la production de ROS et notamment de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), essentiel lors du choc oxydatif. En retour, le H_2O_2 est à l'origine d'un second pic de la

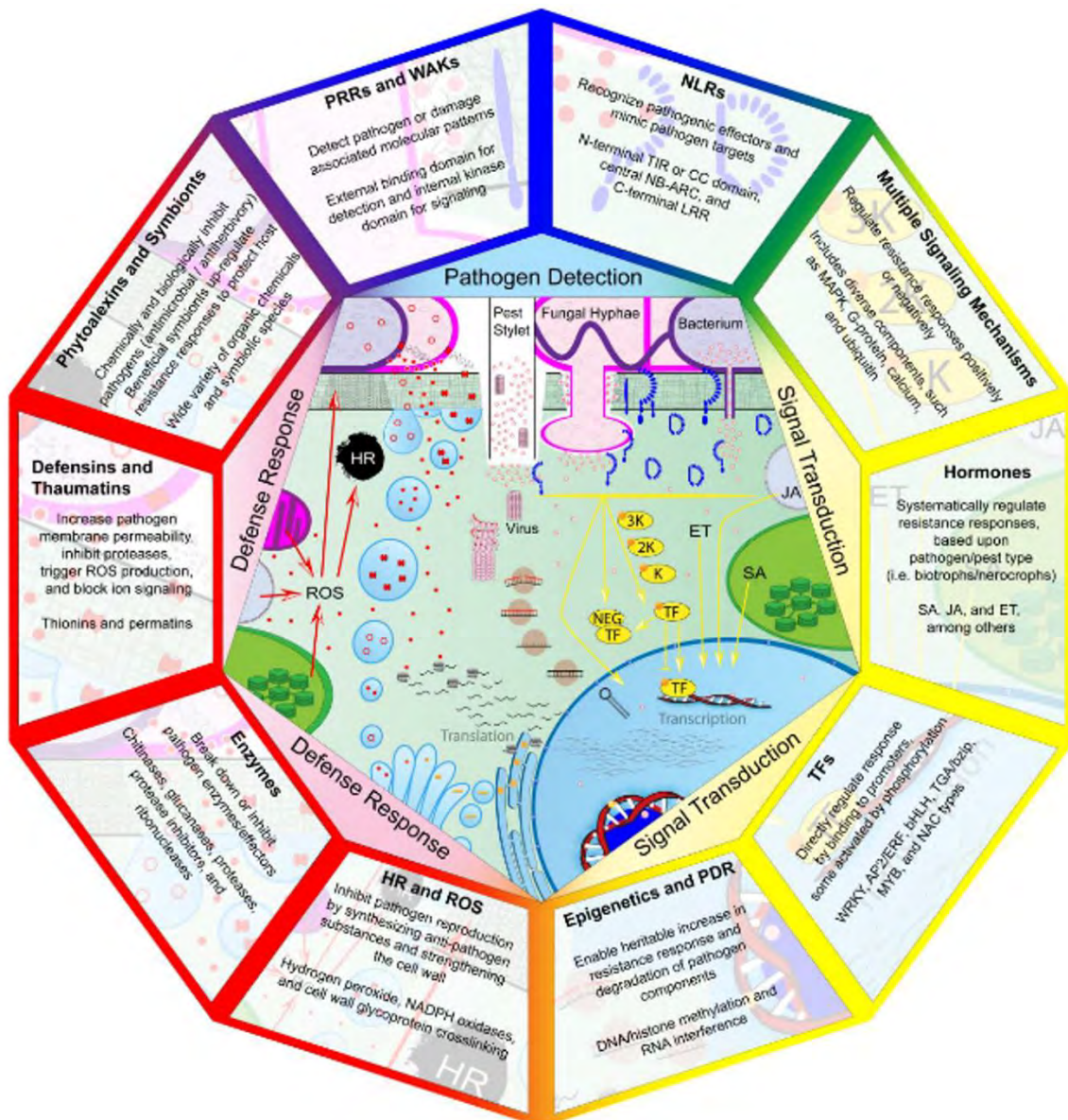


Figure 2. Composants des mécanismes de résistance impliqués dans la détection des agents pathogènes, transduction du signal et réponses de défense. Les éliciteurs produits pathogènes par des microorganismes pathogènes sont reconnus par des récepteurs végétaux pour initier des cascades de signalisation. Les récepteurs activés (bleu) initient alors l'une des nombreuses signaux voies de transduction ou agissent directement comme facteurs de transcription (TF). Les voies de transduction du signal (jaune) comprennent les cascades de signalisation des MAPKs, la signalisation calcique, la production d'hormones, l'activité des facteurs de transcription et la régulation épigénétique. Ces facteurs déclenchent l'expression de gènes associés aux réponses de défense, tels que ceux régulant la production des ROS, des enzymes antimicrobiennes, des défensines et des phytoalexines. Ces composés de défenses (rouge) inhibent activement la reproduction des agents pathogènes ou rendent la suite de l'infection plus difficile. La décomposition des composants cellulaires pathogènes par des composés de défense conduit à une libération supplémentaire d'éliciteurs augmentant la réponse de résistance (Andersen *et al.*, 2018).

concentration en Ca^{2+} intracellulaire (Richards *et al.*, 2014; Demidchik & Shabala, 2017; Wu *et al.*, 2020). L'activation prolongée de certaines CDPKs par des Avr mène à l'induction des enzymes responsables de la biosynthèse d'hormones végétales essentielles lors des réponses de défense : l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET), mais également à la production de ROS qui vont déclencher la mort cellulaire contrôlée des cellules infectée (Boudsocq & Sheen, 2013) (Figure 2).

(b) Les ROS

Les ROS jouent un rôle essentiel dans la mise en place de l'immunité chez la plante suite à leur accumulation rapide et localisée induisant un choc toxique. Parmi les principaux ROS actifs chez la plante, on trouve des radicaux superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydroxyles (OH^{\cdot}), de l' H_2O_2 et du NO (Huang *et al.*, 2019). Ces formes peuvent devenir toxiques lors de leur suraccumulation si la cellule est incapable de les convertir en formes non actives. Elles causent des dommages sur l'ADN, les protéines et les lipides en oxydant les chaînes latérales des acides aminés et les bases azotées, ce qui peut amener des mutations des guanines en thymine ou adénine ainsi que des lésions des brins d'ADN (Hemnani & Parihar, 1998). Les ROS sont produits par plusieurs voies métaboliques et notamment par la chaîne de transport des électrons dans les mitochondries et les chloroplastes. L'enzyme principale responsable de la production de ROS est la NADPH oxydase (ou RBOH pour « Respiratory Burst Oxydase Homolog »). Néanmoins, les ROS peuvent également être produits par des peroxydases pariétales activées par les changements de concentration de Ca^{2+} et/ou de pH (Tripathy & Oelmüller, 2012). La HR est directement déclenchée par l'accumulation des ROS comme cela a été montré pour l' H_2O_2 qui déclenche la HR chez des cellules de soja traitées avec un éliciteur du pathogène fongique *Phytophthora megasperma* sp. *glycinee*. L' H_2O_2 fonctionne également dans les cellules environnantes comme un signal diffusible qui active les gènes de défense (Levine *et al.*, 1994).

Pour faire en sorte que la mort cellulaire déclenchée par la HR reste contrôlée et confinée aux seules cellules infectées par le pathogène, il est nécessaire de

stopper la propagation des ROS et de leurs dommages grâce à des molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, le glutathion, les flavonoïdes, etc... Les ROS sont aussi transformés en formes non toxiques par des enzymes comme la superoxide dismutase qui catalyse la réaction transformant l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et la catalase qui convertit l' H_2O_2 en $H_2O + \frac{1}{2}O_2$ (Mittler, 2017).

Les ROS sont aussi des molécules de signalisation de la défense. Elles jouent notamment un rôle dans les voies de signalisation de l'immunité en activant certaines PR protéines, MAPKs et facteurs de transcription, en induisant la production de SA et ET, et en inhibant des phosphatases, elles-mêmes inhibitrices des MAPKs (Huang *et al.*, 2019) (Figure 2).

(c) Les cascades de signalisation des MAPKs

Pour pouvoir répondre de manière efficace à la détection des agents pathogènes, il est nécessaire que les voies de signalisation activées transmettent le signal le plus rapidement possible. D'un point de vue énergétique, si la plante ne peut pas se permettre de synthétiser à chaque fois l'ensemble des protéines nécessaires aux réactions de défenses, elle ne peut pas non plus avoir son système immunitaire perpétuellement actif sans que son développement en pâtisse (Huot *et al.*, 2014). Pour cela, les modifications post-traductionnelles des protéines de signalisation et notamment la phosphorylation jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire (Gough & Sadanandom, 2021). En effet, la majorité des PRR et récepteurs possèdent un domaine kinase et la modification du niveau de phosphorylation de ces protéines fait partie du mécanisme général de la transduction du signal de reconnaissance d'un pathogène. Les cascades de phosphorylation sont généralement composées de trois types de kinase différents : les MAPKs (ou MPKs), les MAPKKs (ou MPKKs), et les MAPKKKs (ou MEKs). Chez *Arabidopsis*, on retrouve 20 gènes de MAPKs, 10 de MPKKs et 60 de MEKs (Rasmussen *et al.*, 2012). Elles sont désactivées par des MAPK phosphatases (MKPs). Par exemple, MKP1 déphosphoryle MPK3, MPK4 et MPK6 (Ulm *et al.*, 2002),

essentielles dans la mise en place des réponses de défense après la perception de flg22 (Meng & Zhang, 2013).

En bout de chaîne, les principales protéines cibles des MPKs sont des facteurs de transcription, tels que les facteurs de transcription de type WRKY, NAC, MYB et AP2/ERF qui assurent la reprogrammation transcriptionnelle massive nécessaire à l'établissement de l'immunité végétale (Javed *et al.*, 2020). Ainsi, *A. thaliana* possède 74 gènes WRKY dont la grande majorité sont induits par les stress biotiques mais également abiotiques. Ils sont impliqués dans les réponses immunitaires et sont capables d'interagir avec des protéines R et d'autres facteurs de transcription qui vont moduler leurs activités et celles de leurs gènes cibles en fonction du stress détecté (Phukan *et al.*, 2016). Par exemple, la détection de flg22 induit l'activation de MPK3 et MPK6 qui vont phosphoryler WRKY33. La forme phosphorylée de WRKY33 peut alors se fixer aux promoteurs de ses gènes cibles pour activer leur transcription, dont lui-même et des gènes de défenses, induisant notamment la production de la camalexine (Meng & Zhang, 2013). De façon intéressante, la surexpression des gènes MAPKs et WRKYs dans des plantes transgéniques est responsable d'une plus grande résistance de ces plantes aux microorganismes pathogènes (Devendrakumar *et al.*, 2018).

Les facteurs de transcription ne sont pas les seules cibles des MAPKs, on trouve aussi des enzymes de biosynthèse des hormones végétales, telles que ACS2 et ACS6 responsables de la production d'ET. En effet, MPK3 et MPK6 stabilisent ces deux enzymes en les phosphorylant et elles phosphorylent également WRKY33 qui activent la transcription des gènes codant pour ACS2 et ACS6 (Devendrakumar *et al.*, 2018) (Figure 2).

(d) Les hormones végétales

Les hormones végétales sont essentielles dans l'établissement et la régulation des réponses immunitaires. Elles sont également primordiales dans la croissance et le développement de la plante et sont donc à la croisée des voies de

signalisation complexes qui régulent la balance des ressources entre le développement et l'immunité. Elles permettent ainsi une adaptation rapide de la plante aux stress biotiques rencontrés sans surcoût énergétique. Les hormones principales impliquées dans les défenses en aval des réponses précoces telles que les variations calciques et le choc oxydatif sont le SA, le JA et l'ET. Dans une moindre mesure, on retrouve des voies de signalisation associées à l'auxine (IAA) et à l'acide abscissique (ABA) (Huot *et al.*, 2014; Ning *et al.*, 2017). Toutes ces hormones ne sont pas produites en réponse à tous les microorganismes détectés par la plante, il y a des spécificités même si toutes ces voies de signalisation sont fortement imbriquées et interconnectées. Le SA est préférentiellement induit en réponse à des microorganismes dont le style de vie est biotrophe ou hemibiotrophe. Le JA et l'ET sont eux produits plus généralement en réponse à des pathogènes nécrotrophes (Pieterse *et al.*, 2012; Bürger & Chory, 2019) (Figure 2).

Le SA est un composé phénolique dont la production est fortement induite lors de la détection d'un pathogène (Ding & Ding, 2020; Huang *et al.*, 2020). Il existe deux voies majoritaires de biosynthèse du SA chez les plantes et ces deux voies emploient le même précurseur, le chorismate qui est synthétisé par la voie du shikimate dans les chloroplastes. Les deux voies de biosynthèse du SA sont la voie de l'isochorismate dans les chloroplastes et la voie de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) dans le cytoplasme (Peng *et al.*, 2021). Dans la voie de l'isochorismate, le chorismate est transformé en isochorismate par des isochorismate synthases SID2/ICS1 et ICS2 dans les chloroplastes. Puis, cet isochorismate est transporté du chloroplaste vers le cytoplasme par EDS5 où il est transformé en isochorismoyl-9-glutamate par une isochorismoyl-glutamate synthase PBS3/GH3.12. Cet isochorismoyl-9-glutamate peut spontanément devenir du SA ou cette transformation peut être accélérée par une isochorismoyl-9-glutamate pyruvoyl-glutamate lyase EPS1 (Nawrath & Métraux, 1999; Wildermuth *et al.*, 2001; Garcion *et al.*, 2008). Dans la voie des PALs, le chorismate est transformé en phénylalanine soit dans les chloroplastes où elle sera ensuite exportée vers le cytoplasme, soit après avoir été transporté dans le cytoplasme. Quelle que soit l'origine de

production de la phénylalanine, elle est convertie par les PALs en acide trans-cinnamique qui sera converti en SA via l'acide ortho-coumarique ou les benzaldéhydes et l'acide benzoïque. Le SA est rendu inactif avant d'être transporté et stocké dans la vacuole sous plusieurs formes telles que des formes glycosylées comme le Salicylate Glucose Ester et le SA 2-O- β -D-Glucoside ou conjuguées à l'acide aminé Aspartate pour donner le salicyloyl-L-aspartate (Cochrane *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2010; Ding & Ding, 2020). Lorsque cela est rendu nécessaire par la détection d'un parasite, ces formes sont hydrolysées et le SA actif peut jouer son rôle dans l'activation de l'immunité. Il induit un certain nombre de MAPKs et de gènes de défense dont la protéine PR1, ainsi que la SAR et la mise en place de la HR (Ding & Ding, 2020; Huang *et al.*, 2020).

Le gène *NPR1* (« Nonexpressor of PR gene 1 ») fut l'un des premiers gènes identifiés comme requis pour la réponse immunitaire liée au SA (Zhang & Li, 2019). Les mutants *npr1* sont sensibles à nombreux pathogènes et la surexpression de *NPR1* procure à la plante une résistance à large spectre. *NPR1* ainsi que ses trois paralogues *NPR2*, *NPR3* et *NPR4* sont capables de lier le SA avec une forte affinité. Ils possèdent des répétitions ankyrines nécessaires pour les interactions protéine-protéine et un domaine BTB (« Broad-Complex, Tramtrack, and Bric a brac ») généralement retrouvé chez les facteurs de transcription. En absence de SA, *NPR1* est ubiquitiné dans le noyau par l'ubiquitine E3 ligase CRL3 et l'E4 ligase UBE4 et est ainsi dirigé vers le protéasome 26S où il est dégradé. *NPR3* et *NPR4* agissent quant à eux comme des répresseurs des facteurs de transcription de type TGA. Ces deux mécanismes empêchent la transcription des gènes de réponse au SA. Lorsque le niveau de SA augmente après la détection d'un pathogène, la liaison du SA à *NPR3* et *NPR4* lève leur répression sur les TGAs et *NPR1* subit un changement conformationnel qui l'empêche d'être adressé au protéasome et lui permet de se lier aux TGAs. Ces deux réponses induisent la transcription des gènes cibles des TGAs notamment l'activation des gènes PR dont PR1 et la SAR (Ding *et al.*, 2018). Au vu de l'importance de l'accumulation du SA dans la cellule pour l'activation des réponses de défense, il est également nécessaire pour la plante de réguler finement la synthèse du SA pour éviter l'emballement des réponses immunitaires et

l'entravement du développement de la plante. Ainsi, en l'absence de pathogène, la transcription des gènes importants pour la biosynthèse du SA, tels que ICS1 et EDS5, est réprimée par des facteurs de transcription tels que ANAC019 et la « Calmodulin (CaM)-Binding Protein 60 g » CBP60g (Ding & Ding, 2020; Huang *et al.*, 2020).

Une autre hormone végétale essentielle dans les réponses de défense de la plante est le JA qui est synthétisé à partir de l'acide linoléique dans les plastes où il est transformé en l'intermédiaire acide cyclique 12-oxo-phytodienoïque. Cet intermédiaire peut ensuite être transporté dans le peroxyosome où il est réduit et oxydé en JA (Campos *et al.*, 2014; Ruan *et al.*, 2019). Cette forme n'est cependant pas celle qui est reconnaissable par son récepteur. Le JA est couplé à l'isoleucine et diffuse ainsi librement dans le noyau où il est perçu par la protéine E3 ubiquitine ligase à domaine F-box COI1 qui, en interagissant avec les protéines JAZ, lève leur répression sur les facteurs de transcription MYC2, MYC3 et MYC4 (Fernández-Calvo *et al.*, 2011; Kazan & Manners, 2013; Schweizer *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2014). Les protéines JAZ fonctionnent parfois en complexe avec d'autres corépresseurs comme NINJA et TOPLESS (Pauwels *et al.*, 2010; Acosta *et al.*, 2013; Ruan *et al.*, 2019). Après reconnaissance par COI1, les JAZ sont adressés au protéasome pour dégradation et les facteurs de transcription MYC peuvent activer la transcription des gènes de réponse au JA. Comme pour le SA, plusieurs mécanismes sont mis en place par la plante pour atténuer la réponse au JA notamment la synthèse de nouveaux JAZ et autres facteurs de transcription qui vont réguler négativement la transcription des gènes de réponses au JA et l'hydrolyse et l'oxydation du JA en molécules inactives (Campos *et al.*, 2014).

Les réponses liées au JA incluent l'activation de très nombreux gènes de défenses et du métabolisme primaire lorsque la plante est blessée par des herbivores, des insectes ou des microorganismes nécrotrophes. Ces microorganismes ont donc mis en place des mécanismes pour contourner les défenses liées à la signalisation du JA. Par exemple, la bactérie pathogène

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (*Pst*) utilise à son avantage l'antagonisme entre les voies de signalisation du SA et du JA (Campos *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2020). En effet la résistance de la plante à *Pst* est majoritairement médiée par les voies du SA. La bactérie produit donc une molécule, la coronatine, qui est un fort agoniste du JA et qui va se lier à COI1. Cela va déclencher la dégradation des répresseurs JAZ et donc activer les voies de signalisation du JA, qui vont à leur tour supprimer celles du SA, notamment grâce à des facteurs de transcription de type NAC qui vont empêcher la production de l'enzyme de biosynthèse du SA, ICS1, et activer celle de la méthyltransférase BSMT1 qui transforme le SA en méthyl-SA volatil et inactif (Block *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2020). Le JA interfère également avec une autre hormone végétale induite lors d'une attaque pathogène, l'ABA, en participant à une plus grande ouverture stomatique. A l'inverse, le JA travaille de concert avec l'éthylène en induisant en ensemble de gènes communs tels que PDF1.2 et ERF1 permettant une meilleure résistance aux nécrotrophes (Campos *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2019; Gupta *et al.*, 2020).

L'ET, composé de deux carbones et de quatre hydrogènes, est une hormone végétale gazeuse. Elle est synthétisée par des ACC synthases (ACS) et oxydases (ACO) lorsque des stress biotiques sont perçus par la plante (Nascimento *et al.*, 2018). Ces stress activent également les MAPKs et CDPKs des voies de signalisation qui empêchent la dégradation des ACS par le protéasome (Li *et al.*, 2012). L'ET peut avoir des effets à la fois positifs et négatifs sur les réactions de défenses de la plante. Par exemple, des mutants d'ACS chez *Arabidopsis* chez qui la biosynthèse d'ET est diminuée sont plus sensibles à l'infection par *Pst* (Guan *et al.*, 2015). De plus, *Pst* produit des effecteurs qui ciblent la production d'ET déclenchée par la PTI et des MAPK activées dans les voies de signalisation du SA sont responsable de l'induction de plusieurs ACS, démontrant une interconnexion positive de ces deux hormones dans les réponses immunitaires (Guan *et al.*, 2015). Néanmoins, il est aussi démontré que l'ET, avec le JA, joue un rôle antagoniste à celui du SA. En effet, les facteurs de transcription EIN3 et EIL1 répriment la transcription de SID2 responsable de la biosynthèse du SA notamment lors de la PTI (Pieterse *et al.*, 2012).

Les signaux de l'ET sont captés par cinq récepteurs différents chez *Arabidopsis*, séparés en deux sous-familles : les récepteurs « ET Response » ETR1 et « ET Response Sensor » ERS1 dans une, et les récepteurs « ET insensitive » EIN4, ETR2 et ERS2 dans l'autre (Hua *et al.*, 1998; Gallie, 2015). Tous possèdent un domaine transmembranaire hydrophobe situé en position N-terminale nécessaire pour la liaison à l'ET, un domaine GAF potentiellement impliqué dans l'homodimérisation des récepteurs et un domaine Histidine kinase (Hua & Meyerowitz, 1998; Gao *et al.*, 2008; Grefen *et al.*, 2008). Les récepteurs de l'ET sont localisés au réticulum endoplasmique où ils forment des dimères et, en absence d'ET, se lient à CTR1 une serine/thréonine kinase au niveau du domaine Histidine kinase. CTR1 phosphoryle le domaine C-terminal d'EIN2, une protéine ancrée au réticulum endoplasmique. Après la liaison de l'ET au domaine N-terminal des récepteurs, CTR1 est rendu inactif. La non-phosphorylation du domaine C-terminal d'EIN2 induit sa libération du réticulum et son adressage au noyau où il induit la dégradation de deux protéines F-box EBF1 et EBF2 pour empêcher l'adressage au protéasome des facteurs de transcription EIN3 et « EIN3-like » (EIL) (Grefen *et al.*, 2008; Gallie, 2015). Lorsque ces protéines s'associent en complexe, elles peuvent se lier au promoteur des ERF qui vont activer les gènes de réponse à l'ET (Ju *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2012) tels que les HRGP et les PR protéines PR2, PR3, PR4 et PR12 (Gallie, 2015).

L'auxine, dont la forme majoritairement présente dans la plante est l'acide indole-3-acétique ou IAA, est une phytohormone essentielle pour le développement et la croissance de la plante, notamment lors de la division, de l'élongation et de la différenciation cellulaire. L'IAA est impliquée dans la formation racinaire et l'initiation des racines latérales, le phototropisme, le géotropisme, la dominance apicale, le développement du fruit, la formation des tissus vasculaires et la senescence (Zhao, 2018). L'IAA est synthétisée à partir de composés indoles produits dans la plante par la voie du Shikimate. Les voies de biosynthèse principales de l'IAA chez *Arabidopsis* ont comme précurseur le Tryptophane (Trp), même si une voie Trp-indépendante existe à partir de l'indole-3-glycerol phosphate

(IGP) (Ouyang *et al.*, 2000; Normanly, 2010; Mano & Nemoto, 2012). A l'heure actuelle, quatre voies de biosynthèse de l'IAA ayant lieu dans le cytoplasme sont connues : la voie de l'acide indole-3-pyruvique (IPA), la voie de l'indole-3-acetamide (IAM), la voie de la tryptamine (TRM), et la voie de l'indole-3-acetaldoxime (IAOx). La biosynthèse de l'IAA est finement régulée, mais les niveaux d'IAA dans la plante sont aussi contrôlés par la conjugaison de l'IAA avec des acides aminés et des sucres qui sont considérées comme des formes de stockage inactives de l'IAA (Woodward & Bartel, 2005; Ludwig-Müller, 2011). Différents signaux environnementaux vont déclencher la biosynthèse de l'IAA dans la plante notamment des stress de nature biotique et abiotique qui active la transcription des gènes de biosynthèse du Trp (Ljung, 2013). En l'absence d'IAA, les facteurs de transcription ARF (« Auxin Response Factors ») sont inhibés par les répresseurs Aux/IAA, des protéines qui recrutent le corépresseur TOPLESS au niveau des gènes de réponse à l'auxine. TOPLESS, en retour, recrute l'Histone DeAcetylase (HDAC) 19 dont l'activité a pour conséquence de condenser la chromatine ce qui empêche la transcription des gènes de réponse à l'auxine (Leyser, 2018). En présence d'IAA, le récepteur à l'IAA TIR1, une protéine F-box, interagit avec les Aux/IAA et le dirige vers la dégradation par le protéasome. Sans les Aux/IAA, TOPLESS et HDAC19 ne sont plus adressés aux gènes de réponse à l'auxine et les ARFs peuvent activer leur expression (Leyser, 2018).

L'IAA promeut la sensibilité des plantes à une variété de bactéries pathogènes biotrophes et hemibiotrophes tels que *Pst*, *Xanthomonas campestris* (*Xcc*) et *Rs*. Cet IAA est soit produit par la plante lorsque les microorganismes pathogènes sont détectés soit produit et sécrété par les pathogènes eux-mêmes (Kunkel & Harper, 2018). L'IAA est capable d'antagoniser les défenses reliées au SA et la PTI, et d'augmenter la virulence des microorganismes. En effet, la détection du PAMP bactérien flg22 active la production du microARN miR393 dont le rôle est d'adresser à la dégradation l'ARN messager de TIR1. L'absence de TIR1 empêche l'activation des réponses à l'auxine, qui ne peuvent donc plus bloquer les voies de signalisation liées au SA. Une autre conséquence de l'action de miR393 est une plus grande production de glucosinolates et de camalexine, importants dans la

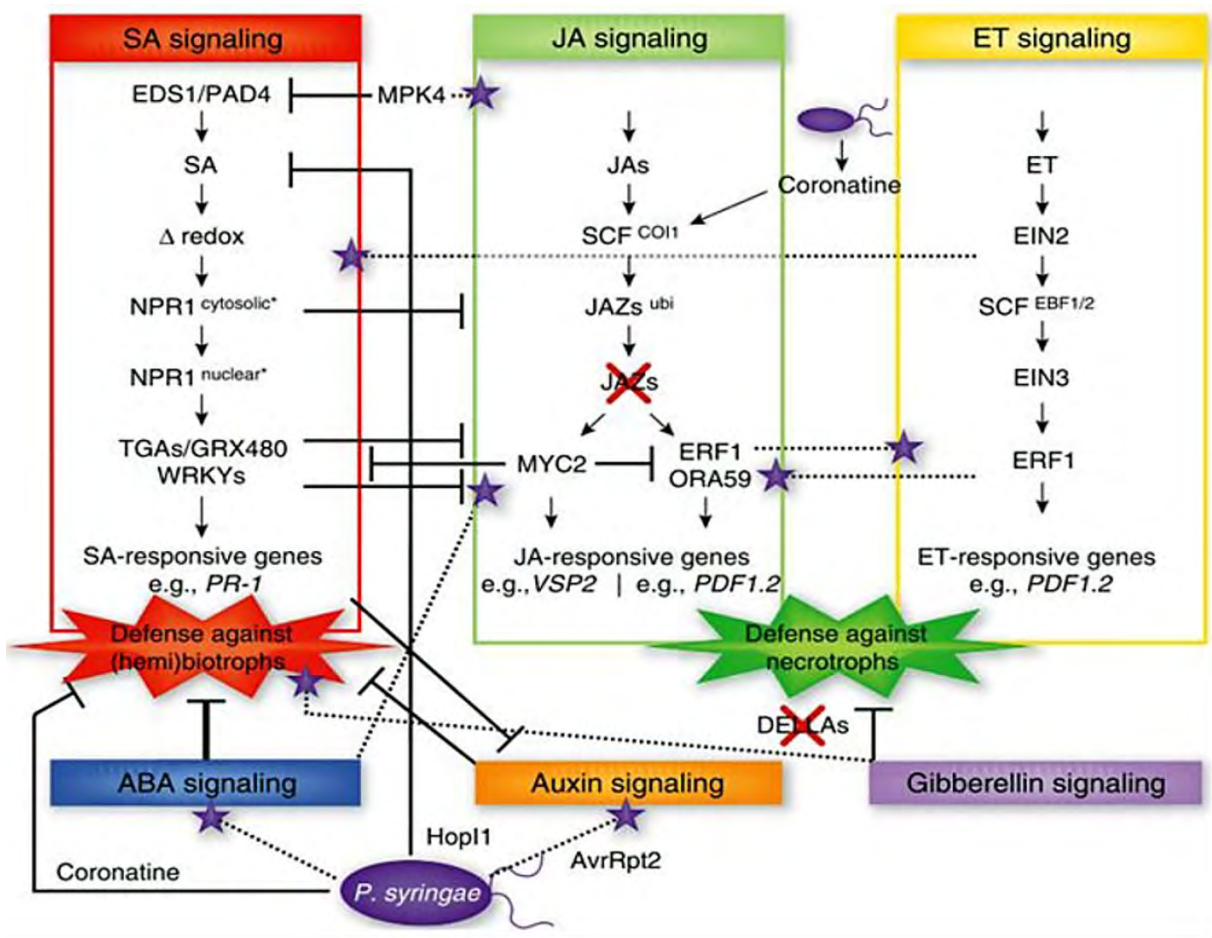


Figure 3. Schéma du réseau des voies de signalisation des phytohormones dans la réponse immunitaire des plantes. Les réseaux hormonaux et leurs actions dans la mise en place de la réponse immunitaire chez les plantes. Des pathogènes comme *Pst* sécrètent des toxines (par exemple, la coronatine) et des effecteurs (par exemple, Hop1, AvrRpt2) capables de manipuler les réseaux hormonaux pour supprimer les réponses de défenses et favoriser les processus d'infection (Pieterse et al., 2009).

résistance aux pathogènes biotrophes. Ainsi, la résistance à *Pst* et *Hyaloperonospora arabidopsidis* est plus importante chez des plantes sur-exprimant miR393 (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

L'ABA agit synergiquement avec d'autres hormones, tout comme l'ET et le JA, pour antagoniser les voies de signalisation liées au SA. L'ABA, détecté par son récepteur PYR1, régule négativement les voies du SA et est un régulateur positif de la résistance aux champignons nécrotrophes *Plectosphaerella cucumerina* et *Alternaria brassicicola* et un régulateur négatif à la bactérie biotrophe *Pst* (García-Andrade *et al.*, 2020). A l'inverse, l'acide gibbérellique (GA) et les cytokinines (CK) sont antagonistes de la signalisation du JA et synergiques avec celle du SA. En effet, *PR1*, l'un des gènes les plus importants dans les réponses de défense induites par le SA pour la résistance à *Pst*, est activé par le facteur de transcription TGA3 notamment après interaction avec ARR2, un facteur de transcription activé par les CK. En ce qui concerne le GA, l'inhibition de la dégradation des protéines DELLAs par le GA permet la répression de l'expression des gènes de réponse au JA par les JAZ. L'absence de JA induit une plus grande production de SA et est cohérent avec la plus grande sensibilité à des pathogènes nécrotrophes, observée chez des mutants des protéines DELLAs (Pieterse *et al.*, 2012).

L'interconnexion des voies de signalisation de toutes ces hormones permet la complexité de réponse nécessaire à l'adaptation des plantes à la variété des contraintes qu'elles rencontrent dans leur environnement. Par exemple, le récepteur du SA NPR1 est responsable de l'inhibition des voies de signalisation du JA et de l'ABA de manière SA-dépendante (Spoel *et al.*, 2007; Yasuda *et al.*, 2008). A l'inverse, NPR1 est dirigé vers la dégradation par le protéasome par un traitement à l'ABA (Ding *et al.*, 2013), faisant de NPR1 un carrefour des voies de signalisation du SA, du JA et de l'ABA. Cette modulation de réponses immunitaires par l'ABA sert probablement lorsque la plante est confrontée à un stress abiotique important. Par exemple, comme une forte humidité est plus favorable pour la sporulation et la

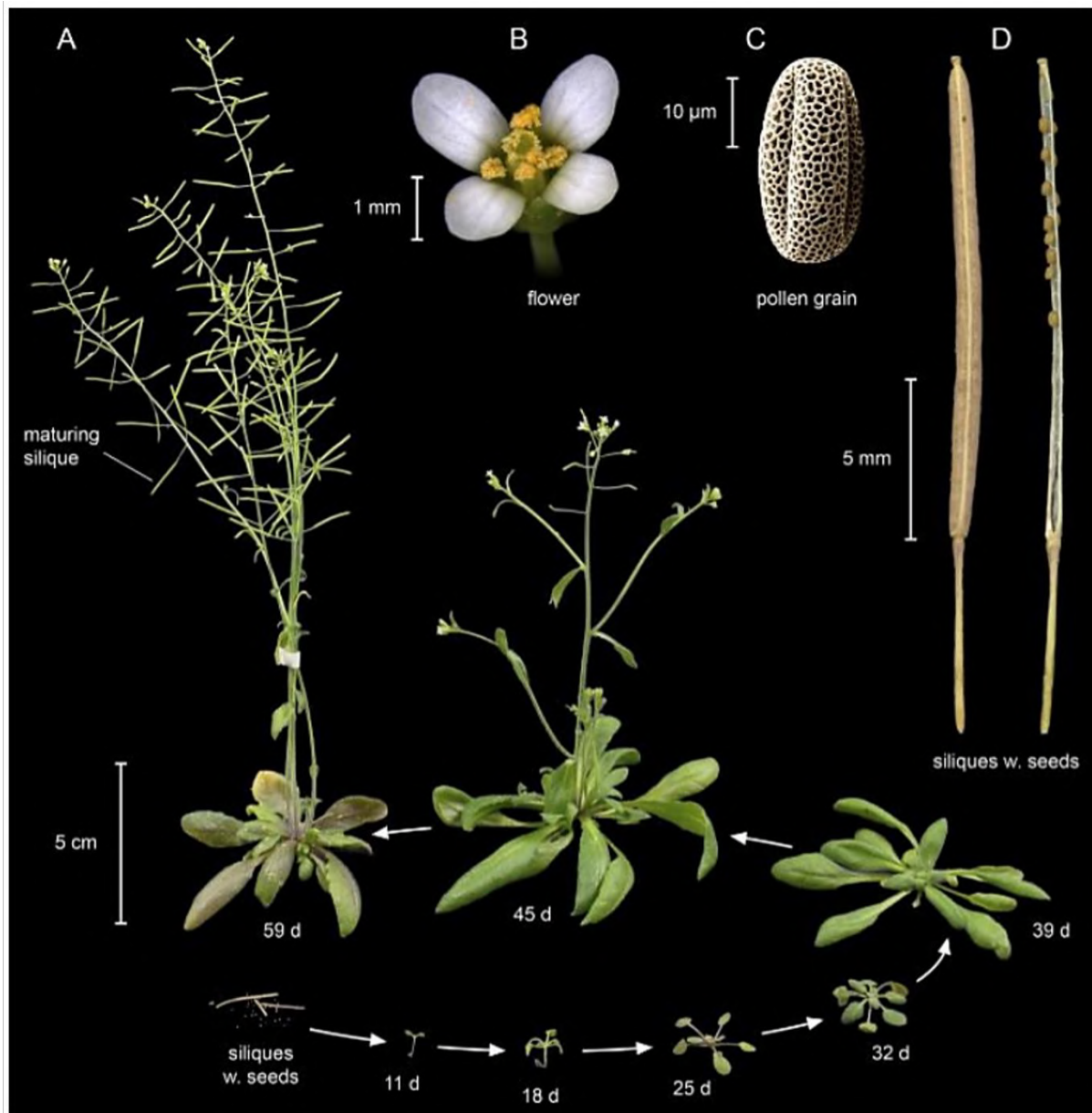


Figure 4. Cycle de vie d'*Arabidopsis thaliana*. (A) Une plante d'*A. thaliana* de l'accession Columbia (Col) à différents stades de son cycle de vie, de la graine (en bas à gauche) à la plantule (11 jours), au stade de croissance végétative (39 jours) et de croissance reproductive (45 jours). Photos de (B) une fleur, (C) un grain de pollen et (D) des siliques matures (cosses de graines ; à gauche : fermée ; à droite : ouverte avec quelques graines restantes) (Krämer, 2015).

germination des spores de la plupart des champignons et oomycètes biotrophes et nécrotrophes et est essentielle à la survie et à la propagation des bactéries, la probabilité d'une attaque par un microorganisme pathogène en condition de sécheresse semble plus faible. Ainsi, la régulation principalement négative de l'ABA sur les réponses de défense liées au SA peut permettre une meilleure allocation des ressources de la plante en fonction du stress rencontré pour maximiser ses chances de survie (Berens *et al.*, 2017) (Figure 3).

5) Le pathosystème *Arabidopsis thaliana* / *Ralstonia solanacearum*

(a) La plante *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana, appelée également Arabette des dames, est une angiosperme dicotylédone de la famille des Brassicacées. Si *A. thaliana* est aujourd'hui présente sur tous les continents de la planète, cela n'a pas toujours été le cas. En effet, si elle est originaire d'Europe, d'Asie et du nord de l'Afrique, elle s'est ensuite acclimatée au reste de l'Afrique, à l'Amérique et à l'Océanie. Cette plante est considérée depuis les années 1970 comme la plante modèle utilisée en biologie végétale. De fait, *A. thaliana* présente de nombreux avantages en faisant un outil majeur dans la recherche : c'est une petite plante dont le cycle de développement graine à graine est rapide (environ deux mois) et chaque plante peut produire un grand nombre de graine (jusqu'à 40 000). Son petit génome de 135 mégabases contenu sur cinq chromosomes et prédit pour coder environ 35 000 gènes fut le premier génome végétal à être séquencé en l'an 2000. Sa capacité à être transformée facilement par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* est un atout pour la recherche en génétique et les collections de mutants disponibles internationalement sont à présent nombreuses (Krämer, 2015). La possibilité d'infecter *A. thaliana* avec une multitude de pathogènes tels que des virus (Pagán *et al.*, 2010), des nématodes (Sijmons *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2016), des champignons (Dean *et al.*, 2012), des oomycètes (Kamoun *et al.*, 2015) et des bactéries (Mansfield *et al.*, 2012) en font un excellent modèle pour l'étude et la compréhension des interactions plante-pathogènes (Figure 4).

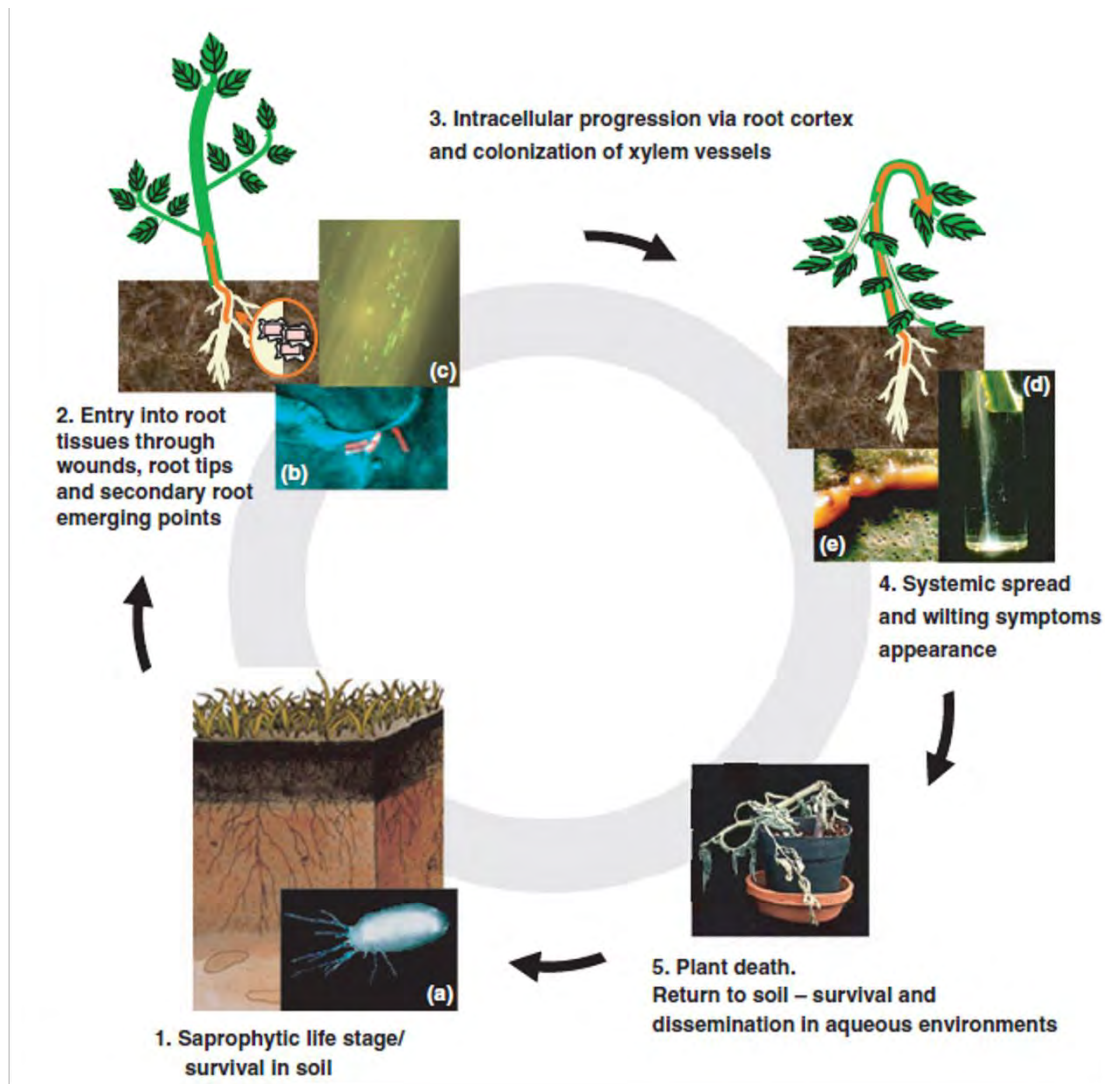


Figure 5. Cycle infectieux de *Ralstonia solanacearum*. *Rs* peut survivre dans le sol pendant de longues périodes. Une fois en contact avec une plante hôte, la bactérie est capable de pénétrer dans les tissus racinaires et d'envahir le système vasculaire de la plante. Les symptômes de flétrissement sont associés à une forte multiplication bactérienne dans les vaisseaux du xylème et la production abondante d'exopolysaccharides. La maladie peut entraîner la mort de la plante, en fonction de plusieurs paramètres, y compris l'hôte, les facteurs environnementaux et l'agressivité de la souche. **(A)** Observation en microscopie électronique à transmission de la souche sauvage GMI1000. **(B)** Observation en microscopie confocale de bactéries (en rouge) fixées à la surface des cellules végétales. **(C)** Des bactéries exprimant la GFP sont visualisées à la surface d'une racine de tomate. **(D)** Bactéries suintant d'une tige de tomate infectée dans l'eau. **(E)** Exopolysaccharides bactériens suintant des vaisseaux de la tige après section transversale (Genin, 2010).

(b) La bactérie *Ralstonia solanacearum*

Rs est une bactérie pathogène des plantes, de type Gram négative qui a été décrite pour la première fois en 1896 par Erwin F. Smith comme responsable d'une maladie sur la tomate, l'aubergine et la pomme de terre. Cette bactérie est transmise par le sol et a un cycle de vie dit hémibiotrophe (García *et al.*, 2019). Sa taille varie entre 0,5 µm et 1,5 µm et ses nombreux flagelles la rendent extrêmement mobile (Sneath, 1986). *Rs* est capable d'infecter plus de 200 espèces végétales appartenant à 50 familles différentes, dont quelques monocotylédones (par exemple, la banane) et principalement des dicotylédones parmi lesquelles on trouve des plantes à fort intérêt agronomique telles que la tomate, la pomme de terre, ou encore le tabac. Ce vaste spectre d'hôte explique la distribution géographique mondiale de *Rs* que l'on retrouve sur tous les continents du globe, préférentiellement dans des zones au climat tropical.

Rs a été classée deuxième dans la liste des 10 bactéries phytopathogènes les plus importantes en terme scientifique et économique (Mansfield *et al.*, 2012). Elle est considérée comme un modèle pour l'étude des mécanismes moléculaires lors des interactions plantes-pathogènes et son génome a été séquencé en 2002 (Salanoubat *et al.*, 2002). Les différentes souches de *Rs* sont classées en quatre phylotypes, déterminés par la variation de séquence de la région ITS (« Internally Transcribed Spacer ») et qui correspondent globalement à l'origine géographique des souches. Ainsi, le phylotype I est principalement retrouvé en Asie, le phylotype II en Amérique, le phylotype III en Afrique et le phylotype IV en Océanie (Fegan & Prior, 2005).

Le contrôle de la maladie causée par *Rs* est rendu difficile par la capacité de *Rs* à survivre de longues périodes dans les sols et l'eau. Avant pénétration dans la plante, *Rs* a un mode de vie saprophytique. Elle survit en se nourrissant de la matière organique morte disponible dans le sol et parfois dans l'eau (Elphinstone *et al.*, 1998; Elphinstone, 2005; Álvarez *et al.*, 2010). La bactérie pénètre dans les racines de la plante grâce aux ouvertures naturellement formées par des blessures, aux



Figure 6. Symptômes du flétrissement bactérien causés par *Rs*. Photos d'une accession d'*A. thaliana* résistante (à gauche) et sensible (à droite) prises 10 jours après l'inoculation par la souche GMI1000 de *Rs*. L'accession sensible est complètement flétrie (photos de R. Berthomé).

extrémités des racines et aux points d'émergence des racines latérales. Une fois à l'intérieur de la racine, *Rs* progresse à travers le cortex racinaire jusqu'aux vaisseaux du xylème où elle se multiplie alors activement et colonise le reste de la plante. Lors de cette multiplication bactérienne, elle empêche la circulation d'eau et de nutriments des racines aux parties aériennes de la plante par la production massive d'exopolysaccharides (EPS) (Figure 5), engendrant l'apparition des symptômes de la maladie : le flétrissement bactérien (Figure 6). Une fois la plante entièrement colonisée, les bactéries retournent dans les sols alentours (Genin, 2010).

Le séquençage de la souche sauvage de *Rs* GMI1000 a permis l'étude des facteurs génétiques de la virulence de la bactérie. Parmi eux, l'un des plus importants est le système de sécrétion de type III (T3SS). Ce T3SS correspond à une seringue moléculaire dont la bactérie se sert pour injecter à l'intérieur de la cellule végétale des effecteurs dit de type III pour contrecarrer les défenses basales de la plante et favoriser la libération de nutriments pour la survie de la bactérie (Feng & Zhou, 2012). Au niveau transcriptionnel, le T3SS est contrôlé par l'opéron *hrp* et notamment les gènes *HrpG* et *HrpB*. Le gène *PhcA* est quant à lui essentiel pour la production des EPS et des enzymes de dégradation de la paroi végétale qui sont sécrétées via le système de sécrétion de type II (T2SS) (Genin & Denny, 2012). Un autre système de sécrétion, le système de sécrétion de type VI (T6SS) dont la fonction supposée est la formation de biofilm, est également essentiel pour la virulence de *Rs* (Zhang *et al.*, 2014; Bernal *et al.*, 2018). La motilité flagellaire de *Rs* contribue également de manière significative à la maladie, la motilité étant nécessaire à la bactérie pour localiser et envahir les racines, bien qu'elle ne soit pas nécessaire plus tard au cours de la pathogenèse (Genin & Denny, 2012). La production de phytohormones par *Rs* est également soupçonnée depuis longtemps de contribuer à la virulence de la bactérie. En effet, *Rs* produit en culture de l'ET et des molécules indoliques apparentées à l'auxine et cette production est régulée positivement par *HrpG* (Valls *et al.*, 2006). Néanmoins, leur rôle dans la virulence n'a pas été démontré et les mutants négatifs pour l'éthylène sont totalement virulents (Genin & Denny, 2012).

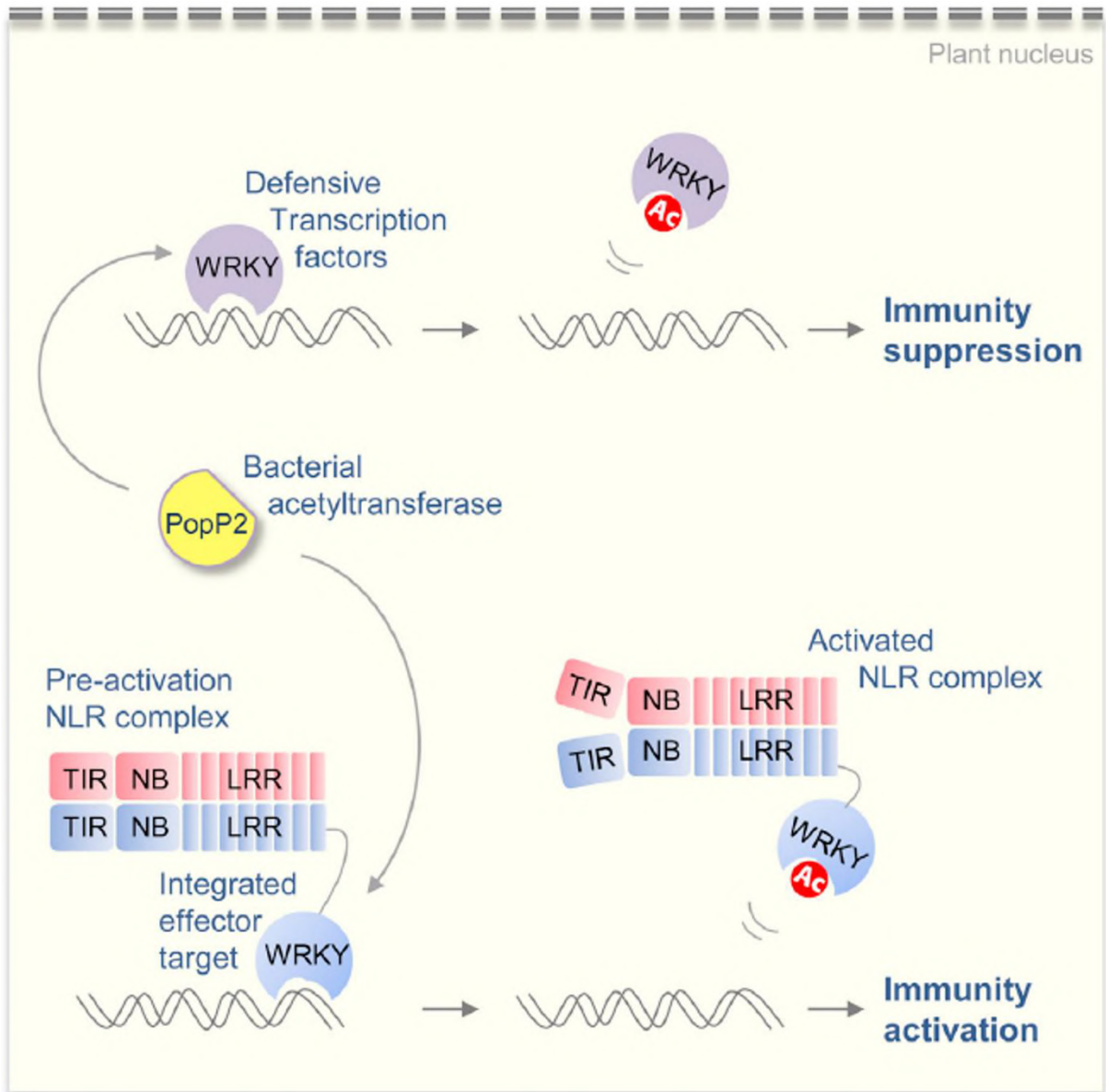


Figure 7. Mécanismes d'action et de reconnaissance de l'effeteur PopP2 de *Rs*. En absence de la paire d'immuno-récepteurs immunitaire RPS4/RRS1-R, PopP2 acétyle les facteurs de transcription WRKY entrainant la suppression de l'immunité. La paire d'immuno-récepteurs immunitaire RPS4/RRS1-R intercepte PopP2 avec un domaine leurre pour déclencher l'activation de l'immunité (Le Roux *et al.*, 2015).

6) Les mécanismes de résistance de la plante à Rs

Peu de mécanismes moléculaires de la résistance des plantes à *Rs* ont été aussi bien caractérisés que celui lié à la paire d'immunorécepteurs RRS1-R/RPS4 et l'effecteur de type III PopP2. Chez *A. thaliana*, dans l'accession Nd-1 résistante à *Rs*, l'effet de PopP2 inhibant les réponses immunitaires de la plante est contrecarré par le complexe de récepteurs TIR-NB-LRR RRS1-R/RPS4. En effet, lorsque PopP2, une acétyltransférase bactérienne, est injecté dans le cytoplasme de la cellule végétale par le T3SS, il s'auto-acétyle et est ainsi dirigé vers le noyau. Arrivé à destination, PopP2 acétyle des facteurs de transcription de type WRKY. Cette acétylation empêche la liaison des facteurs de transcription aux promoteurs de leur gènes cibles, ce qui a pour effet de désactiver les défenses de la plante liées à la PTI. Cependant, RRS1-R possède un domaine représentatif des facteurs de transcription WRKY qui agit comme un leurre et est ciblé par PopP2. Lorsque RRS1-R est acétylé, il se détache de l'ADN et de RPS4, ce qui entraîne l'activation de l'immunité dépendante de RPS4 (Le Roux *et al.*, 2015) (Figure 7). Chez *A. thaliana*, un autre mécanisme de résistance, cette fois-ci quantitative, implique trois QTL (« Quantitative Trait Loci »), *QRS1*, *QRS2* et *QRS3*. Plus particulièrement, le gène *ERECTA*, sous-jacent à *QRS3* code pour une protéine LRR-RLK conférant une résistance à la souche 14.25 de *Rs* (Godiard *et al.*, 2003) mais également à d'autres pathogènes tels que le champignon nécrotrophe *Plectosphaerella cucumerina* et l'oomycète *Pythium irregulare* (Llorente *et al.*, 2005; Adie *et al.*, 2007). *ERECTA* pourrait potentiellement fonctionner comme un senseur de l'intégrité de la paroi végétale (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2009). Chez d'autres espèces végétales, des QTL associés à la résistance à *Rs* ont été identifiés comme EBWR9, EBWR14 et EBWR2 identifiés chez l'aubergine (Salgon *et al.*, 2017). EBWR9, localisé sur une partie du chromosome neuf, connue pour contenir des gènes de résistance et qui pourrait participer à la résistance déclenchée par la reconnaissance de l'effecteur de type III RipAX2 (Morel *et al.*, 2018).

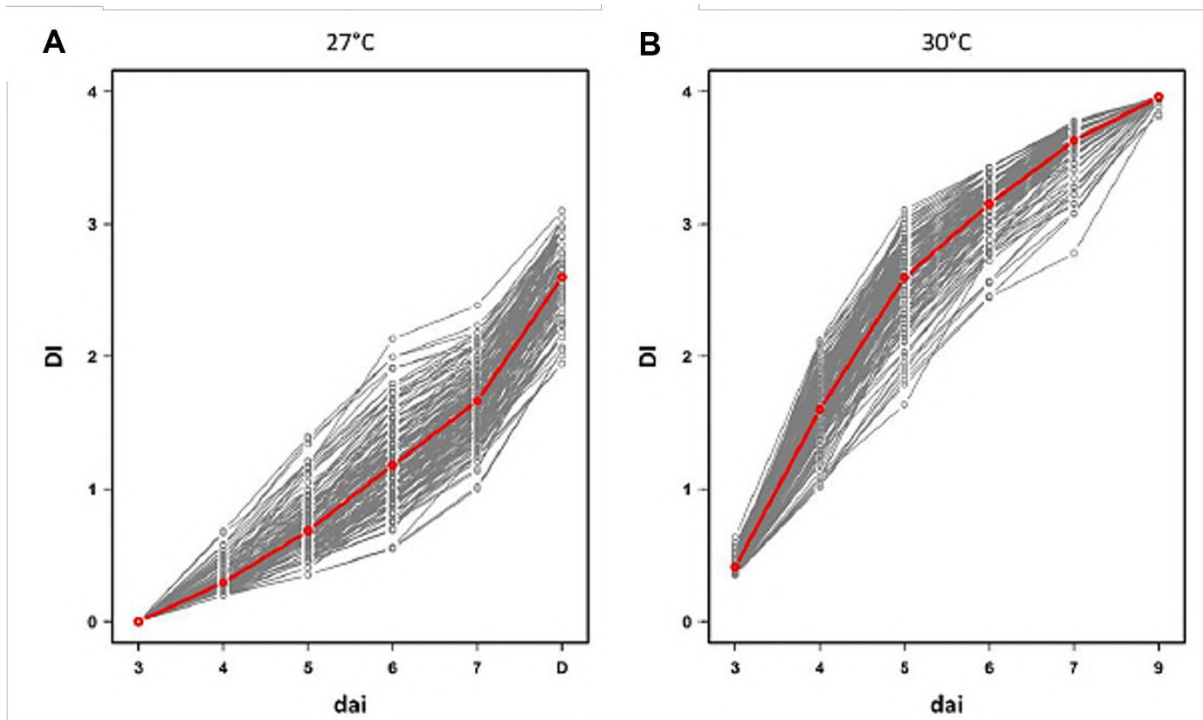


Figure 8. Diversité génétique de la réponse des plantes à *Rs* GMI1000 dans la population locale TOU-A. (A) Variation génétique de la dynamique de réponse à *Rs* à 27 °C. (B) Variation génétique de la dynamique de réponse à *Rs* à 30 °C. La ligne rouge représente la moyenne du score de maladie sur toutes les accessions. dai, jours après l'inoculation. DI, indice de maladie (adaptée de Aoun *et al.*, 2020).

7) Influence de la température sur l'issue de l'interaction entre *A. thaliana* et *Rs*

Dans le contexte du changement climatique, les différents modèles prédisent une augmentation de 2°C à 4,9°C, allant jusqu'à 7°C pour les prédictions les plus pessimistes, des températures moyennes à la surface du globe à la fin du siècle. La température, qui parmi les paramètres climatiques, est prédite pour fluctuer le plus, a d'ores et déjà des effets délétères sur les écosystèmes, entraînant une diminution de la diversité génétique des espèces et une extension des zones d'influence de certains pathogènes (Desaint *et al.*, 2021). De plus, un nombre croissant d'études décrivent que des températures élevées impactent négativement une majorité des mécanismes de résistance des plantes aux pathogènes, et cela quels que soient les mécanismes de défense (PTI, ETI, QDR), et les espèces de plantes et de pathogènes étudiées (Desaint *et al.*, 2021). Par exemple, suite à l'exploration de la diversité génétique de réponse de 187 accessions d'*A. thaliana* d'une population locale à *Rs* à 27°C et 30°C, les résultats ont montré qu'en moyenne, l'élévation de la température accélère et aggrave l'apparition des symptômes de maladie (Aoun *et al.*, 2020) (Figure 8). De plus, en 2017, Aoun *et al.* ont aussi montré que la résistance à *Rs* liée à RRS1-R, active à 27°C, est inhibée à 30°C. Les mécanismes associés à ces pertes de résistance restent très mal compris, peu étudiés et lorsqu'ils le sont, ces travaux sont menés sur peu de pathosystèmes, impliquant notamment *Arabidopsis* et la bactérie pathogène *Pst* (Desaint *et al.*, 2021).

Les hypothèses avancées concernent principalement la plante et les connaissances acquises du côté des phytopathogènes restent encore sporadiques. Ainsi, l'élévation de la température pourrait soit entraîner une répression transcriptionnelle de l'expression des gènes de défense, soit entraîner une relocalisation subcellulaire dépendante de l'ABA des protéines de résistance (Mang *et al.*, 2012), ces protéines pouvant servir de senseur des fluctuations de la température (Zhu *et al.*, 2010). Enfin, Cheng *et al.* (2013) ont proposé que chaque partenaire de l'interaction adopte une stratégie de défense (PTI ou ETI) et de virulence (PAMP ou effecteur) dépendante de l'optimum de température de développement de chaque partenaire (Cheng *et al.*, 2013).

Partie II : La signalisation calcique chez les plantes au cours des interactions plantes-microorganismes

Comme évoqué précédemment, le Ca^{2+} est un second messenger universel présent dans toutes les cellules eucaryotes. Chez les plantes, le Ca^{2+} joue un rôle essentiel dans l'activation appropriée des réponses physiologiques à divers signaux environnementaux, que ce soit au cours du développement, par exemple lors de la formation du tube pollinique, lors des réponses à des stress abiotiques comme un stress salin, ou lors d'interactions biotiques avec des symbiontes ou des pathogènes.

1) La diversité des messages calciques

Les variations intracellulaires de Ca^{2+} sont déclenchées suite à la perception de nombreux stimuli très différents et la réponse calcique est l'une des réponses les plus précoces de la plante. Cependant, ces variations de Ca^{2+} ne sont pas identiques et varient selon la nature du signal, ce qui confère une spécificité de réponse à la cellule végétale. Ainsi, la forme, la durée, l'amplitude, la fréquence des pics de Ca^{2+} et l'origine du Ca^{2+} mobilisé diffèrent selon le signal perçu. On parle donc de « signature calcique ». En absence de stimulus, la concentration intracellulaire de Ca^{2+} dans le cytosol est maintenue basse, aux alentours de 100 nM (Stael *et al.*, 2012) mais elle peut rapidement augmenter, par exemple entre 2,5 μM et 3 μM après un choc hypo-osmotique (Mazars *et al.*, 2009). En ce qui concerne les interactions entre la plante et les microorganismes dans son environnement, différentes signatures calciques ont été observées et diffèrent suivant la nature du microorganisme et de l'interaction rencontrée. En effet, les différents PAMPs bactériens flg22 et elf18, le PAMP fongique N-acétylchitooctase et le DAMP d'origine végétale Pep1 déclenchent différentes signatures calciques qui varient dans leur amplitude mais pas leur forme. Ainsi, après une phase de latence d'environ 40 secondes pour flg22 et le N-acétylchitooctase et d'une minute pour elf18 et Pep1, les traitements induisent une forte augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} . Ensuite, un court plateau est suivi par une lente diminution de

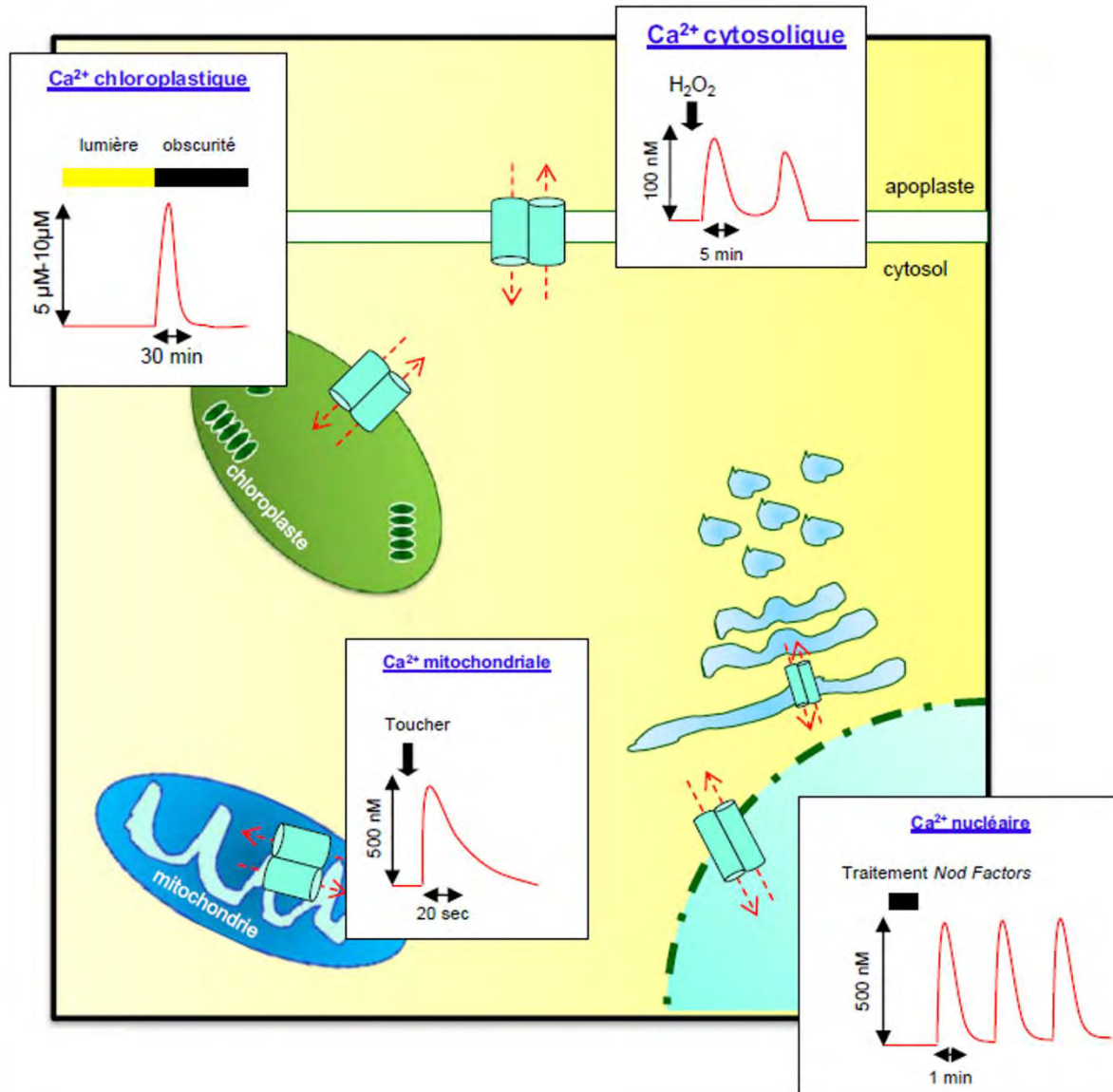


Figure 9. Signatures calciques induites par différents stimuli dans le cytosol et les organites des cellules de plantes. De nombreuses données sur les variations intracellulaires du taux de calcium ont été acquises grâce à l'utilisation de divers outils permettant la mesure du calcium libre dans les différents compartiments de la cellule. Diverses signatures calciques, de durée, d'amplitude, de fréquence différentes ont pu être mesurées dans le cytoplasme après l'application d'H₂O₂ et dans différents organites suite à des stimuli variés, comme l'application de facteurs NOD au niveau nucléaire, dans la mitochondrie suite à une stimulation par le toucher, ou dans le chloroplaste lors de la transition lumière/obscurité (Cheval, 2013).

la concentration calcique jusqu'à son niveau de départ 30 à 40 minutes après l'application des PAMPs. Si la forme de la réponse calcique était similaire pour les quatre traitements, les concentrations calciques maximales atteintes étaient différentes, le maximum étant atteint pour flg22 et le minimum pour Pep1 (Ranf *et al.*, 2011). Également, l'éliciteur cryptogéine sécrété par l'oomycète *Phytophthora cryptogea* déclenche deux signatures calciques distinctes dans le cytosol et le noyau. En effet, la concentration de Ca^{2+} cytosolique augmente fortement cinq minutes après le traitement mais elle retombe rapidement avant d'augmenter de nouveau de manière faible mais soutenue pendant deux heures, alors que la concentration de Ca^{2+} nucléaire augmente d'abord de manière peu importante avant d'être suivie par une plus grosse augmentation soutenue pendant une heure avec un pic à 23 minutes (Mazars *et al.*, 2009) (Figure 9).

Les variations calciques sont générées par un influx de Ca^{2+} dans le cytosol grâce à des canaux calciques tels que les protéines de la famille des CNGCs (« Cyclic Nucleotide-Gated Channels »), des GLRs (« Glutamate Receptor Channels »), des TPC (« Two-Pore Ca^{2+} Channels »), DACCs (« Plasma Membrane Depolarization Activated Ca^{2+} Channels »), et des HACCs (« Plasma Membrane Hyperpolarization Activated Ca^{2+} Channels ») (Hetherington & Brownlee 2004). Par exemple, au cours de la PTI, après détection de flg22 par le complexe FLS2/BAK1, l'hétérodimère CNGC2/CNGC4, normalement inhibé par les CaMs, déclenche l'influx de Ca^{2+} . Le retour au niveau basal de Ca^{2+} est régulé par des « Arabidopsis-Autoinhibited Ca^{2+} ATPases » (ACAs) et plus spécifiquement par ACA8 dans le cas de flg22 (Tian *et al.*, 2020). Il s'agit donc de l'activité des canaux et des pompes calciques qui sont à l'origine des variations de Ca^{2+} . Récemment il a été montré que ZAR1, un récepteur intracellulaire à domaine CC interagissant avec de nombreux effecteurs de bactéries et formant des complexes pentamériques *in vitro* avec des protéines kinases appelés résistosomes, agit comme un canal sélectif de cations qui est perméable au Ca^{2+} . Le résistosome ZAR1 peut s'intégrer à la membrane plasmique et son activation par un effecteur induit un influx de Ca^{2+} , la production de ROS et la mort cellulaire dans des ovocytes de xénope (Bi *et al.*, 2021).

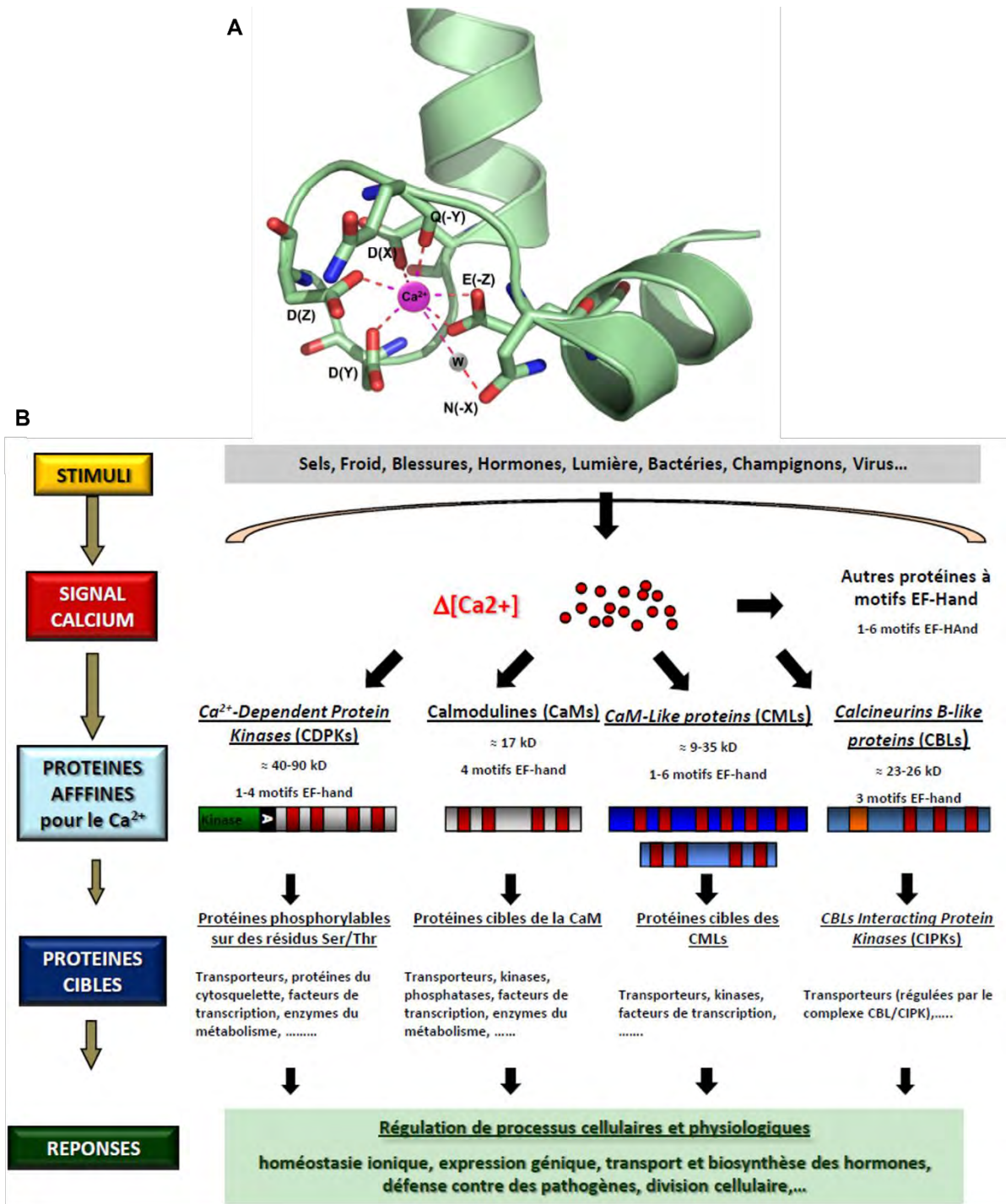


Figure 10. Structure 3D du motif de liaison au Ca^{2+} (EF-Hand) et schémas de la structure des protéines participant à la signalisation calcique. (A) Liaison du Ca^{2+} dans l'EF-hand 4 de la CaM7 d'Arabidopsis (PDB CODE: 5A2H). Les résidus importants pour la liaison de l'ion Ca^{2+} sont présentés : résidu 1 (+X), résidu 3 (+Y), résidu 5 (+Z), résidu 7 (-Y) résidu 9 (-X) et résidu 12 (-Z). W : molécule d'eau, Q : glutamine, D : acide aspartique, E : acide glutamique, N : asparagine (La Verde *et al.*, 2018). (B) Représentation schématique des principales familles de protéines affines pour le Ca^{2+} chez les plantes. Suite à la perception de différents stimuli, des variations de Ca^{2+} intracellulaire constituent un message intracellulaire qui est décodé par différentes familles de protéines affines pour le Ca^{2+} , permettant d'activer des réponses physiologiques appropriées au stimulus initial. Les EF-hands sont représentées en rouge. En orange est représenté un motif EF-hand de 14 acides aminés présent chez les CBLs en position N-terminale. La lettre A représente le domaine auto-inhibiteur de l'activité kinase des CDPKs (Leba, 2011).

2) Le décodage des messages calciques par les protéines senseurs de Ca²⁺

Les signatures calciques doivent être décodées et relayées par des protéines capables de lier le Ca²⁺, appelées des senseurs de Ca²⁺. Ces protéines lient le Ca²⁺ grâce à des motifs particuliers que sont les « EF-hands » dont la structure, très conservée est de type hélice α -boucle-hélice α composée de 29 acides aminés dont les 12 centraux forment la boucle liant l'ion Ca²⁺ (Figure 10A). La fixation de l'ion Ca²⁺ aux EF-hands induit un changement de conformation de la protéine senseur de Ca²⁺, ce qui va moduler son activité soit en lui permettant de se lier à des protéines cibles soit en libérant ses protéines cibles d'une interaction inhibitrice (Kretsinger, 2004).

(a) La Calmoduline

Parmi les protéines senseurs de Ca²⁺, on trouve la Calmoduline (CaM) qui est une protéine présente chez tous les eucaryotes, capable d'interagir et de moduler l'activité d'un grand nombre de protéines cibles (potentiellement plusieurs centaines) (Bouché *et al.*, 2005). Il est suggéré que cette capacité de la CaM de décoder correctement une grande variété de signatures calciques en messages physiologiques en se liant à autant de protéines différentes est possible par la différence de ses motifs EF-hands. En effet, la CaM possède quatre motifs EF-hands non-identiques, une paire de ces motifs étant localisée en N-terminal de la protéine, l'autre paire en C-terminal. Ces deux paires possèdent des propriétés biochimiques différentes. En effet, la paire en N-terminal a une affinité pour le Ca²⁺ dix fois inférieure à celle en C-terminal (Bhattacharya *et al.*, 2004) et les EF-hands de chaque paire travaillent de manière coopérative car lorsqu'un ion Ca²⁺ est lié à l'une des EF-hands de la paire, l'affinité de l'autre augmente (Akke *et al.*, 1991; Gifford *et al.*, 2007). Ainsi, un domaine EF-hand de forte affinité pour le Ca²⁺ pourra potentiellement capter des variations de concentration faibles alors qu'un domaine EF-hand de faible affinité captera préférentiellement les grandes variations de concentration. Ces différences peuvent permettre une modulation dans la réponse

aux signatures calciques sans nécessairement associer un senseur de Ca^{2+} à une signature calcique.

On retrouve sept isoformes de la CaM chez *Arabidopsis* qui ont des rôles variés dans la cellule végétale. La liaison du Ca^{2+} induit un changement conformationnel chez la CaM qui passe d'un état fermé à un état ouvert au cours duquel la surface de la protéine qui était principalement hydrophile devient plus hydrophobe de par l'exposition d'une région hydrophobe riche en méthionine préalablement masquée à l'intérieur de la protéine (La Verde *et al.*, 2018a). Ce changement de conformation permet à la CaM d'interagir avec des protéines membranaires, des enzymes du métabolisme, des kinases et phosphatases, des facteurs de transcription et des protéines de liaison à l'ARN. Ces interactions vont modifier en aval l'état de phosphorylation des protéines, le métabolisme et la biosynthèse des hormones, ou encore l'expression génique (Ranty *et al.*, 2006). En effet, la CaM est capable d'interagir avec des facteurs de transcription de types différents : WRKY, MYB, TGA et NAC (Kim *et al.*, 2009). Également, en présence de Ca^{2+} , l'interaction de CaM6 avec la protéine CPSF30 (« Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 30 ») empêche son activité de liaison à l'ARN (Delaney *et al.*, 2006) et la CaM typique se lie à la protéine à domaine IQ IQD1 pour activer la production de glucosinolates (Levy *et al.*, 2005) (Figure 10B).

D'autres protéines que la CaM sont capables de lier le Ca^{2+} . Il s'agit des protéines de type « Calcineurine B-Like » (CBL), des protéines kinases dépendantes du Ca^{2+} (CDPK), ainsi que des protéines apparentées à la CaM, les « CaM-Like » (CML). Toutes ces protéines sont spécifiques aux plantes. On distingue les senseurs de Ca^{2+} acteurs comme les CDPKs qui peuvent à la fois lier le Ca^{2+} et traduire le signal grâce à un domaine kinase, des senseurs de Ca^{2+} relais comme les CBLs et les CMLs, qui à l'instar de la CaM ne possèdent pas d'autres domaines fonctionnels connus que les EF-hands. Leurs activités passent donc par des interactions avec des protéines cibles (Ranty *et al.*, 2016).

(b) Les protéines « Calcineurine B-Like »

On retrouve dix CBLs dans le génome d'Arabidopsis. Ces protéines interagissent principalement avec 26 CIPKs (« CBL-Interacting Protein Kinases ») (Kolukisaoglu *et al.*, 2004; Weinl & Kudla, 2009) majoritairement dans la régulation des transporteurs et de l'homéostasie des ions, notamment H^+ , Na^+ , K^+ et Mg^{2+} , dans la cellule végétale (Mao *et al.*, 2016). Le premier mécanisme impliquant une CBL et une CIPK à avoir été identifié est le mécanisme impliquant CBL4 et CIPK24, aussi respectivement appelées SOS3 et SOS2, dans la régulation du transporteur SOS1 dont le rôle est de transporter les ions Na^+ en excès dans la cellule vers le sol lorsque la plante est en situation de stress salin. Le stress salin va générer des variations de Ca^{2+} qui sont perçues par CBL4. Après liaison du Ca^{2+} , CBL4 interagit avec le domaine NAF en C-terminal de CIPK24, rendant ainsi accessible à la phosphorylation la boucle d'activation de CIPK24 en N-terminal. Une fois phosphorylée, CIPK24 phosphoryle à son tour SOS1 à la membrane plasmique qui, ainsi activé, va exporter un ion Na^+ vers l'extérieur de la cellule en faisant rentrer un H^+ (Guo *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2002; Zhu, 2003; Sánchez-Barrena *et al.*, 2013). Lors d'un stress salin, les ions Na^+ sont également séquestrés dans la vacuole par l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ par la paire CBL10/CIPK24. Certaines CBLs démontrent une certaine redondance fonctionnelle comme les CBL1 et CBL9, toutes deux capables de se lier avec CIPK23 pour promouvoir l'entrée de K^+ dans la cellule (Mao *et al.*, 2016) (Figure 10B).

(c) Les protéines kinases dépendantes du Ca^{2+}

Les CDPKs sont les seules protéines parmi les quatre familles de senseurs de Ca^{2+} à posséder à la fois le domaine de liaison au Ca^{2+} et un domaine kinase leur permettant d'assurer sans intermédiaire la transduction du signal. Ainsi, la liaison des ions Ca^{2+} a lieu grâce aux EF-hands en C-terminal et la phosphorylation des protéines cibles par un domaine Serine/Thréonine kinase en N-terminal de ces protéines (Harper *et al.*, 2004; Liese & Romeis, 2013). A leur extrémité N-terminale, les CDPKs possèdent un domaine très variable avec des sites possibles de

myristoylation et palmitoylation qui ancrent les protéines à la membrane plasmique mais aussi aux membranes des organites intracellulaires. Les CDPKs possèdent enfin un domaine auto-inhibiteur localisé entre les motifs EF-hands et le domaine kinase et dont le rôle est de bloquer le site actif du domaine kinase en absence de Ca^{2+} . En présence de Ca^{2+} en revanche, la fixation du Ca^{2+} aux EF-hands induit un changement conformationnel au cours duquel ils interagissent avec le domaine auto-inhibiteur libérant ainsi le site actif de la Serine/Thréonine kinase des CDPKs (Delormel & Boudsocq, 2019). On trouve 34 CDPKs et huit CRKs (« CDPK-Related Kinases ») dans le génome d'*A. thaliana* (Hrabak *et al.*, 2003).

A l'instar des autres Ca^{2+} senseurs, les CDPKs sont impliquées dans une grande variété de phénomènes physiologiques au niveau du développement et des réponses aux stress abiotiques et biotiques de la plante (Delormel & Boudsocq, 2019). Par exemple, CDPK6 est un régulateur positif de la croissance des racines latérales car il phosphoryle de manière auxine-dépendante des phospholipases qui stimulent la production de racines latérales (Boudsocq *et al.*, 2012; Swatek *et al.*, 2014; Delormel & Boudsocq, 2019). Quant à CDPK3 et CDPK5 (ou CPK5), ce sont des régulateurs positifs de la PTI et de l'ETI notamment via la reprogrammation génique médiée par les facteurs de transcription WRKY, la production de ROS, la mort cellulaire programmée et la synthèse d'hormone végétale particulièrement le SA via SID2 et l'ET via les ACS (Delormel & Boudsocq, 2019) (Figure 10B).

(d) Les protéines kinases dépendantes du Ca^{2+} et de la Calmoduline

Brièvement, une autre famille de protéines kinases dépendantes du Ca^{2+} a été identifiée pour ses rôles dans l'établissement des symbioses rhizobienne et mycorhizienne à arbuscule. Il s'agit des CCaMKs ou « Ca^{2+} and CaM-dependent protein kinases » qui sont plus proches de la CaMKII (« CaM-dependent protein kinase II ») trouvée chez les animaux que des CDPKs, ayant divergées des CDPKs chez l'ancêtre commun aux plantes terrestres non vasculaires (Patil *et al.*, 1995; Mitra *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2015). Les CCaMKs ne sont pas présentes chez toutes les espèces et pas plus de deux gènes codants pour des CCaMKs n'ont été identifiés

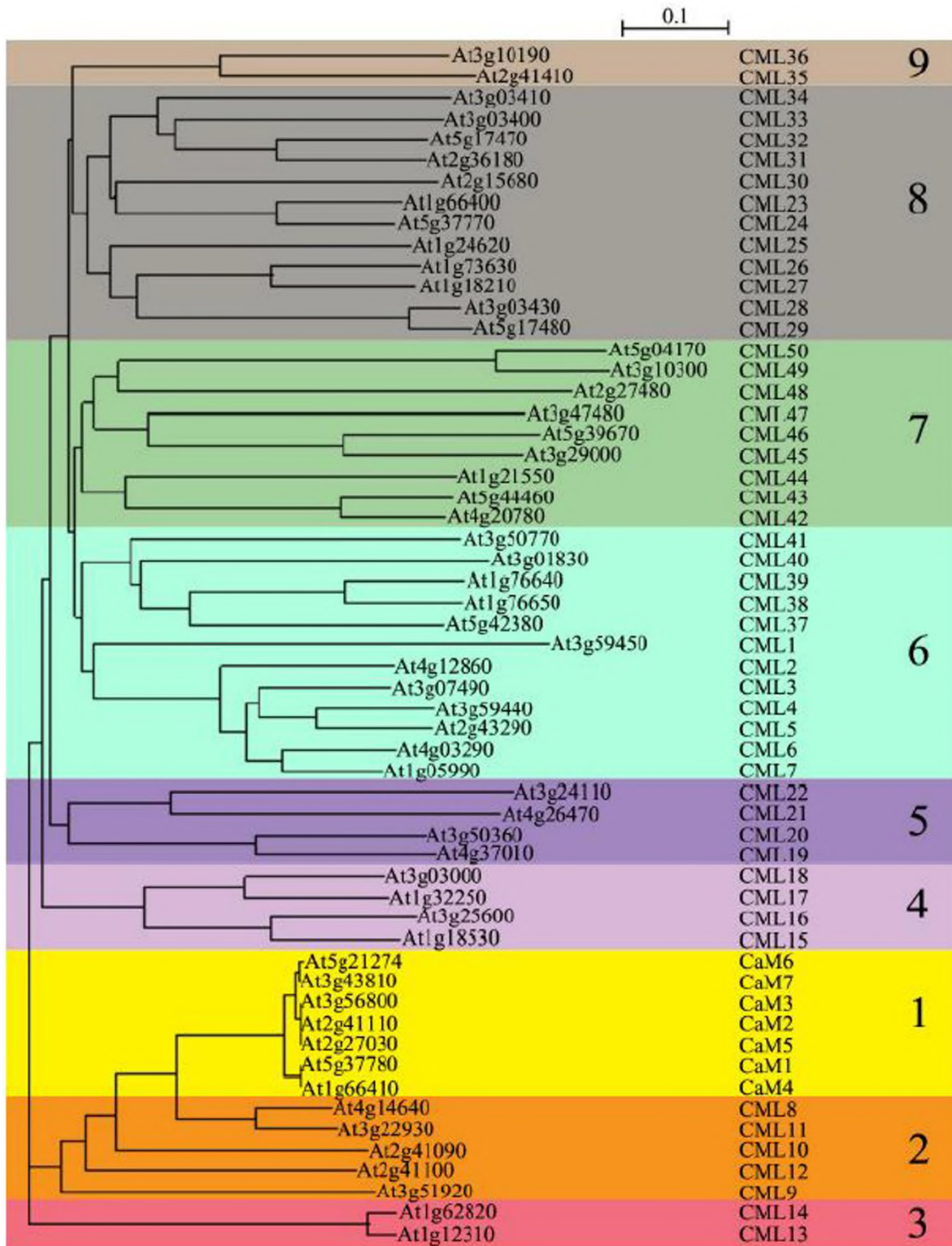


Figure 11. CaMs et CMLs chez Arabidopsis. Toutes les séquences peuvent être classés en 9 groupes sur la base des similitudes d'acides aminés. Le chiffre à droite indique numéro de groupe. La distance indiquée par « 0,1 » fait référence au pourcentage de divergence de séquence calculé par ClustalX (Thompson et al., 1997). Toutes les CaMs typiques sont classés dans le groupe 1 et les CML se répartissent dans les groupes 2 à 9 (McCormack & Braam, 2003).

chez des espèces végétales. Ainsi, aucune CCaMK n'a été identifiée chez *Arabidopsis*. Cette observation est cohérente avec le fait qu'*Arabidopsis* n'établit aucune symbiose. Une seule CCaMK a été identifiée chez la tomate et la diminution de son expression réduit la résistance de la plante au champignon *Sclerotinia sclerotiorum* (*S. sclerotiorum*) et à la bactérie *Pst* (Wang *et al.*, 2015).

3) La diversité des CaMs et des protéines « Calmoduline-Like » chez les plantes

A côté de la forme typique de la CaM, les plantes possèdent un répertoire particulier de protéines qui lui sont apparentées et qui partagent au moins 16% et jusqu'à 75% d'identité au niveau de la séquence protéique avec la CaM (McCormack & Braam, 2003). Ces protéines sont appelées CMLs (« CaM-Like ») (Figure 10B). Chez la plante modèle *Arabidopsis*, on trouve 50 CMLs qui se répartissent en neuf sous-groupes sur la base des similarités de leur séquence protéique (Figure 11). Les CMLs ont une structure similaire à celle de CaM, c'est-à-dire qu'elles possèdent elles aussi plusieurs EF-hands capables de lier le Ca^{2+} mais elles présentent cependant des variations de séquence et une plus grande diversité que la CaM. Ainsi, toutes les CaMs ont une séquence de 149 acides aminés tandis que les séquences des CMLs varient entre 80 et 318 acides aminés (McCormack & Braam, 2003; Zhu *et al.*, 2015). Également, les CMLs ont entre une et six EF-hands alors que les CaMs en ont toutes quatre. 31 des 50 CMLs d'*Arabidopsis* possèdent également quatre EF-hands, seules CML1 n'en possède qu'une et CML12 en possède six (McCormack *et al.*, 2005).

Encore peu d'informations sont disponibles sur l'affinité de liaison du Ca^{2+} aux CMLs ou encore sur les changements conformationnels induits par la liaison du Ca^{2+} à ces protéines. A l'heure actuelle, aucune structure cristallographique n'a été produite pour les CMLs, qu'elles soient liées au Ca^{2+} ou non. Seule la structure 3D de la partie N-terminale de CML34 obtenue par RMN est disponible sur PDB (« Protein Data Bank » code 1TIZ) (Song *et al.*, 2004). Contrairement aux isoformes de la CaM, il existe chez les CMLs une grande variabilité dans les séquences et

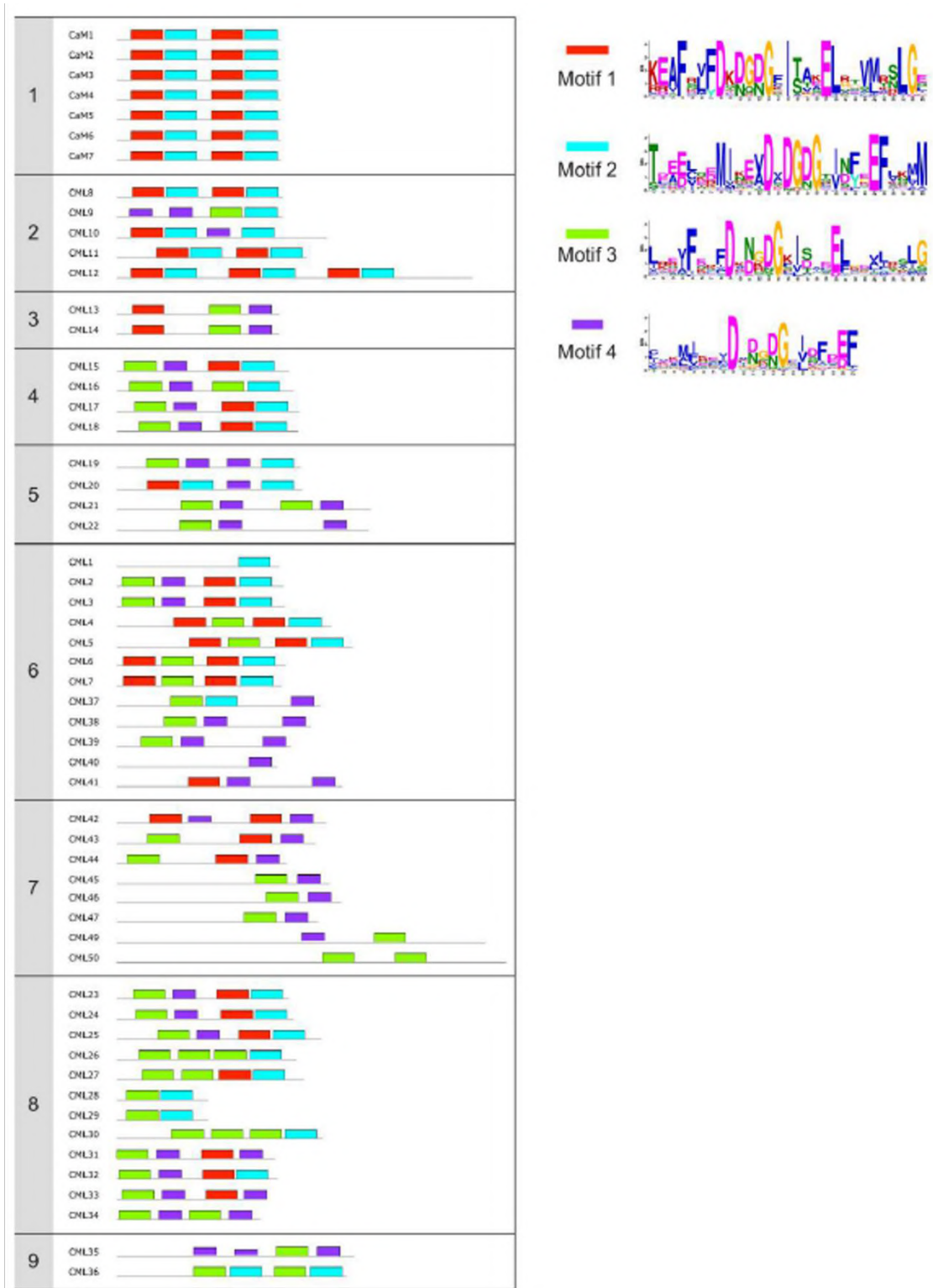


Figure 12. Composition des motifs EF-hand des protéines CaM et CML d'Arabidopsis. Les motifs conservés ont été identifiés à l'aide de la suite Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) (<http://meme-suite.org/tools/meme>) avec des paramètres de recherche standard, un maximum de quatre motifs et une largeur de motif optimale entre six et 29 acides aminés. Chaque couleur représente un motif pour lequel la séquence correspondante LOGO est indiquée sur le côté droit du panneau. Les sept protéines CaMs et les 50 CMLs sont regroupées en neuf groupes (La Verde *et al.*, 2018a).

l'organisation des EF-hands. En effet, deux motifs qui n'existent pas chez la CaM sont présents chez les CMLs. Ces variations dans les séquences protéiques ne sont pas sans conséquence. Par exemple, le second domaine EF-hand de CML17, CML22, CML25 et CML33 contient un résidu lysine en position 3, 6 et 12 qui est chargé positivement alors que, chez la CaM, ces positions sont occupées par des résidus chargés négativement et qui sont essentiels pour pouvoir lier le Ca^{2+} . Chez de nombreuses CMLs, le glutamate en position 12 est souvent substitué par un résidu acide aspartique, ce qui altère la sélectivité de l'EF-hand du Ca^{2+} vers le Mg^{2+} (Gifford *et al.*, 2007; La Verde *et al.*, 2018a). La liaison du Ca^{2+} aux EF-hands peut également être altérée par les variations de position des EF-hands dans la séquence protéique. Toutes ces variations rendent plus flexibles la liaison du Ca^{2+} des CMLs, ce qui peut leur permettre d'avoir des réponses sur mesure à la variété des signaux qu'elles centralisent. De plus, de nombreuses CMLs (CML23, CML24, CML25, CML26, CML27, CML33, CML35, CML36, et CML37) possèdent une paire de cystéines qui peuvent former des ponts disulfures. Ces ponts disulfures affectent la structure protéique des CMLs modifiant ainsi la liaison à leurs cibles et permettant leurs dimérisations. Comme les EF-hands fonctionnent par paire, l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation de deux CMLs pourrait expliquer que certaines CMLs aient un nombre impair de motifs EF-hand (La Verde *et al.*, 2018a) (Figure 12).

Les CMLs ne semblent présenter aucun autre domaine fonctionnel connu que les EF-hands. Leur activité, comme celle de la CaM, passe donc probablement par la liaison à des protéines cibles. Le mécanisme de liaison de la CaM à ses cibles passe par le changement conformationnel induit par la liaison du Ca^{2+} aux EF-hands qui conduit la CaM à exposer dans sa nouvelle forme des domaines hydrophobes, notamment composés de nombreux résidus méthionines (Gifford *et al.*, 2007). Le pourcentage de méthionine trouvé chez les CMLs est très variable, allant de 0,9% à 8,6%. De plus, certaines CMLs telles que CML19, CML37, CML42 et CML43 (Dobney *et al.*, 2009; Bender *et al.*, 2014; Scholz *et al.*, 2014; La Verde *et al.*, 2018b) montrent un fort changement dans leurs propriétés hydrophobes après la liaison d'ions Ca^{2+} comme pour la CaM mais cela n'est pas le cas d'autres CMLs telles que CML15,

CML16 et CML36 (Astegno *et al.*, 2017; Ogunrinde *et al.*, 2017). Par exemple, une CML du tabac a été montrée comme interagissant avec ses cibles non pas par des liaisons hydrophobes comme la CaM mais grâce à des liaisons électrostatiques (Nakahara *et al.*, 2012; Makiyama *et al.*, 2016).

Contrairement à la CaM, encore peu de cibles des CMLs ont été identifiées et validées *in planta* mais parmi elles, une grande diversité de familles protéiques a été trouvée telles que des facteurs de transcription, des enzymes du métabolisme, des protéines de transport et des kinases. Les CMLs présentent une redondance fonctionnelle partielle et un chevauchement entre leurs cibles est donc possible (Ranty *et al.*, 2006, 2016; Aldon *et al.*, 2018). Un autre aspect important de la versatilité de fonction et de régulation des CMLs est la présence de sites potentiels pour des modifications post-traductionnelles. Ainsi, des sites de phosphorylations et de myristoylation ont été détectés (McCormack & Braam, 2003; Boonburapong & Buaboocha, 2007; Zhu *et al.*, 2015; Munir *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2017). La myristoylation est importante pour un ancrage à la membrane plasmique, ce qui pourrait être particulièrement décisif pour la fonction des CMLs notamment dans le déclenchement des réponses de défenses.

4) Les rôles physiologiques des CMLs chez les plantes

(a) Les CMLs au cours du développement

Les rôles de la large famille multigénique des CMLs ont pendant longtemps été méconnus. Depuis leur découverte lors du séquençage du génome d'*A. thaliana* en 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative), les études s'accumulent et démontrent l'importance des CMLs dans de nombreux processus physiologiques de la plante, que ce soit au cours du développement ou en réponse aux stress biotiques et abiotiques, notamment grâce à l'étude de leur expression et l'utilisation de mutants perte et gain de fonction des CMLs.

De cette façon, des plantes transgéniques KO pour *cml7* et *cml25* présentant des poils racinaires plus longs que les plantes sauvages indiquent un rôle pour

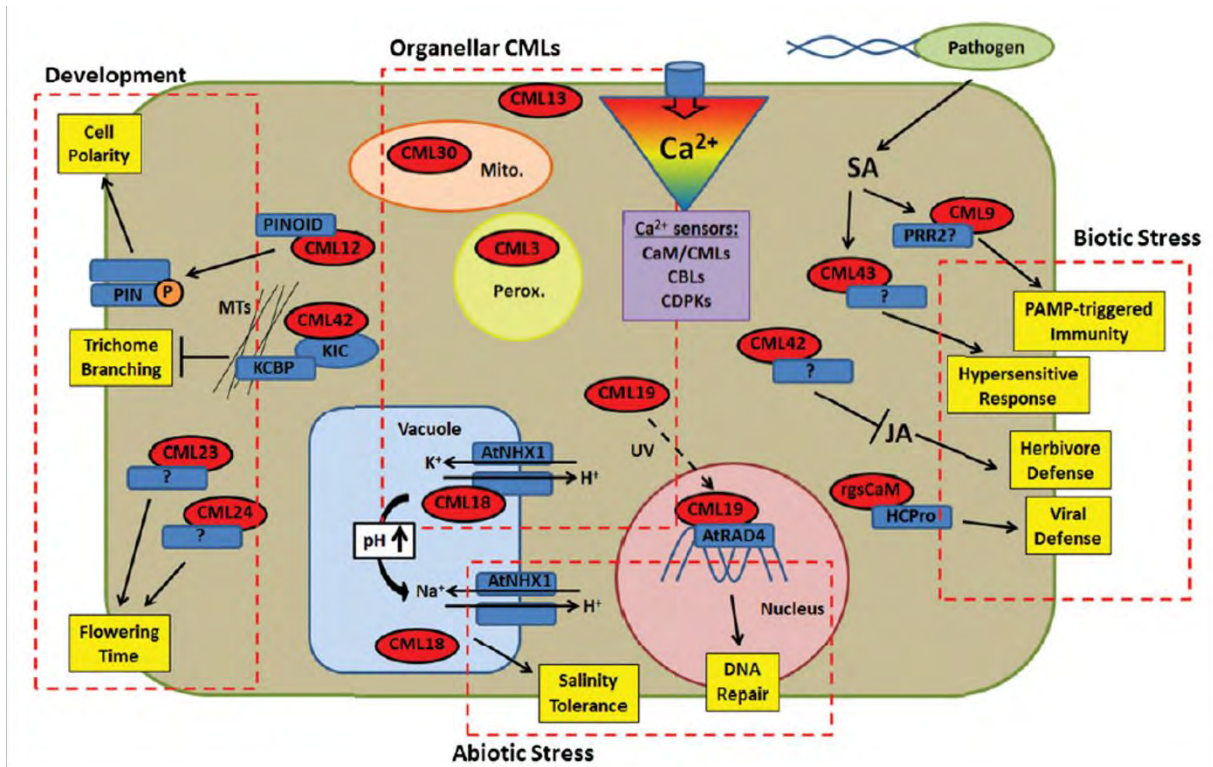


Figure 13. Représentation schématique des fonctions des CMLs dans les cellules végétales. Ce modèle affiche les rôles connus et hypothétiques (cadres en pointillés rouges) pour les CMLs dans le développement et la réponse au stress. Les CMLs sont réparties dans divers compartiments cellulaires et au moins une CML a été montrée comme étant relocalisée en réponse aux stimuli (CML19, flèche en pointillé). Le modèle s'inspire principalement d'études utilisant *Arabidopsis*, mais un rôle de la rgsCaM du tabac est également présenté. Les réponses physiologiques médiées par les CMLs sont affichées sous forme de cases jaunes. Pour de nombreuses CMLs, leurs cibles en aval (boîtes bleues) sont inconnues ou l'implication de cibles dans le processus n'est pas claire (indiqués par un point d'interrogation). Les flèches noires et émoussées indiquent respectivement une régulation positive ou négative (Bender & Snedden, 2013).

CML7 et CML25 dans la régulation de l'élongation des poils racinaires (Won *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2011). Les CMLs 23 et 24 ont également des fonctions redondantes dans la régulation de la transition florale. Le double mutant *cml23/cml24* possède des niveaux élevés d'acide nitrique qui sont responsables d'une induction de l'expression du « Flowering Locus C » résultant en une floraison tardive (Tsai *et al.*, 2007). Les CMLs sont des protéines multifonctionnelles impliqués dans divers processus. Ainsi, CML24 joue également un rôle dans la mécano-détection au niveau racinaire (Wang *et al.*, 2011) et dans la régulation de l'autophagie via son interaction avec la cystéine protéase ATG4b (Tsai *et al.*, 2012).

Le rôle des CMLs est aussi souvent révélé au travers de leurs interactants. Ainsi, la liaison de CML12 avec la Serine/Thréonine kinase PINOID inhibe son activité de phosphorylation des transporteurs d'efflux d'auxine PIN, influençant ainsi la polarité des cellules végétales (Benjamins *et al.*, 2003). CML42, quant à elle, interagit avec une protéine « Kinesin-like CaM-binding protein-interacting Ca²⁺-binding » KIC qui se lie à son tour à KCBP (« Kinesin-like CaM-binding motor protein ») au niveau des microtubules et régule son activité pour inhiber la ramification des trichomes. En effet, un mutant KO pour *cml42* possède des trichomes aberrants avec une ramification accrue (Dobney *et al.*, 2009) (Figure 13).

(b) Les CMLs au cours des stress abiotiques

Les CMLs jouent également des rôles majeurs dans l'adaptation des plantes à leurs environnements en condition de stress, notamment lors de stress abiotiques. Par exemple, la protéine vacuolaire CML18 chez *A. thaliana* est capable d'interagir avec la région C-terminale de l'antiporteur vacuolaire de Na⁺/H⁺ NHX1, qui est important pour la réponse de la plante au stress salin. Dans des conditions physiologiques où la concentration de Ca²⁺ est élevée et le pH bas, CML18 est lié à NHX1 et inhibe ainsi son activité. Mais dans des conditions de stress salin, le pH vacuolaire augmente, ce qui conduit CML18 à se désassocier de NHX1 permettant son activation et l'accumulation d'ion Na⁺ dans la vacuole (Yamaguchi *et al.*, 2005).

CML24 et CML12, aussi appelées TCH2 et TCH3 respectivement, sont induites lors d'un choc thermique par l'augmentation de la température de 24°C à 37°C (Braam, 1992). L'expression de CML24 est également induite lors de nombreux stress abiotiques tels que la sécheresse et le froid ainsi qu'en réponse à l'ABA et l'auxine (Delk *et al.*, 2005). Une autre CML induite en réponse à l'ABA, à la sécheresse et au stress salin est CML9. Des plantes KO *cm19* sont plus résistantes au stress salin et à la sécheresse comparées à des plantes sauvages, notamment par l'action de CML9 en tant que régulateur négatif des voies de signalisation de l'ABA (Magnan *et al.*, 2008). L'expression de CML37, CML38 et CML39 est aussi fortement induite par le stress salin et la sécheresse mais, contrairement à CML9, pas par l'exposition à l'ABA (Vanderbeld & Snedden, 2007).

L'exposition aux rayons UV peut causer des dommages importants à l'ADN des plantes si les cassures double-brin causées par ces radiations ne sont pas correctement réparées. Plusieurs CML sont impliquées dans ces processus de réparation de l'ADN telles que CML19 et CML42. Des mutants diminution et gain de fonction de *cm19*, aussi appelée « Centrin 2 », montrent respectivement une plus grande sensibilité aux UV-C et une meilleure réparation de l'ADN endommagé par rapport au sauvage (Molinier *et al.*, 2004). De plus, l'expression de *CML19* et sa localisation dans le noyau sont dépendantes des UV-C. Enfin, CML19 interagit avec la protéine « Radiation Repair 4 » (RAD4) qui est essentielle pour la réparation des dommages de l'ADN (Liang *et al.*, 2006). CML42 est également impliquée dans ces processus car un mutant KO de *cm42* est moins résistant aux rayons UV-B. En effet, seulement 4% des plantules *cm42* survivent après 1h d'exposition à des rayons UV contre 20% chez les plantules sauvages. Le mutant *cm42* produit aussi moins de cinq types de flavonols différents qui sont importants dans la protection contre les radiations UV-B (Vadassery *et al.*, 2012a) (Figure 13).

(c) Les CMLs au cours des stress biotiques

De plus en plus d'études confirment que les CMLs jouent aussi des rôles majeurs dans la résistance des plantes aux stress biotiques chez la plante modèle *A.*

thaliana mais également chez d'autres espèces végétales d'intérêt agronomique (Aldon *et al.*, 2018). Par exemple, la désactivation de la CML *APR134* chez la tomate supprime la HR en réponse à une souche avirulente de *Pst*. Dans le même temps, la surexpression de *CML43*, l'orthologue de *APR134* chez *Arabidopsis*, stimule la HR en réponse à cette même souche (Chiasson *et al.*, 2005). La surexpression de la CML de soja *SCaM4* entraîne une plus grande résistance de la plante à plusieurs phytopathogènes : l'oomycète *Phytophthora sojae* et deux champignons nécrotrophes *Alternaria tenuissima* et *Phomopsis longicolla* (Rao *et al.*, 2014). La surexpression de *SCaM4* et *SCaM5* dans le tabac est également responsable d'une meilleure résistance à de nombreux types de pathogènes différents tels que la bactérie *Pst*, l'oomycète *Phytophthora parasitica* et le virus TMV (« Tobacco Mosaic Virus ») (Heo *et al.*, 1999). Il a également été récemment identifié que la fermeture des plasmodesmes en réponse à la flagelline bactérienne est contrôlée par *CML41* localisée dans le plasmodesme. Le fait que cette CML, dont la transcription est induite par le PAMP *flg22*, favorise le dépôt de callose au niveau des plasmodesmes après un traitement à la flagelline montre que *CML41* agit comme un régulateur positif des défenses contre *Pst* (Xu *et al.*, 2017). Un mutant perte de fonction de *CML24* est diminué dans l'apparition de la HR ainsi que dans la synthèse de NO induite par les PAMPs lorsqu'il est inoculé par la bactérie avirulente *Pst avrRpt2* (Ma *et al.*, 2008).

Parfois, deux CMLs peuvent avoir des rôles antagonistes dans les réponses de la plante à une attaque de pathogène. Ainsi, *CML37* et *CML42* montrent des rôles opposés lors d'une infestation par les larves de l'insecte ravageur *Spodoptera littoralis*, *CML37* étant un régulateur positif de la résistance à cet insecte et *CML42* un régulateur négatif. Les larves de *Spodoptera littoralis* font preuve d'une meilleure performance alimentaire sur un mutant KO pour *cm137*, probablement liée à la réduction de l'expression et de l'activité enzymatique de *JAR1* (« Jasmonate Resistant 1 ») conduisant à une accumulation réduite du JA-isoleucine (Scholz *et al.*, 2014). De manière contrastée, ces mêmes larves montrent une prise de poids plus faible sur les feuilles du mutant *cm142* en comparaison avec le sauvage. Le mutant *cm142* montre également une accumulation importante de glucosinolates

aliphatiques et une induction des gènes de réponse au JA en réponse à des éliciteurs de *Spodoptera littoralis* (Vadassery *et al.*, 2012a). Un certain nombre de CMLs sont induites en réponse à des sécrétions orales de larves de *Spodoptera littoralis*, notamment CML11, CML12, CML16, CML17, CML23 et CML9 (Vadassery *et al.*, 2012b). CML9 a aussi été montré comme impliqué dans la résistance à la bactérie *Pst* en tant que régulateur positif. En effet, l'expression de *CML9* est induite en réponse au SA, à flg22 et à plusieurs souches avirulentes de *Pst*. La réduction de l'expression de *CML9* et sa surexpression sont responsables d'une plus grande sensibilité et résistance à *Pst*, respectivement. Cette contribution de CML9 à l'immunité végétale est dépendante de FLS2, le récepteur de la flagelline, et fonctionne via une altération de l'expression de *PR1* dans les lignées transgéniques *CML9* (Leba *et al.*, 2012) (Figure 13).

(d) Les CMLs au cours des stress combinés

L'ensemble de ces études ont démontré l'importance des CMLs dans de nombreux processus physiologiques de la plante, que ce soit au niveau du développement ou des réponses aux stress biotiques et abiotiques. Néanmoins, toutes ces études ont porté sur la caractérisation des réponses à plusieurs stress appliqués séparément en conditions contrôlées. Par exemple, chez *A. thaliana*, CML9 joue des rôles de régulateur négatif pour la réponse à un stress salin et positif pour la défense à *Pst* (Magnan *et al.*, 2008; Leba *et al.*, 2012). En revanche, alors que les CMLs jouent clairement un rôle central dans l'intégration d'une multitude de signaux environnementaux, très peu d'informations n'ont à ce jour parut sur la contribution des CMLs en réponse à des stress combinés. Pour un des rares exemples décrits, il a été montré que l'abondance de la protéine CML36 augmente dans des feuilles d'épinard (*Spinacia oleracea*) en réponse à une combinaison des stress abiotiques salin et cadmium (Bagheri *et al.*, 2015).

Pour la plupart des études, les résultats correspondent à des corrélations des phénotypes avec les génotypes mutants et peu de mécanismes démontrant le fonctionnement des CMLs ont été élucidés. Néanmoins, ces exemples démontrent

bien l'implication des CMLs dans de nombreux processus physiologiques, que ce soit le développement de la plante ou les réponses à des stress biotiques et abiotiques, indiquant que les CMLs peuvent être des protéines multifonctionnelles, c'est-à-dire des éléments centraux des voies de signalisation permettant l'intégration de nombreux signaux environnementaux par la plante. Les CMLs constituent une large famille de protéines mais peu de redondance fonctionnelle y est observé. En effet, même si des analyses d'expression montrent une induction commune à un stress, la plupart des mutants simples KO ou KD présentent des phénotypes. Par exemple, comme indiqué précédemment, les gènes *CML9*, *CML37*, *CML38* et *CML39* sont induits par le stress salin et la sécheresse mais seul *CML9* est induit par l'ABA (Vanderbeld & Snedden, 2007), indiquant que si ces quatre gènes sont impliqués dans la même réponse au stress, leurs mécanismes d'action sont très probablement différents.

Cette complexité qui permet la mise en place de réponses spécifiques à un stimulus donné peut donc venir de plusieurs facteurs : les signatures calciques, l'expression spatio-temporelle des senseurs de Ca^{2+} , leur localisation, les propriétés biochimiques des EF-hands comme l'affinité pour l'ion Ca^{2+} , et les différentes structures secondaires et tertiaires adoptées par les protéines après les liaisons au Ca^{2+} rendues possibles par la variabilité dans la longueur et la séquence des CMLs au niveau de la région « linker » comme des domaines N- et C-terminus (La Verde *et al.*, 2018a).

Partie III : Travaux antérieurs sur CML8 et objectifs de thèse

Les CMLs apparaissent donc importantes dans la mise en place des processus de réponses de la plante aux changements environnementaux. Dans l'équipe « Signalisation calcium et immunité végétale », plusieurs CMLs ont fait l'objet de travaux, notamment CML9. CML9 joue plusieurs rôles dans l'adaptation de la plante dont des rôles de régulateur positif des défenses contre des bactéries pathogènes et de régulateur négatif des réponses au stress de la sécheresse (Magnan *et al.*, 2008; Leba *et al.*, 2012). Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à une autre CML très proche de CML9 appartenant au même groupe, le groupe 2. Il s'agit de CML8, une CML d'une taille de 151 acides aminés et possédant quatre EF-hands (Day *et al.*, 2002). Elle présente 72,5% d'identité au niveau de sa séquence protéique avec la CaM2 (Luan *et al.*, 2002). L'expression de *CML8* chez *Arabidopsis* est également induite en réponse à un traitement SA et NaCl (Park *et al.*, 2010). Au niveau fonctionnel, CML8 est capable de compléter fonctionnellement un mutant CaM null dans la levure (Zielinski, 2002), confirmant donc son rôle dans la signalisation calcique.

Malgré sa forte identité avec la CaM, les cibles de CML8 ne sont pas forcément toutes communes avec elle. Par exemple, toutes les isoformes de la CaM interagissent avec CNGC20 via son domaine IQ mais ce n'est pas le cas de CML8 ni CML9 (Fischer *et al.*, 2013). En revanche, CML8 et CML9 sont capables d'interagir avec PRR2, un régulateur de réponse d'un système à deux composants impliqués notamment les voies de signalisation hormonales (Mizuno, 2005), mais pas CML10 ni les CaMs (Perochon *et al.*, 2010). Toutefois, les cibles de CML8 et CML9 ne sont pas toujours communes, expliquant l'absence de redondance fonctionnelle complète qui permet de visualiser des phénotypes avec des mutants simples de ces CMLs. Ainsi, CML8, tout comme tous les isoformes de la CaM mais contrairement à CML9, interagit avec PSKR1, le récepteur de la phytosulfokine (PSK), un récepteur LRR-kinase qui possède un site prédit de liaison à la CaM (Hartmann *et al.*, 2014). PSK est un peptide qui promeut l'élongation cellulaire (Hartmann *et al.*, 2013) et joue un rôle dans les interactions plante-microbes et l'immunité végétale (Loivamäki *et al.*, 2010; Mosher *et al.*, 2013). CML8 a été également démontré comme

interagissant *in vitro* avec le domaine de liaison à la CaM prédit dans la partie kinase d'un autre récepteur transmembranaire localisé à la membrane plasmique : le récepteur LRR-Serine/Thréonine kinase ZAR1 au même titre que la CaM1 (Yu *et al.*, 2016). Enfin, CML8 interagit avec le domaine cytoplasmique du récepteur kinase LRR-RLK transmembranaire aux BRs BRI1 dans *E. coli* et inhibe fortement son autophosphorylation et la phosphorylation d'autres protéines d'*E. coli*, tout comme les CaM6 et 7 mais contrairement aux CaM2 et 4 et à CML11 (Oh *et al.*, 2012). Cette interaction et régulation de BRI1 laisse supposer un rôle dans le développement de la plante et notamment au niveau de la signalisation hormonale.

Contrairement à la CaM typique dont l'expression est ubiquitaire, l'expression de *CML8* à travers la plante est plus spécifique. Ainsi, l'expression de *CML8* est détectée par RT-qPCR de manière faible dans les fleurs, les feuilles et les racines mais quasiment pas dans la tige et elle est absente des siliques (Zhu *et al.*, 2017). Parmi ces différents organes, *CML8* est le plus fortement exprimé dans les racines (McCormack *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2017). Une analyse spatiale grâce à des plantes transgéniques *promoteur CML8::GUS* a permis de définir de façon plus fine l'expression de *CML8*. Au niveau aérien, *CML8* est exprimé dans des structures spécialisées : les cellules de garde des stomates, ainsi que dans le réseau vasculaire des feuilles adultes et de l'hypocotyle d'une plantule. Un marquage GUS est également visible au niveau des anthères des fleurs. Enfin, dans les racines, l'expression de *CML8* est confinée à l'émergence des racines latérales (Zhu *et al.*, 2017). Ce niveau basal relativement faible de l'expression de *CML8* peut être indicatif d'un gène spécifiquement induit en réponse aux variations de l'environnement. Ainsi, Goda *et al.* (2004) ont montré que *CML8* est induit par un traitement aux brassinolides. De manière concordante, un traitement BRs semble induire l'expression de *CML8* de façon rapide et transitoire à trois heures et six heures après traitement mais cette induction disparaît 24 heures après traitement. Cela est également le cas pour des traitements GA et ET. Un traitement SA ne semble induire l'expression de *CML8* que trois heures après traitement (Zhu, 2016), en concomitance avec les données rapportées par Park *et al.* (2010). L'expression de *CML8* est également induite par l'auxine, non seulement au niveau des primordia

des racines latérales, mais également au niveau du cortex et de l'endoderme de la racine primaire. *CML8* semble donc impliqué dans la formation et le développement des racines latérales de manière auxine-dépendante dans la mesure où, en absence d'auxine, aucun phénotype anormal de plantes sous- et sur-exprimant *CML8* par rapport aux plantes WT n'est détecté et que toutes les lignées se comportent de manière uniforme. En revanche, en présence d'auxine, les lignées sous- et sur-exprimant *CML8* présentent moins et plus de racines latérales que les plantes sauvages, respectivement. Ces résultats suggèrent donc que l'induction de l'expression de *CML8*, de manière auxine-dépendante, participe à la formation des racines latérales (Zhu, 2016). *CML8* est également induit en réponse à des pathogènes. En effet, *CML8* est fortement exprimé lors d'une inoculation avec *Pst* et est un régulateur positif des réponses de défenses de la plante à une infection par *Pst* (Zhu et al., 2017).

Comme décrit précédemment, l'expression racinaire de *CML8* est localisée à l'émergence des racines latérales (Zhu et al., 2017). Le processus d'émergence des racines latérales a un fort impact sur l'intégrité de la racine primaire. En effet, des interstices dans la structure de la racine primaire s'ouvrent sur le passage des racines secondaires (Péret et al., 2009). Ces émergences vont donc constituer un point d'entrée de la bactérie pathogène *Rs* du sol vers la plante. La question s'est donc posée d'étudier la contribution de *CML8* en réponse à une infection par cette bactérie. Sachant que ces émergences sont aussi le lieu d'accumulation de l'auxine endogène de la plante et que *CML8* semble impliquée dans le contrôle de l'émergence des racines latérales d'une manière auxine-dépendante, nous avons aussi choisi de nous intéresser aux processus d'infection de *Rs* en nous concentrant sur le rôle de l'auxine dans ces processus. En effet, il est connu que de nombreux agents pathogènes produisent des phytohormones pour perturber les voies de signalisation végétale tels que l'oomycète *Pythium oligandrum* (Le Floch et al., 2003) ou la souche bactérienne *Pst* (McClerklin et al., 2018). À la suite du séquençage du génome de *Rs* (Salanoubat et al., 2002), il a été établi que la bactérie possédait un ensemble de gènes suffisants pour synthétiser l'auxine. Cependant, ni

la production d'auxine, ni son rôle dans la virulence de *Rs* n'ont été démontrés à ce jour.

Le projet de ma thèse est donc de préciser la fonction de CML8, et ses liens avec l'auxine, dans l'interaction entre *A. thaliana* et *Rs*, afin de mieux appréhender les mécanismes déployés par la bactérie pour infecter la plante en manipulant des acteurs végétaux, soit protéiques tel CML8, soit hormonaux tel l'auxine, ainsi que de mieux caractériser le rôle de CML8 qui fait partie d'une famille multifonctionnelle. Si CML9 a été démontré dans l'équipe comme important dans les réponses à la fois à des stress biotiques ou abiotiques, CML8 semble être l'une des rares CMLs démontrées à fonctionner dans les réponses de défenses à de multiples pathogènes. Au cours de ma thèse, deux objectifs ont donc été travaillés :

- le premier objectif a été d'identifier les mécanismes moléculaires dépendants de CML8 contrôlant la réponse de défense de la plante à *Rs* par une approche de RNA-sequencing afin d'identifier les gènes et réseaux de gènes sous le contrôle de CML8 mais également d'évaluer l'importance de la résistance médiée par CML8 face à d'autres pathogènes et lors de stress combinés (une infection par *Rs* et une élévation de la température simultanée).

- le deuxième objectif était d'identifier la ou les voies de biosynthèse de l'auxine chez *Rs* et de déterminer le rôle de l'auxine produite par la bactérie au cours de l'interaction avec la plante, et le rôle de CML8 dans ces processus dans la mesure où CML8 contrôlerait des processus développementaux de façon auxine-dépendante.

CHAPITRE 2

RÉSULTATS

Partie I : Article Zhu, Mazard *et al.* (2021) « The same against many: AtCML8, a Ca²⁺ sensor acting as a positive regulator of defense responses against several plant pathogens »

1) Avant-propos

Lors de travaux antérieurs, il a été montré que CML8 est un régulateur positif des défenses à la bactérie pathogène *Pst* (Zhu *et al.*, 2017). Dans notre étude acceptée pour publication dans IJMS (« International Journal of Molecular Sciences »), nous montrons une caractérisation affinée du patron d'expression de *CML8* qui a révélé que *CML8* a une expression majoritairement au niveau des racines et plus particulièrement lors des premières étapes de l'émergence des racines latérales. Ces données nous ont amené à étudier dans un premier temps son rôle dans la réponse de la plante à une bactérie pathogène tellurique, *Rs*. Puis, pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires contrôlés par CML8 dans les réponses immunitaires, une analyse du transcriptome par RNA-sequencing a permis d'identifier des gènes exprimés ou réprimés précocement dans les racines des lignées d'*Arabidopsis* sous- et sur-exprimant *CML8* à la suite de l'inoculation par *Rs*. Les résultats obtenus nous ont ensuite conduit à évaluer la contribution de CML8 dans les interactions avec d'autres pathogènes ayant des modes de vie différents de *Rs*, comme la bactérie phytopathogène vasculaire aérienne *Xcc* et l'oomycète racinaire *Phytophthora capsici* (*Pc*).

Les données antérieures à notre étude ont été produites au cours de la dernière année de thèse de Xiaoyang Zhu (Zhu, 2016). J'ai poursuivi cette étude pendant mon doctorat avec le soutien d'Eugénie Robe, de Sarah Pignoly, d'Hélène San Clemente, de Marielle Aguilar du LRSV et d'Emmanuelle Lauber du LIPME. Les résultats principaux ont fait l'objet du manuscrit présenté ci-après accepté en septembre 2021 dans le journal à comité de lecture IJMS.

2) Article Zhu, Mazard *et al.* 2021

Les informations supplémentaires sont disponibles en ligne sur le site d'IJMS.



Article

The Same against Many: AtCML8, a Ca²⁺ Sensor Acting as a Positive Regulator of Defense Responses against Several Plant Pathogens

Xiaoyang Zhu ^{1,2,†}, Julie Mazard ^{2,3,†}, Eugénie Robe ², Sarah Pignoly ², Marielle Aguilar ², Hélène San Clemente ², Emmanuelle Lauber ³, Richard Berthomé ^{3,*} and Jean-Philippe Galaud ^{2,*}

¹ College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

² Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse INP, 24, Chemin de Borde Rouge, 31320 Auzeville-Tolosane, France; xiaoyang_zhu@scau.edu.cn (X.Z.); julie.mazard@lrsv.ups-tlse.fr (J.M.); robe@lrsv.ups-tlse.fr (E.R.); sarah.pignoly@gmail.com (S.P.); marielle.aguilar@lrsv.ups-tlse.fr (M.A.); sancle@lrsv.ups-tlse.fr (H.S.C.)

³ Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes-Environnement, Université de Toulouse, INRAE, CNRS, 31326 Castanet-Tolosan, France; emmanuelle.lauber@inrae.fr

* Correspondence: richard.berthome@inrae.fr (R.B.); galaud@lrsv.ups-tlse.fr (J.-P.G.); Tel.: +33-561-28-53-21 (R.B.); +33-534-32-38-28 (J.-P.G.)

† These authors have contributed equally to this work.



Citation: Zhu, X.; Mazard, J.; Robe, E.; Pignoly, S.; Aguilar, M.; Clemente, H.S.; Lauber, E.; Berthomé, R.; Galaud, J.-P. The Same against Many: AtCML8, a Ca²⁺ Sensor Acting as a Positive Regulator of Defense Responses against Several Plant Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10469. <https://doi.org/10.3390/ijms221910469>

Academic Editor: Zhixiang Chen

Received: 19 July 2021

Accepted: 24 September 2021

Published: 28 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Calcium signals are crucial for the activation and coordination of signaling cascades leading to the establishment of plant defense mechanisms. Here, we studied the contribution of CML8, an Arabidopsis calmodulin-like protein in response to *Ralstonia solanacearum* and to pathogens with different lifestyles, such as *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Phytophthora capsici*. We used pathogenic infection assays, gene expression, RNA-seq approaches, and comparative analysis of public data on CML8 knockdown and overexpressing Arabidopsis lines to demonstrate that CML8 contributes to defense mechanisms against pathogenic bacteria and oomycetes. CML8 gene expression is finely regulated at the root level and manipulated during infection with *Ralstonia*, and CML8 overexpression confers better plant tolerance. To understand the processes controlled by CML8, genes differentially expressed at the root level in the first hours of infection have been identified. Overexpression of CML8 also confers better tolerance against *Xanthomonas* and *Phytophthora*, and most of the genes differentially expressed in response to *Ralstonia* are differentially expressed in these different pathosystems. Collectively, CML8 acts as a positive regulator against *Ralstonia solanacearum* and against other vascular or root pathogens, suggesting that CML8 is a multifunctional protein that regulates common downstream processes involved in the defense response of plants to several pathogens.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; calcium signaling; calmodulin-like protein; multi-pathogens; plant immunity; *Ralstonia solanacearum*; *Phytophthora capsica*; *Xanthomonas campestris*

1. Introduction

In their environment, plants have to face many constraints in order to carry out their development and reproduction cycles. These stressful conditions induce on the plant varied responses depending on the biotic and abiotic stimuli detected [1,2]. Crop losses worldwide due to these stresses are estimated at hundreds of billions of dollars every year [3]. Moreover, in the context of global changes, climatic scenarios predict their increase due to more frequent and severe epidemics [4,5].

Plant defense mechanisms against a limited number of pathogens have been extensively studied. They depend on physical responses that involve specific structures, such as the plant cell wall or the presence of the cuticle, and two layers of immune responses. The first layer involves pathogen-associated molecular patterns (PAMP) recognition by plant cell surface receptors, initiating a signaling cascade leading to the PAMP-triggered

immunity (PTI). PTI confers a basal resistance level to a broad spectrum of pathogens. To overcome PTI, some pathogens produce effectors that interfere with host defense responses. Such effectors can be recognized by intracellular resistance proteins which activate the second layer of plant defense, called the effector-triggered immunity (ETI) [6], which often restricts further spread of the pathogen through a localized programmed cell death [7]. Rather than being composed of distinct layers of defenses, plant resistance has been suggested to be a continuum between PTI and ETI, with each layer sharing components and having been demonstrated to influence each other [8,9]. The more complex nature of plant immunity is illustrated by the diversity of defense response phenotype observed in natural and field conditions [10,11] and the recent study of the genetic basis of quantitative disease resistance (QDR) suggests that this phenomenon is explained by a polygenic architecture [12,13].

The increase of calcium (Ca^{2+}) concentration in the cytosol is one of the earliest responses induced upon perception of a pathogen by plants [14,15]. It has been proposed to be responsible for the coordination and activation of signaling cascades leading to the establishment of appropriate cellular responses [16,17]. Indeed, the application of lanthanum, an inhibitor of Ca^{2+} influx, suppresses plant response linked to the resistance gene *RPM1* during an infection with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) [18]. If complex spatiotemporal patterns of Ca^{2+} influx (frequency, amplitude, duration) within the cell are thought to encode information related to the initial stimuli, to become interpretable information, these Ca^{2+} variations need to be decoded by Ca^{2+} -binding proteins to produce the appropriate responses. Interestingly, plants have a large repertoire of specific Ca^{2+} sensors such as the calmodulin (CaM), Ca^{2+} -dependent protein kinases (CDPKs), the calcineurin-B-like (CBLs) and the calmodulin-like (CMLs) proteins, indicating that plants possess specific Ca^{2+} signaling components [19–21].

While CMLs are related to the typical CaM, their physiological roles remain mostly unknown [17]. In Arabidopsis, there are 50 CMLs that all contain Ca^{2+} EF-hand binding motifs but no other known functional domain. Interestingly, genetic approaches showed that CMLs are involved in abiotic and/or biotic stress responses. For example, the vacuolar AtCML18 is able to interact with the Na^+/H^+ antiporter AtNHX1 to regulate plant response to salt stress [22]. The plasmodesmal-localized CML41 promotes callose deposition at the plasmodesmata level following flagellin perception, showing that CML41 acts as a positive regulator of defense against *Pst* [23]. The Arabidopsis CML9 has a dual role and acts either as a negative regulator of responses linked to ABA and drought [24] or as a positive regulator of responses to *Pst* through the PTI flg22-dependent pathway [25]. All these data indicate that CMLs do not have total functional redundancy and could act as part of signaling crosstalk to coordinate plant responses to multiple environmental stresses by being positive and/or negative regulators [24].

More recently, it was shown that CML8, closely related to CML9, is also a positive regulator of plant immunity against the leaf mesophyll pathogen *Pst* [26]. Unlike to CML9, CML8 gene is preferentially transcribed at the root level. This raises the question of its putative involvement in plant responses to other pathogens and particularly for soilborne pathogens. To answer this question, the contribution of CML8 to plant defense was analyzed following infection by the bacterium *Ralstonia solanacearum* (*Rs*). *Rs* is a major phytopathogenic bacterium, present in the soil, that attacks more than 200 plant species in tropical, subtropical, and warm temperate areas worldwide [27]. *Rs* infects the plant at the emergence site of the lateral roots (LRs) and root tips [28], then invades the xylem vessels to spread towards the aerial parts of the plant through the vascular system and cause plant wilting [29,30].

In this work, we show that CML8 expression is tightly regulated at the root level and manipulated by *Rs* during the early steps of infection. Using CML8 overexpressing and knockdown transgenic lines, we show that overexpression of CML8 confers a resistance to this bacterium. To elucidate the molecular mechanisms controlled by CML8 in the early stages of plant response to *Rs*, genes differentially expressed at the root level within the first

hours of infection were identified, using an RNA-sequencing (RNA-seq) strategy. Interestingly, the inoculation of *CML8* transgenic lines with other pathogenic microorganisms with different lifestyles and the study of the expression profiles of our top list of differentially expressed genes (DEGs) strongly suggest *CML8* and downstream actors as core elements of the plant defense response to several pathogens.

2. Results

2.1. *CML8* Gene Expression Is Finely Tuned during LR Development and Exogenous Hormones Application

The expression of *CML8* throughout the whole plant had previously been explored by Zhu et al. [26] and showed that *CML8* highest level of expression was found in the LRs, compared with other plant tissues. To investigate *CML8* root-expression pattern more deeply, we focused on the eight developmental stages of LR formation as defined in Arabidopsis by Casimiro et al. [31], using *promoter CML8::GUS* reporter transgenic lines (Figure 1).

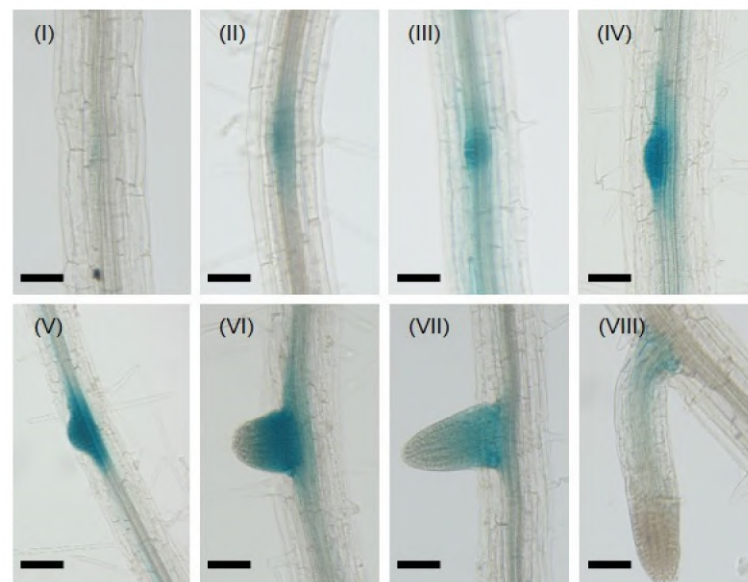


Figure 1. *AtCML8* is transiently expressed during lateral root formation. GUS activity staining was observed on seven days-old *promoter CML8::uidA* transgenic Arabidopsis seedlings. (I) to (VIII) photos correspond to the eight developmental stages as described in [31]. Bars: 50 μ m.

CML8 expression was first observed at the first stage of the LR formation process when two pericycle founder cells located next to the xylem started to divide. Then, gradually increasing GUS staining was visible when the cells forming the LR primordium actively divided asymmetrically and expanded radially towards the endodermis. GUS staining was most intense during stages IV and V of LR formation when the LR primordium had broken through first the endodermis, then cortical cells, but not yet through the epidermal layer. As soon as the LR emerged from the epidermis, *CML8* expression stayed confined to the LR emergence while the LR continued to grow. *CML8* expression was not detected in primary roots and in root tips, showing that it is limited to the early stages of LR formation. LR emergence is a process that greatly impacts the primary root structure and integrity and leaves gaps around its sites that become entry points for pathogens inside the plant [32]. As LR initiation is controlled by auxin, *CML8* gene expression was analyzed following exogenous auxin application (IAA, 1 μ M) using *promoter CML8::GUS* reporter transgenic lines (Supplementary Materials, Figure S1) after 3 h, 6 h, and 24 h. In the conditions tested, no evidence indicated that *CML8* gene expression was induced or repressed by IAA. We next analyzed *CML8* expression in response to other hormones, including 1-Aminocyclopropanecarboxylic acid (ACC; ethylene precursor), brassinosteroids (BR),

salicylic acid (SA), gibberellic acid (GA), methyl jasmonate (MJ), and GR24 (strigolactone analog), in similar conditions to those used for auxin (Supplementary Materials, Figure S1). As with IAA, ABA and MJ did not modify *CML8* expression pattern and level, whereas ACC, BR, SA, and GA treatments slightly stimulated *CML8* expression in a rapid but transient manner. GR24, a strigolactone analog, seemed to activate *CML8* expression after 24 h. Collectively, these results showed that *CML8* gene expression is finely tuned during LR development and hormonal control in this process cannot be excluded.

2.2. *CML8* Gene Expression Increases in Roots Following *Rs* Inoculation

As *CML8* was shown to act as a positive regulator of plant defense responses against *Pst* [26], and considering that *CML8* expression was restricted to LR initiations that are considered an entry point for many plant soil pathogens, we investigated the contribution of *CML8* in response to the soilborne bacterium *Rs* [33]. Firstly, we analyzed the expression levels of *CML8* 6 h after inoculation with *Rs* GMI1000 WT strain using the promoter *CML8::GUS* reporter lines. As shown in Figure 2A, *Rs* inoculation strongly induces the expression of *CML8* mainly in the vascular tissues of roots and leaves that correspond to the multiplication areas of this vascular bacterium. We confirmed this data using RT-qPCR and showed that the expression of *CML8* is on average respectively 1.4-fold, 3-fold and 2.2-fold higher at 6 hpi, 12 hpi and 24 hpi following bacteria inoculation compared to control conditions. Increase of *CML8* expression is transient and decrease within 24 hpi (Figure 2B). Collectively, these results question a putative involvement of *CML8* in plant responses during the early stages of *Rs* infection.

2.3. *CML8* Acts as a Positive Regulator of the Plant Defense Responses Following *Rs* Inoculation

To investigate the role of *CML8* in the plant responses to *Rs*, we inoculated plants previously characterized for the down- (KD) and upregulation (OE2 and OE3) of *CML8* expression as well as the WT susceptible control [26]. Initially, to determine whether the *RRS1* gene could play a role in the *CML8*-related response to *Rs*, phenotyping was carried out with different strains of *Rs*, mutated in PopP2 or complemented with different forms of the PopP2 effector. No such involvement was uncovered, indicating that *CML8*-mediated responses lean more towards basal defense and PTI than ETI. It is the reason why the results presented in Figure 3 correspond to plants inoculated with the GRS100 *Rs* mutant strain, mutant harboring a mutation in PopP2, complemented with the native form of PopP2 and that behaves similarly to the WT strain GMI1000 (Supplementary Materials, Figure S2). The results, representative of three independent biological replicates, showed, even if the *CML8* KD was not always significantly different from WT, that wilting symptoms appeared faster, indicating it was more susceptible than the WT. By contrast, the OE transgenic lines always displayed less symptoms than WT in response to *Rs* inoculation during the whole experiment, these differences being significant (Figure 3A,B).

To elucidate if these discrepancies could be correlated to a defense response, the bacterial multiplication in planta was quantified (Figure 3C) on leaves at 6 dai when the difference in disease index was the greatest compared to the WT. Interestingly, bacterial growth was significantly decreased in all transgenic lines with the lowest multiplication observed in the OE2 line. Altogether, these data supported that the overexpression of *CML8* contributed to the plant resistance to *Rs*.

2.4. *Rs* Induces a Rapid and Progressive *CML8*-Dependent Transcriptional Reprogramming

To decipher the early molecular events depending on *CML8* that control the plant responses to *Rs*, the root transcriptome of KD, OE2, and WT plants inoculated or not with the bacterium at 6, 12, and 24 hpi was analyzed using an RNA-seq approach. A list of DEGs was established based on an FDR correction at 5% (Supplementary Materials, Table S1).

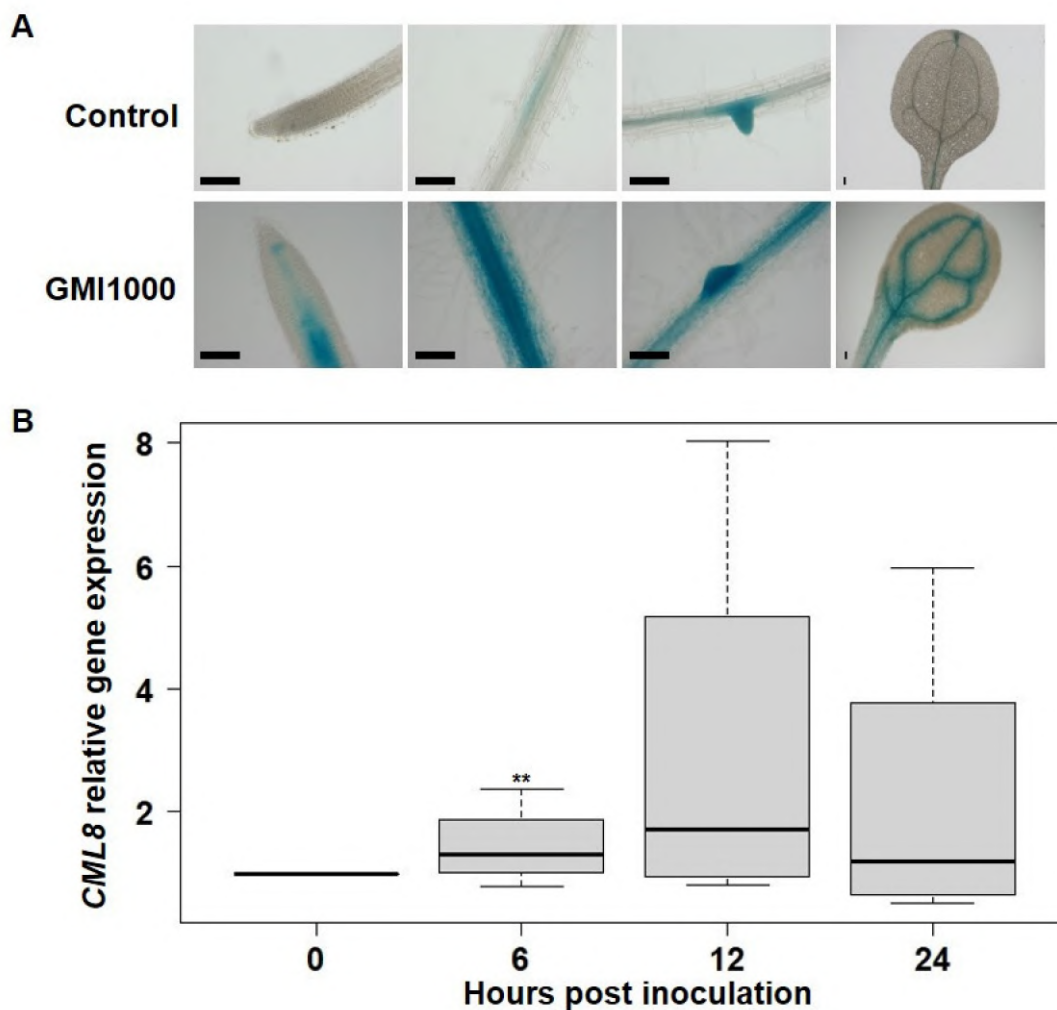


Figure 2. *CML8* gene expression is induced in response to *Rs* inoculation. (A) Expression pattern of *CML8* using eight days-old *promoter CML8::uidA* transgenic Arabidopsis plants. GUS staining was performed 6 h after 1.10^7 cfu.mL⁻¹ *Rs* GMI1000 strain or mock treatment (Control) inoculation. Bars: 100 μ m. (B) RT-qPCR analysis of *CML8* transcript levels in roots of Arabidopsis plants following inoculation with *Rs* GMI1000 strain. The expression level of *CML8* corresponds to the relative expression level compared to the *EF1- α* reference gene. This experiment was performed four times on three independent replicates. Statistical analyses were performed using Student's t-test and significant difference was found with *p*-values < 0.05 (** < 0.01).

Overall, with FDR at 5%, 151 DEGs were identified when compared to WT, with 63 and 92 genes in KD and OE2 lines, respectively (Supplementary Materials, Table S1, Figure 4A). The 3, 9, 56 DEGs and 6, 38, 89 were identified at 6, 12, and 24 hpi in *CML8* KD and OE2 lines, respectively (Supplementary Materials, Table S1) with up- or downregulated DEGs at each kinetic point presented in Figure 4B,C, respectively. Little overlap is observed between the DEGs lists identified in KD and OE2 lines (Figure 4A). Moreover, once induced or repressed at the first kinetic time point, a progressive increase of the down- or upregulation of these genes is observed, while being accompanied by the identification of new DEGs, leading to a greater number of DEGs at 24 hpi in KD (Figure 4B) as well as in OE2 (Figure 4C). To verify up- and downregulated DEGs, seven genes either induced or repressed at different kinetic time points were used for RT-qPCR experiments using specific primers (Supplementary Materials, Table S5). These genes were chosen according to their expression profiles and correspond to candidate genes detailed hereinafter. The RT-qPCR data (Supplementary Materials, Figure S3) were consistent with RNA-seq analysis.

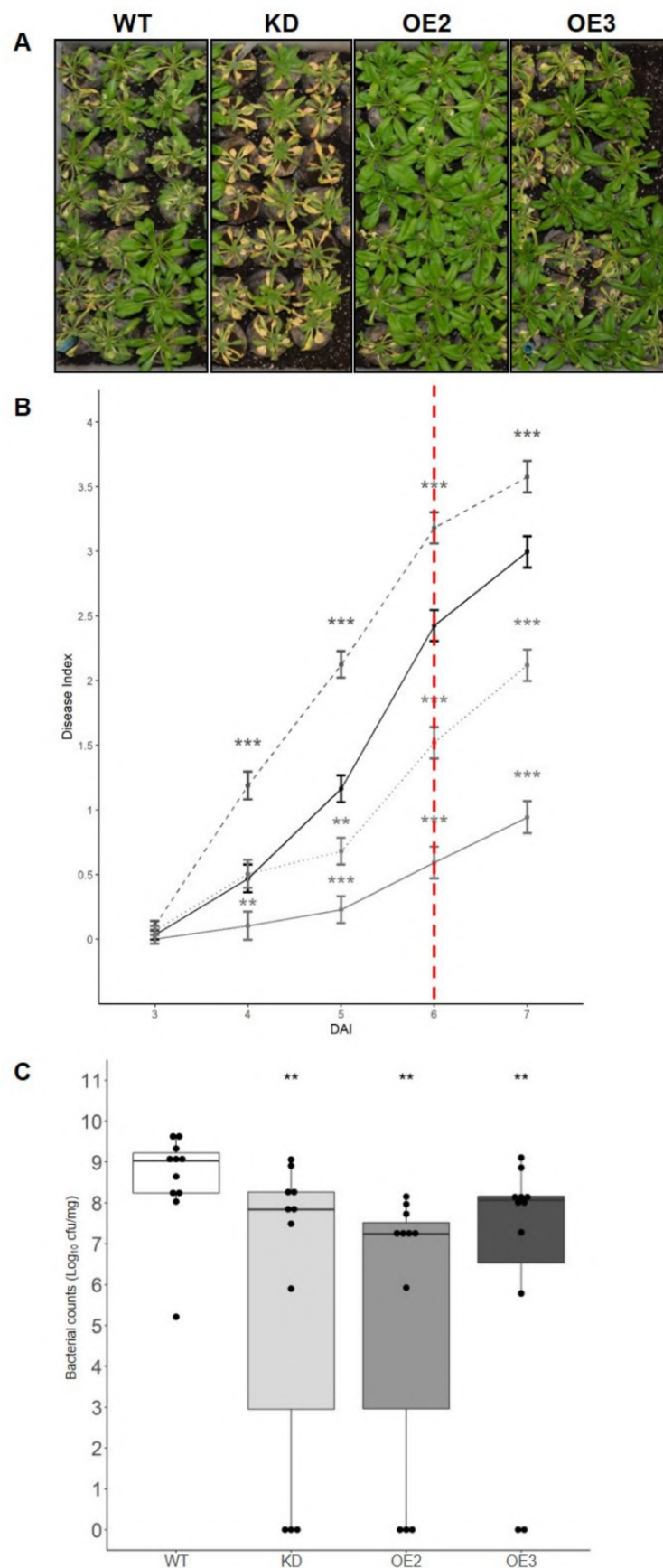


Figure 3. Comparative analysis of the susceptibility of *CML8* genotypes upon inoculation with *Rs* GRS100 strain that is deleted for the effector PopP2 complemented with PopP2. Cut roots of four weeks-old plants of WT, *CML8* KD line and OE lines were inoculated with a suspension of 1.10^7 cfu.mL⁻¹

of *Rs* GRS100 strain. (A) Photographs of disease symptoms were taken at nine dai. (B) Disease symptoms index are shown from three dai to seven dai. The solid black line, the dashed dark grey line, the solid grey line and the dashed light grey line represent WT, *CML8* KD, OE2 and OE3 lines, respectively. The red dotted line indicates the day when bacteria *in planta* quantification was done. Error bars = SEM were obtained from 69 inoculated plants in three independent biological replicates. (C) Quantification of *in planta* bacterial growth performed at six dai of *Rs* GRS100 strain complemented with PopP2 inoculation. Statistical analyses were performed as described in Materials and Methods section and significant difference was found with *p*-values < 0.05 (** < 0.001, *** < 0.01).

2.5. Molecular Pathways Activated or Repressed During *Rs* Infection in *CML8* Genotypes

We used the MAPMAN classification function to associate a function to the DEGs from the two lists and analyzed the co-expression or interaction networks in which they could be associated. With a 5% FDR correction, eight functional categories significantly overrepresented were identified in both KD and OE2 lines, corresponding to genes involved in cell wall, fermentation, miscellaneous, protein synthesis or degradation processes, hormone metabolism, stress response, and signaling (Figure 5).

Notably, while the genes assigned to these functional categories were not the same, or their expression was differentially regulated between transgenic lines, a greater number of genes involved in signaling and stress response processes were regulated in the *CML8* OE2 (Figure 5, Supplementary Materials, Table S1). Consistently, many induced genes are involved in defense response to pathogens, and in particular to *Rs*, such as *PAD4*, *EDS1*, and *EDS5*, as well as several genes coding for characterized NLRs, such as *SNC1* and *RPP1*. In addition, several genes also code for factors known or predicted to be involved in Ca²⁺ signaling, such as *CML41*, *CDPK22*, and *CRK17*. To assist in the selection of the most relevant candidate DEGs, we used the GeneMANIA Cytoscape app to construct the gene–gene functional interaction network from our list and identify the most-related genes (Supplementary Materials, Figure S4).

Based on the relevance of the functional category, the predicted function, and co-expression network, seven promising candidate genes were selected for further analyses. They corresponded to cell wall-related genes strongly induced in OE2 line and previously demonstrated to participate in host defense against pathogens: the plant natriuretic peptide A (PNP-A), also named *EGC2* (*At2g18660*), upregulated at 12 and 24 hpi, and the lipid transfer protein *LTP4.4* gene (*At5g55450*), induced at 6, 12, and 24 hpi [34,35]. These two genes were co-expressed with three other DEGs, the receptor-like protein *RLP41* (*At3g25010*), strongly upregulated in OE2 line, the nucleoside diphosphate protein *NUDT6* (*At2g04450*) and *XB3* ortholog 4 in *Arabidopsis thaliana* *XBAT34* (*At4g14365*), also highly induced in *CML8* OE2 plants at 12 and 24 hpi. *NUDT6* is important for SA-mediated immune responses through several resistance genes such as *NPR1* and *EDS1* [36]. *XBAT34* was highly similar to the SAR key regulators *NPR1* or *NIM1* and whose expression is repressed by *BAK1* [37]. As primary metabolism such as ethanol fermentation is often described to be altered during infection by soil pathogens [38], but also because this is one of the genes strongly repressed at 24 hpi in OE2 line, we selected *At4g33070* encoding the pyruvate decarboxylase *PDC1*. Finally, the *JAL23* (*At2g39330*) gene was retained because it encodes a protein belonging to the Jacalin lectin family, known to participate in the perception of many environmental signals [39], and is one of the most highly induced genes in KD line at 24 hpi.

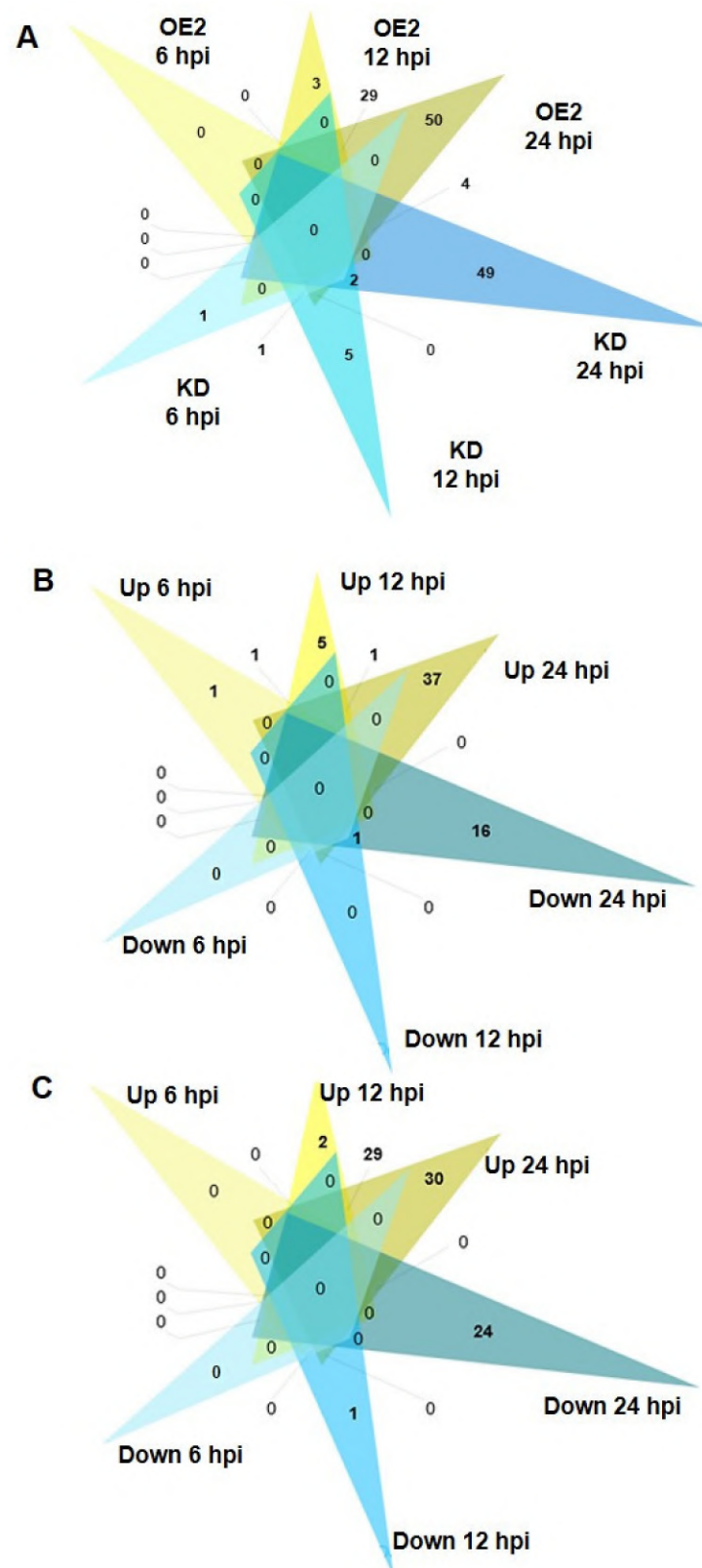


Figure 4. Number of differentially expressed genes in roots found specifically during an infection with *Rs* GMI1000 strain based on a 5% FDR. (A) Numbers in Venn diagrams indicate the number of DEGs found at each time point in the roots of *CML8* KD (blue color) and OE2 plants (yellow color) compared to WT plants. (B) Number of up- (yellow) and down-regulated DEGs (blue) in roots specific to each time point of the kinetic or overlapping between time point in KD line. (C) Number of up- (yellow) and down-regulated DEGs (blue) in roots specific to each time point of the kinetic or overlapping between time point in OE2 line.

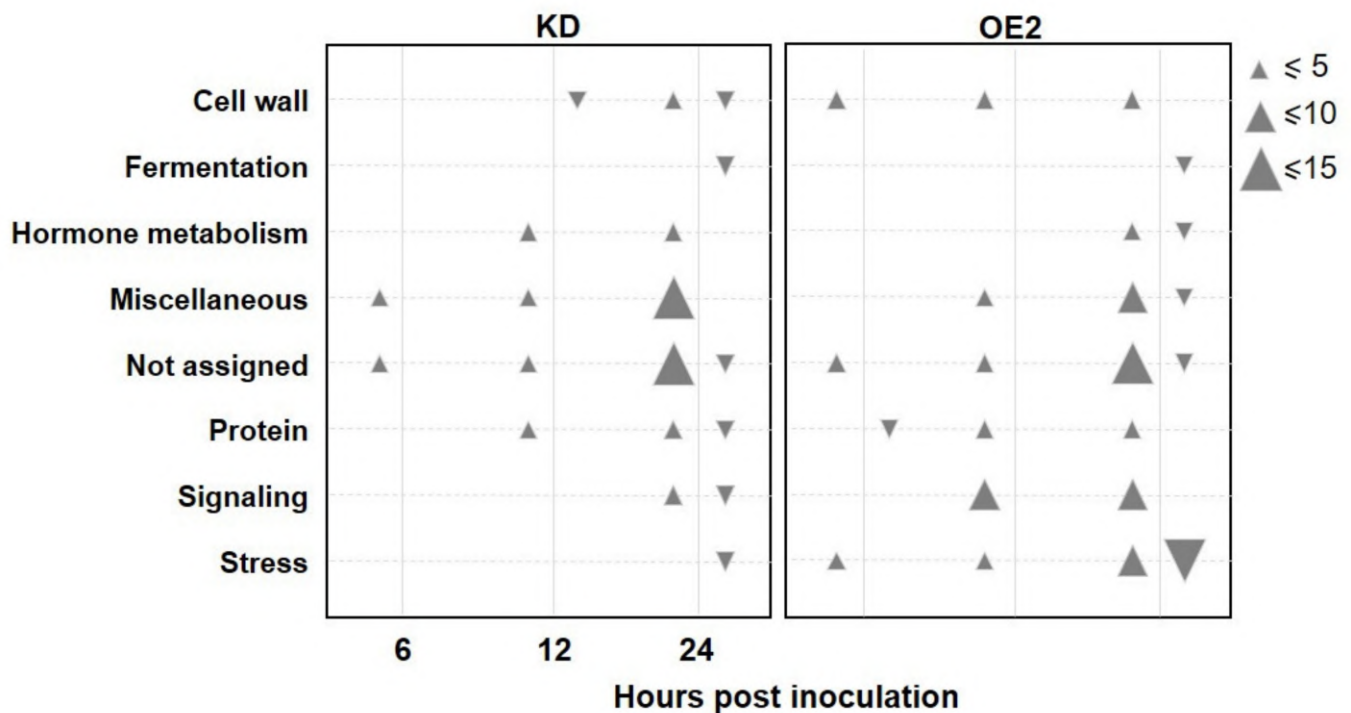


Figure 5. Functional categories significantly over-represented for CML8-dependent DEGs (Table S1) following *Rs* infection in *CML8* KD and OE2 lines, obtained with MapMan Classification Super Viewer. The down- and up arrows correspond to down-regulated DEGs and up-regulated DEGs, respectively. The size of triangle indicates the number of DEGs in each category.

2.6. Comparison with Publicly Available Transcriptomic Data

To determine if the list of 151 DEGs was specific to the plant response to *Rs* or had been identified more broadly in other experiments, it was compared (Supplementary Materials, Table S1) to publicly available transcriptome studies on abiotic and biotic perturbations and elicitor treatments performed either using microarray or RNA-seq approaches (Supplementary Materials, Figure S5). Using hierarchical clustering, similar expression patterns were found between the CML8-controlled genes and a majority of DEGs from the biotic subselection. For instance, the major part of the upregulated DEGs was also induced in studies where WT and mutant of genes involved in secondary metabolism or coding for signaling proteins and PTI actors (*rpp4*, *eds1*, *pad4*, *sid2*) are infected with various phytopathogens such as the necrotrophic fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Plectosphaerella cucumerina*, the biotrophic oomycete *Hyaloperonospora arabidopsidis*, and the bacterium *Pst*. Interestingly, a strong similarity was found between our genes list and a study looking at the roots transcriptomic response of *Arabidopsis* to the oomycete *Phytophthora parasitica* in the early stages of the infection [40]. Such an overlap between the biotic stress responses supported that our list of genes was part of the systematic host defense response to an infection with different pathogens and that CML8 may act as a hub to integrate environmental signal related to multiple living organisms. Furthermore, a strong correlation found with elicitor of plant defenses studies predominantly concerned PAMPs such as flg22 [41,42], elf18 [43], chitin [41], or oligogalacturonides known to be released upon *B. cinerea* infection [44], and LRR receptor kinases such as PEPR1/PEPR2 or BAK1 [43] involved in PAMPs perception. Together, this suggested that CML8-dependent plant response leaned more towards basal immunity. However, correspondence was less important with abiotic stress studies and no overall tendency was detected towards the developmental studies.

We then compared the DEGs lists with genes that participate in Ca^{2+} perception and signaling and to PTI and ETI regulation (Supplementary Tables S2–S4). Comparisons showed that numerous genes were shared and significantly enriched in Ca^{2+} actors and

genes regulated by Ca^{2+} signals [45], such as calreticulin, CMLs, CBLs, CDPKs, and CIPKs. Significant enrichment was also found with studies looking at PTI responses triggered by the hemibiotrophic oomycete *Phytophthora parasitica* [46], the biotrophic fungus *Golovonomyces orontii* [47], the hemibiotrophic fungus *Fusarium oxysporum* [48], and the bacterium *Pst* [49,50]. The highest percentages of overlap between studies (Supplementary Materials, Table S4) were observed with flg22, elf18, and oligogalacturonides PAMP treatments [43,51] that activate typical PTI responses such as signaling cascades involving CDKs, RLKs, WAKs, and MAPKs, SA signaling and camalexin accumulation, expression of marker genes such as *EDS1*, *PAD4*, and *PR1*, and cell wall modifications. Many signaling pathways are shared between PTI and ETI; one of these is the *EDS1* signaling pathway [52]. Consistently, we found a significant overlap between our list and studies looking at ETI responses such as defenses elicited by *Pst* avirulent genes *avrRpm1*, *avrRps4*, *avrRpt2*, and *avrPphB* [53,54], SA-independent *EDS1* signaling was implicated in resistance to biotrophic and hemibiotrophic pathogens [53] and the necrotrophic bacterium *Erwinia amylovora* [52].

A significant overlap was obtained between our DEGs lists and studies focused on *Rs* infections. Strikingly, while comparing with transcriptome data of leaves of four-week-old *Arabidopsis* root, inoculated at 6, 12, and 24 hpi and 5 and 8 dai [55], genes involved in basal resistance were found enriched at five dai but not at 12 and 24 hpi. This result could be explained by the fact that Hu et al. [55] used leaves to perform their analysis, while we used roots. We also found significant overlap with studies carried out on *Arabidopsis* secondary cell wall mutants that displayed enhanced resistance to *Rs*: the *wat1* mutant, in which the resistance is regulated by SA and indole metabolism and efficient against multiple pathogens including *Xcc* [56] and *irx5–5* and *irx1–6* secondary cell wall mutants [57]. We noted that 27% and 35% of KD and OE2 DEGs, respectively, were the same as DEGs identified in roots of seven-day-old seedlings 96 h after being in vitro infected by *Rs* [58]. A significant overlap was also observed in *Arabidopsis* WT and *rrs1–1* mutants at 2, 4, 6, and 8 h after the leaves were infiltrated by *Pseudomonas* delivering, through its type III secretion system, the PopP2 effector, known to induce ETI when perceived by the immune receptor pair RSP4/RRS1-R [59]. Expectedly, our comparisons clearly show that our results are representative of a plant response to *Rs*.

Finally, given the expression profile of *CML8* in the roots, we compared the DEGs list with sets of genes specifically regulated in different root tissues [60–62]. Even though overlaps between lists were not significant, some genes were also found to be specifically expressed in the root cortex, pericycle, phloem pericycle, phloem companion cells, quiescent center, and endodermis [63]. Not surprisingly, these results also support that some genes identified in our study are involved in root-specific processes (Supplementary Tables S2–S4) and were consistent with the ones obtained using the Genevestigator database, where a small correspondence with abiotic stress studies and no overall tendency towards the developmental studies was detected (Supplementary Materials, Figure S5).

2.7. *CML8* also Participates in Other Foliar and Root Micro-Organisms Plant Defense Responses

As shown here, and by Zhu et al. [26], *CML8* is involved in the defense responses against two different types of bacteria, *Rs* and *Pst*, respectively, that have different lifestyles and infection modes. Considering the transcriptomic data and to determine if *CML8* could be a common regulator in plant immune responses against various pathogens, the *CML8* genotypes were challenged by the aerial vascular biotrophic bacterium *Xcc* and the soil hemibiotrophic oomycete *Pc*. After inoculation with *Xcc* $\Delta xopAC$ strain, the disease symptoms (Figure 6A,B) appeared more rapidly in the *CML8* KD genotype compared to WT plants and *CML8* OE2 line as it was already observed following *Pst* [26] and *Rs* (Figure 3B) inoculations. In planta bacteria quantification clearly showed that bacteria growth was significantly higher in KD compared to WT (Figure 6C), indicating that *CML8* acts as a positive regulator of defense responses following *Xcc* infection.

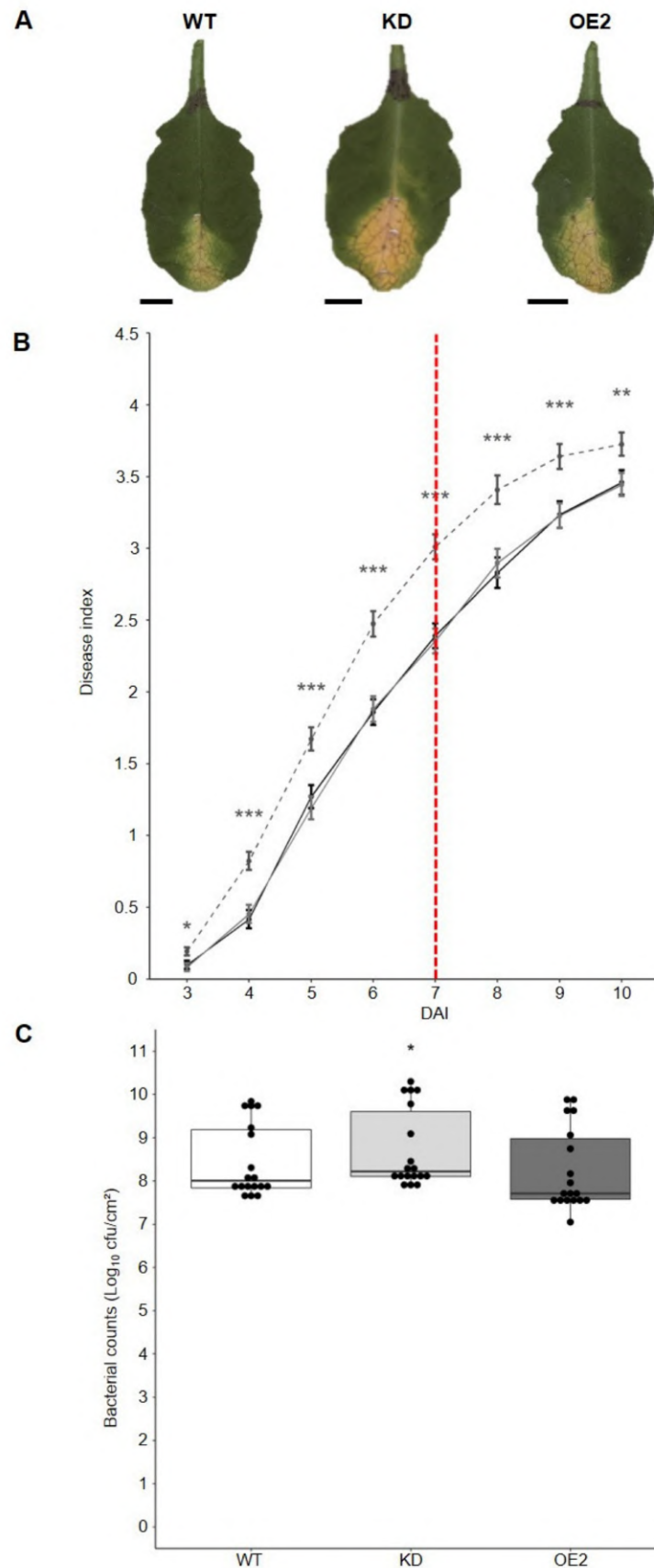


Figure 6. Comparative analysis of the susceptibility of *CML8* genotypes upon *Xcc* inoculation. **(A)** Photographs of disease symptoms were taken seven days after inoculation and represent the genotype's average response to the inoculation. Bars: 0.5cm. **(B)** *Xcc* strain 8004 $\Delta xopAC$ (10^8 cfu.mL⁻¹) was inoculated by piercing onto *CML8* transgenic lines leaves. Disease index was scored from three to

ten days after inoculation. Error bars = SEM were obtained from at least 24 inoculated leaves from six plants in four independent biological replicates. The red dotted line indicates the day when bacteria *in planta* quantification was performed. The solid black line, the dashed grey line and the solid grey line represent WT, *CML8* KD and OE2 lines, respectively. (C) Quantification of *in planta* bacterial growth was performed seven dai of *Xcc* strain 8004 $\Delta xopAC$ infection for WT, *CML8* KD and OE2 lines. Statistical analyses were performed as described in Materials and Methods section and significant difference was found with *p*-values < 0.05 (**< 0.001, ** < 0.01, * < 0.05).

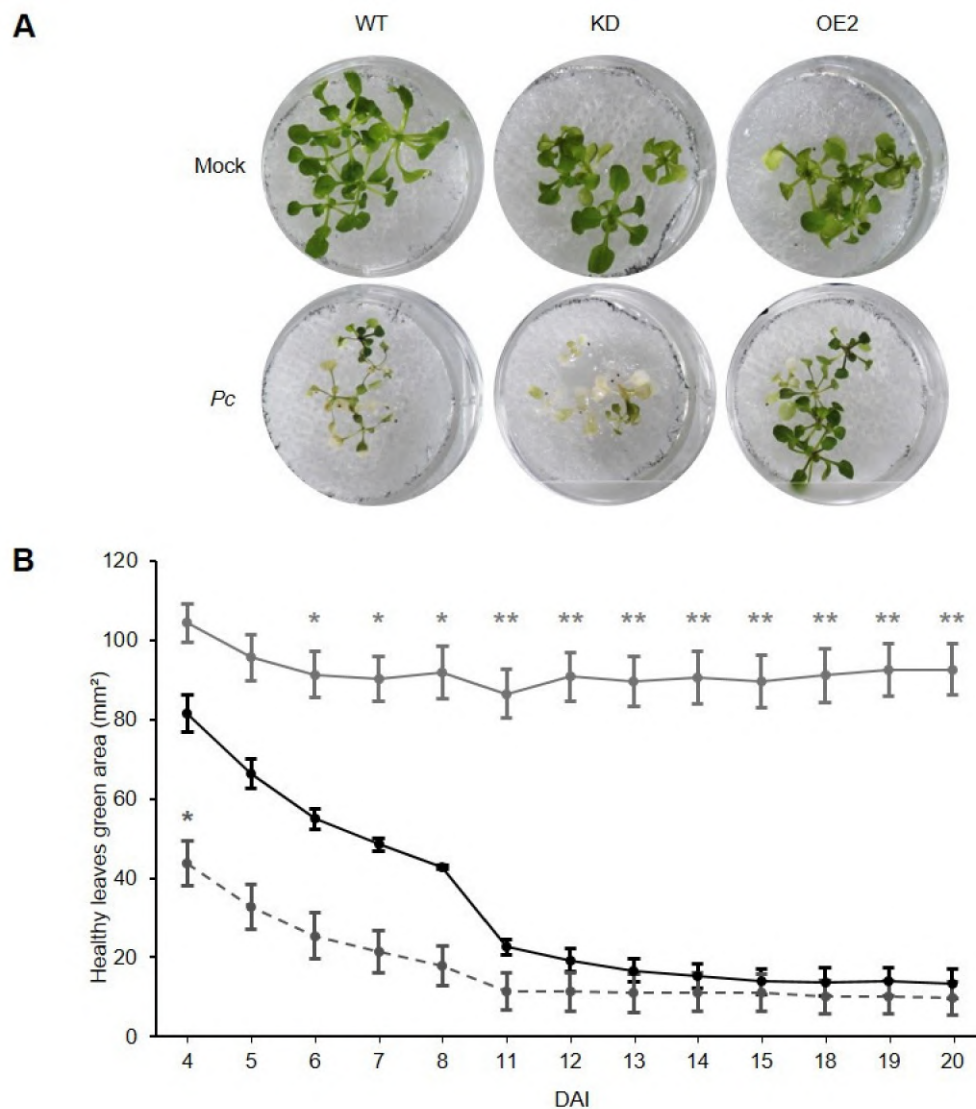


Figure 7. Comparative analysis of the susceptibility of *CML8* genotypes upon *Pc* infection. Two weeks-old seedlings grown on liquid MS medium were inoculated with 10^3 zoospores from *Pc* LT3112 strain. (A) Photos represent the symptoms obtained at ten dai. (B) Quantification of disease was achieved by measuring the surface of green leaf area of inoculated plants from four to 20 days after inoculation. The solid black line, the dashed grey line and the solid grey line represent WT, *CML8* KD and OE2 lines, respectively. The data presented correspond to three independent replicates. Bars = SEM. Statistical analyses were performed as described in Materials and Methods section and significant difference was found with *p*-values < 0.05 (** < 0.01, * < 0.05).

RT-qPCR experiments showed that the expression of *CML8* was slightly, but not significantly, induced (1.59-fold) at 24 hpi (Supplementary Materials, Figure S6A). However, with GUS staining of infected leaves, *CML8* was shown to be expressed from 6 h after *Xcc* inocu-

lation (Supplementary Materials, Figure S7). *PDC1* and *JAL23*, which were respectively down- and upregulated in *CML8* KD plants at 24 hpi following *Rs* inoculation, had a similar expression profile in response to *Xcc*, even if the difference observed was not significant. However, for all other induced genes in OE2 line in response to *Rs* (*XBAT34*, *RLP41*, *LTP4-4*, *PNA-A*, and *NUDT6*), a reverse pattern was found (Supplementary Materials, Figure S6B).

Following inoculation of *CML8* genotypes with the oomycete *Pc*, disease quantification was realized by measuring the average surface of green tissue per seedling 10 days after treatment (Figure 7A,B). *CML8* KD and OE2 transgenic lines display, respectively, less and more green areas than the WT, suggesting that *CML8* also contributes to a better tolerance against *Pc*.

At gene expression level, using RT-qPCR and GUS activity, *CML8* transcription was not modified following *Pc* infection (Supplementary Materials, Figure S6C, Figure S8). *JAL23*, *XBAT34*, *LTP4.4*, and *RLP41* showed a reverse expression pattern after *Pc* inoculation when compared to *Rs* inoculation. Interestingly, *NUDT6* was significantly induced in OE2 line at 24 hpi in both cases of *Pc* and *Rs* inoculations. Although not significant, two other genes (*PDC1* and *PNP-A*) showed the same tendency during *Pc* and *Rs* inoculations, as they were respectively down- and upregulated in both instances (Supplementary Materials, Figure S6D). Taken together, these results suggest that *CML8* acts as a regulator to multiple pathogens, probably by controlling common and specific immune processes following attacks by vascular root and leaf bacteria, as well as soilborne oomycetes.

3. Discussion

The sequencing of the Arabidopsis genome, as well as many other plant genomes since 2000, has shown the existence in plants of a large number of Ca^{2+} sensors [21,64–67]. Indeed, it was shown that the number of genes encoding the typical CaM, as well as the related CMLs, is high, ranging from 1 CaM and 3 CMLs in the green algae *Ostreococcus lucimarinus* to 6 CaM and 56 CMLs in poplar [21]. This raises the question about their respective roles in plant physiology. Concerning *CML8*, previous works indicate that *CML8* binds Ca^{2+} , controls enzyme activity, and is involved in *Pst* defense responses as a positive regulator [26,68,69]. Here, we show that *CML8*, a root- and vascular tissues-expressed CML, participates in defense responses not only against the soilborne bacterium *Rs*, but also to other pathogens, such as the epiphytic vascular bacterium *Xcc* and the oomycete *Pc*. Plant susceptibility increased in response to *Xcc* and *Pc*, and this phenotype was correlated with a greater in planta bacterial multiplication for *Xcc*. Complementarily, *CML8* OE lines were less susceptible and repressed bacterial multiplication in response to *Rs*, supporting that *CML8* acts as an activator of defense responses. To better understand the molecular processes that can be under the direct or indirect control of *CML8*, an RNA-seq approach focused on the identification of early root-regulated genes by *Rs* infection allowed to identify 151 DEGs. Noteworthy, when unchallenged by *Rs*, very few genes were differentially regulated in the *CML8* transgenic lines. Only eight and two DEGs were identified in KD and OE2, respectively, and none of these genes were present in the list of 151 DEGs, suggesting that *CML8* may act as a sensor tightly regulated by the plant to rapidly cope with external stimuli such as interaction with pathogens at the root level during development. Surprisingly, the number of genes whose transcriptional regulation is *CML8*-dependent was small compared to the importance of the late phenotypic response of the transgenic plants following inoculation, whatever the pathogen used. This could be explained by the experimental design setup to identify the molecular actors involved in the early response, by the statistical model used for the analysis of the RNA-seq data and the selected interaction, by the nature of the tissue analyzed, and, in particular, by the spatiotemporal regulation of *CML8* expression. Therefore, we suggest these DEGs mainly correspond to a finely tuned and localized induction of a plant immune response sufficient to allow the plants to resist or to cause a delay in the development of the diseases. Interestingly, while *CML8* appears to be weakly expressed in leaves [26], its specific transcriptional regulation in the stomatal guard cell appears also in accordance with its role as a positive

regulator of the plant defense response to *Pst*, stomata being important entry sites in host tissue for the efficient infection by this pathogenic bacteria [70]. Consistently, among our list, numerous genes are known to be regulated by several and various pathogens, and are mostly involved in basal defense. Indeed, defense-related genes, such as *PR2*, SA biosynthesis, and signaling genes (*PAD4*, *EDS1*, *EDS5*, *EDS16*), and camalexin synthesis gene *PAD3*, were all found significantly induced in OE2 plants compared with WT after *Rs* inoculation. In addition, PR1 protein accumulation was higher in OE plants and lower in KD plants compared to WT plants, and SA content was significantly lower in KD plants compared to WT plants during an inoculation with *Pst* [26].

Among the most promising candidates of our RNA-seq data, two cell wall-related genes strongly induced in *CML8* OE2 line were identified: *PNP-A*, already shown to play a role in host defense against pathogens [35], and the lipid transfer protein *LTP4.4* gene, crucial in the resistance against *Fusarium* trichothecene mycotoxin [34]. These two genes belong to the same co-expression network, along with other highly induced DEGs in *CML8* OE2 line: *RLP41*, *NUDT6*, and *XBAT34*. During plant infection by soil pathogens, primary metabolism, such as ethanol fermentation, is altered [38]. The pyruvate decarboxylase *PDC1* and the alcohol dehydrogenase *ADH1* genes are both strongly repressed in *Rs*-infected roots of *CML8* KD plants. Interestingly, these two genes are always found together in co-expression networks, and proteins are predicted to physically interact. However, as *ADH1* was also strongly downregulated in *CML8* OE2 plants, it may be that only *PDC1* plays a role in plant host immunity to *Ralstonia*. These genes have been shown to be induced in the early stages of Arabidopsis infection by the causal agent of clubroot *Plasmodiophora brassicae* [71], and are necessary for plant survival under hypoxic conditions [72]. This may indicate that *CML8*-mediated signaling is required for *PDC1* induction during root response to nonoptimal conditions, related to stresses of biotic or abiotic nature. Another family of proteins that is important in plant response to various stresses is the Jacalin lectin family, by binding carbohydrate ligands, thus perceiving many environmental signals [39]. For example, Weidenbach et al. [73] showed that the Jacalin-related lectin domain containing rice protein JAC1 confers quantitative resistance to bacteria, oomycetes, and fungi when overexpressed. Three proteins of this family were induced in KD plants at 24 hpi, and *JAL23* was the most strongly regulated. Unlike during *Rs* bacterial infection, only two and three of these genes were similarly regulated during *Xcc* and *Pc* infections, respectively. This could be explained by the differences in infected tissue, *Xcc* being a leaf pathogen, and type of microorganism, *Pc* being an oomycete.

These data support that *CML8* does not present a total functional redundancy with the other CMLs [25,26,74,75]. This could be explained by differences in their expression profiles but also to their downstream target repertoire, which are most likely different. Indeed, *CML8* is mainly transcribed in roots, and particularly during LR formation at primordia level, but also at a low level in leaf vascular tissues. This expression pattern strengthened following *Rs* inoculation, *CML8* expression being rapidly and transiently induced in both root and leaf vascular tissues where *Rs* propagates and multiplies. Consistent with results previously obtained with *Pst* [26], *CML8* expression is also slightly induced and spreads throughout the vascular system near the site of infection in response to *Xcc* (Supplementary Materials, Figure S7). As previously shown, *CML8* gene expression is not positively or negatively regulated by PAMPs such as flagellin and Ef-Tu [26]. Knowing that hormones are involved in plant development but also in plant immune responses [76], we explored their putative effect on the regulation of *CML8* spatiotemporal expression. *CML8* gene expression patterns were analyzed following exogenous hormones treatment. Results indicated that *CML8* could be induced by ethylene, SA, GA, and brassinosteroids. SA has long been known to promote plant defenses against many pathogens, including *Xcc* [77], *Pc* [78], and *Pst* [76]. *Rs* even possesses an SA degradation pathway to decrease its toxicity [79]. It is worth noting that many pathogens are able to produce certain phytohormones to manipulate plant defenses, as it has been shown for *Rs*, which can produce ethylene [80]. Indeed, we show that *CML8* is expressed in LRs where the bacterium enters the host and is

induced in the presence of *Rs*. Thus, we cannot exclude that *Rs* can control the expression of *CML8* to promote its infection by hormones such as ethylene [80].

CML8 was not the first CML identified as a regulator of defense against *Rs* infection. Indeed, Shen et al. [81] demonstrated that the overexpression of *CML13* from pepper induces hypersensitive reaction, whereas its silencing triggers plant susceptibility. Zheng et al. [82] showed that *Rs* interferes with Ca^{2+} -dependent gene expression to promote disease development in potato. The RipAB effector is responsible for the repression of three *CMLs*, one *CDPK*, and a Ca^{2+} transporter in potato. In 2021, Meng et al. [83] reported that among the root genes, specifically, and rapidly upregulated in tobacco-resistant cultivar to *Phytophthora nicotianae*, four *CMLs* were identified, whereas the *Loc107773369* gene, which corresponds to the closest tobacco ortholog to *CML8*, was downregulated. *CML8* is the closest homolog to the soybean *CaM4* and when overexpressed, *CaM4* is responsible for enhanced resistance to the oomycete *Phytophthora sojae* and two necrotrophic fungi, *Alternaria tenuissima* and *Phomopsis longicolla* [84]. Still, few examples are reported for a gene able to confer plant multipathogen resistance. As an example, the tomato immune receptor *Roq1* confers immunity to *Xcc*, *Pst*, and *Rs* by inhibiting pathogen virulence and activating at least two independent downstream defense responses [85]. Altogether, our results support that *CML8* acts in a signaling hub required for the establishment of basal defense responses to a wide variety of plant pathogens, probably through hormones interconnected signaling pathways, rather than PAMP pathways as reported in Zhu et al. [26].

Many *CMLs* have been reported to be involved in both biotic and abiotic stress responses. Interestingly, *CML8* appears to be one of the rare *CMLs* reported to date, involved in plant defense responses to several pathogen species. These data illustrate the complexity of Ca^{2+} signaling in biotic and abiotic responses and highlight the importance of Ca^{2+} in such signaling. Increasing papers have shown that environmental changes such as elevated temperatures negatively impact a majority of resistance response to many pathogens attack [2]. Aoun et al. [86] showed that the *Rs* resistance response linked to the *RPS4/RRS1-R* immunoreceptor pair, effective at 27 °C, is inhibited at 30 °C. Hilleary et al. [87] also demonstrated that, following flagellin treatment on *Arabidopsis*, Ca^{2+} signals are altered when the temperature increases from 22 °C to 28 °C. The next step will be to investigate the robustness of *CML8*-dependent immune responses in contrasted abiotic and/or biotic environments and to identify the molecular actors differentially regulated by *CML8*.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Materials and Culture Conditions

Arabidopsis thaliana Columbia Col-8 plant corresponding to the wild type (WT) genetic background was used as control. The knockdown *amiRNA 2.3.2* (KD) and *CML8* overexpressing transgenic *Arabidopsis* lines *OE CML8 2.3* (OE2) and *OE CML8 3.2* (OE3), have been already characterized in our previous work [26]. To avoid variations in seed quality, seeds were produced from plants cultivated over the same time period and stored in identical conditions. Seeds were surfaced sterilized as described by Zhu et al. [26].

4.2. Bacteria and Oomycete Strains and Growth Conditions

The *Rs* WT reference GMI1000 strain was used for RNA-seq experiments. For symptom notations and IGC, the *Rs* mutant strain $\Delta popP2$ complemented with *PopP2* (strain GRS100) that behaves similarly to GMI1000 [88] was used as control to investigate a potential role of *RRS1* in *CML8*-mediated responses. Both strains were grown at 28 °C in BG medium as described by Plener et al. [89]. The *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) strains were the 8004 $\Delta xopAC$ strain that is deleted for the avirulence gene *xopAC* [90] and the strain $\Delta xopAC$ -GUS-GFP that constitutively expresses *uidA* and *gfp* genes [91]. *Xcc* was cultivated in MOKA medium [92]. The LT3112 *Phytophthora capsici* (*Pc*) strain used was grown in a controlled culture chamber at 22 °C on V-8 agar medium [93].

4.3. Plant Inoculations and in Planta Quantifications

Rs inoculations were performed on four-week-old plants using the method described in Aoun et al. [86]. To promote bacterial entry and obtain a homogeneous infection, and to better assess the magnitude of the effect of CML8 on plant immunity, roots were cut, and plants were soaked for 15 min in 2 L per tray of a bacterial suspension at 1×10^7 cfu mL⁻¹ for symptom notations and IGC and transferred in growth chambers with controlled 27 °C light/26 °C dark conditions (75% relative humidity, 12 h light, 100 μ mol m⁻² s⁻¹). The wilting symptoms were scored on an established zero, one, two, three, and four disease index scale corresponding to healthy, 25%, 50%, and 75% wilted and dead plants, respectively. Data in Figure 3 are representative of three independent experiments consisting of 69 plants per genotype. Data in Supplementary Materials, Figure S2 are representative of three independent experiments consisting of 75 and 73 plants for GMI1000 and GRS100 inoculations, respectively. Quantification of bacteria in planta was performed as described in Deslandes et al. [94]. For *Xcc*, piercing inoculations were carried out on four-week-old plants as described by Meyer et al. [95], and disease index scoring varies from zero (no symptom) to four (leaf death). In planta bacteria quantifications were performed after seven days as described by Xu et al. [96]. For *Pc*, inoculations and symptoms quantifications were performed as described by Larroque et al. [93]. Symptoms were quantified from photos with ImageJ software (ImageJ. Available online: <https://imagej.nih.gov/ij/>, accessed time: 25 September 2021); the leaf surface of green area was used as proxy for disease development. The WT accession was used as a control in all experiments, and bacteria quantification experiments were performed at least three times using six leaves from six independent plants for *Xcc* and three aerial parts of three independent plants for *Rs*.

4.4. Analyses of the CML8 Gene Expression Pattern in Transgenic Seedlings and in Response to *Rs*, *Xcc*, and *Pc* Inoculations and Exogenous Hormones Treatment

Homozygous transgenic plants harboring the *CML8 promoter::uidA* construct [26] were used to monitor the *CML8* gene expression pattern either in control conditions or following *Rs*, *Xcc*, and *Pc* inoculations. *Xcc* and *Pc* inoculations were performed as described above. For *Rs*, *CML8 promoter::uidA* transgenic Arabidopsis seedlings were grown for eight days in liquid MS medium (0.5 \times , pH 5.7, 1% sucrose) in 24-well plates. *Rs* inoculations were carried out by replacing the MS medium with 1×10^7 cfu·mL⁻¹ *Rs* or not (mock) in growth chambers at 27 °C for six hours before GUS staining. For *CML8* expression pattern in response to hormones, 8-day-old seedlings of *promoter CML8::uidA* transgenic lines were transferred to liquid MS with or without hormones for 3, 6, and 24 h. Hormones used were 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC, ethylene precursor 10 μ M), brassinosteroid (BR at 100 nM), salicylic Acid (SA 100 μ M), gibberellic acid (GA 10 μ M), abscisic acid (ABA 10 μ M), methyl jasmonate (MJ) at 10 μ M), GR24 (strigolactone analog at 15 μ M), and Auxin (IAA 1 μ M). GUS staining was performed as described by Magnan et al. [24], and pictures were taken using Axio Zoom v16 (Zeiss, Kelsterbach, Germany).

4.5. Global Transcriptome Analyses Using ILLUMINA RNA-seq

Four-week-old WT, *CML8* KD, and OE plants were root-inoculated without cutting the roots, as described in Aoun et al. [86], either with water (mock) or *Rs* GMI1000 strain. Roots from mock- and *Rs*-inoculated plants were harvested after 0, 6, 12, and 24 hpi. Each sample is composed of the roots of five plants. For each sample, three independent biological replicates were generated. RNA were extracted using a CTAB protocol [97] and treated with DNase (Thermo Fisher Scientific Life Science, Waltham, USA), and RNA integrity was assessed using the Agilent RNA 6000 nano kit and the Agilent 2100 Bioanalyzer system. Four μ g RNA per sample was used as input material for the RNA sample preparations. Sequencing libraries were generated using NEBNext[®] UltraTM RNA Library Prep Kit for Illumina[®] (NEB, Ipswich, USA) and sequences index codes were attributed to each sample. The clustering of the index-coded samples was performed on a cBot Cluster Generation

System using TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumina, San Diego, USA). After cluster generation, the libraries were sequenced on an Illumina Novaseq platform and 150 bp paired-end reads were generated. Oriented paired-end RNA sequencing was carried out by Novogene Bioinformatics Technology Co., Ltd. (Tianjing, China). Four GB raw data were obtained for each sample library. Clean reads were obtained by removing adapter and reads containing poly-N, and low-quality reads were eliminated. Raw sequence data were submitted to the Sequence Read Archive (SRA) database (Accession SRP280329).

4.6. Statistical Analysis of RNA-seq Data

Pair-end reads from the 63 RNA-seq runs were aligned on the Arabidopsis TAIR10 genome with tophat-2.1.1. Read countings were performed with htseq-0.9.1. An average of 36 million reads with quality scores over 90% per sample were obtained. To identify DEGs, htseq-counts files were analyzed with the R software, also using EdgeR package version 3.24.3 [98]. A genotype comparison between treated and nontreated plants at a given time point was performed. Genes that did not have at least one read after a count per million normalization in at least one half of the samples were discarded. Raw counts were normalized using TMM method and count distribution was modeled with a negative binomial generalized linear model where the genotype, the treatment, the time, and all double interactions between factors were taken into consideration, and dispersion was estimated by the edgeR method. A likelihood ratio test was performed to evaluate an infection effect in a genotype at a given time point. Raw *p*-values were adjusted with the Benjamini–Hochberg procedure to control the false discovery rate (FDR). A gene was declared differentially expressed if its adjusted *p*-value was ≤ 0.05 . A list of DEGs was recovered for both KD vs WT and overexpressor OE vs WT comparisons, based on a 5% FDR correction (Supplementary Materials, Table S1).

4.7. Biological Pathway Enrichment, Gene Network Analysis, Comparisons with Available Transcriptome Datasets

Biological pathways significantly overrepresented were identified with the Classification SuperViewer tool using MapMan classification categories (The Bio-Analytic Resource for Plant Biology. Available online: http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi, accessed time: 25 September 2021) [99]. We used GENEMANIA to predict the contribution of DEGs in co-expression or interaction networks (<https://genemania.org/>, accessed time: 25 September 2021) [100]. To infer the putative function of DEGs, hierarchical clustering analyses were performed using the Geneinvestigator toolbox (Geneinvestigator. Available online: <https://www.geneinvestigator.com/gv/>, accessed time: 25 September 2021) and microarrays and RNA-seq data coming from stress, biotic, elicitor, and development data, with distance measured as Euclidian distance.

Lists of genes were also compared to specific lists of Arabidopsis genes involved in Ca²⁺ signaling [45], auxin [101], root development [60–63], and genes differentially regulated during PTI, ETI, or both in response to different pathogens [43,47–54,102–104] including *Rs* [55–59,105]. The statistical enrichment of DEGs in these lists was evaluated using a hypergeometric statistic test (*p*-value ≤ 0.05) (R version 3.5.2 (2018-12-20)).

4.8. Statistical Analysis of Phenotyping and Bacteria Quantifications

For each transgenic of phenotyping experiments for *Rs* and *Xcc* inoculations, the following mixed model was used to test whether the transgenic plant differed from the WT background:

$$\text{disease index } ij = \mu + \text{block } i + \text{genotype } j + \text{block } i \times \text{genotype } j + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

where μ is the overall mean of the phenotypic data, “block” accounts for differences in microenvironmental conditions between the experimental blocks, “genotype” corresponds to the genetic differences between the transgenic and the wild-type background, “block \times genotype” accounts for variation in between genotype differences among blocks,

and “ ϵ ” is the residual term. All factors were considered as fixed. Model (1) was applied separately to each transgenic and the corresponding background. This model was implemented with the function `lm()` in R software environment (R version 3.6.1 (2019-07-05) R Core Team 2019). The dynamics of mutant responses to *Rs* and *Xcc* were presented using the `ggplot2` package [106] showing the least-square means (LSmeans) \pm the standard error of the LSmeans. For phenotyping experiments for *Pc* inoculations, data were analyzed using variance analyses performed using the version 9.4 of SAS software. To analyze bacteria quantifications in planta, each transgenic plant was analyzed with the following mixed model to test whether the transgenic differed from the WT background:

$$\text{number of CFU/FW (g) } ij = \mu + \text{block } i + \text{genotype } j + \text{block } i \times \text{genotype } j + \epsilon \text{ } ij \quad (2)$$

where μ is the overall mean of the phenotypic data, “block” accounts for differences in microenvironmental conditions between the experimental blocks, “genotype” corresponds to the genetic differences between the transgenics and the wild-type background, “block \times genotype” accounts for variation in between genotype differences among blocks, and “ ϵ ” is the residual term. All factors were considered as fixed. Model (2) was applied separately to each pair of transgenic plant and its corresponding WT. This model was implemented with the function `lm()` in R software environment. The log of cfu per gram of fresh weight averaged over the two plates for *Rs* inoculations and the log of cfu per cm² for *Xcc* inoculations were represented as a boxplot per genotype using the `ggplot2` package [106]. Error bars represent standard error means (SEM) (R version 3.6.1 (2019-07-05) R Core Team 2019).

4.9. RT-qPCR Experiments

Total RNA from two biological replicates of *Rs*-inoculated roots were used for *CML8* expression. Total RNA was prepared from four leaves from four independent plants inoculated at zero and 24 hpi by piercing with *Xcc* and from roots of 15 independent seedlings inoculated at zero and 24 hpi with spores of *Pc* using the EZNA Plant RNA Kit (Omega Bio-tek[®] R6827-02, Norcross, GA, USA). For each experiment, two independent biological replicates and two technical replicates were performed. Totals of 500 ng to 1 μ g of total RNA were treated with DNase (Ambion AM1907, Thermo Fisher Scientific Life Science, Waltham, MA, USA) and reverse-transcribed (Thermo Fisher Scientific Life Science, Waltham, MA, USA) with RNase inhibitor (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific Life Science, Waltham, MA, USA). qPCR was performed with cDNA diluted 1/10th or 1/20th on a QuantStudio 6 Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific Life Science, Waltham, MA, USA). *EF1-alpha* (*At5g60390*) was used for normalization, and the $\Delta\Delta$ Ct method [107] was used to calculate fold changes relative to the internal control and the mock-inoculated control samples. Primer sequences used are listed in Supplementary Materials, Table S5. Student’s t-test was used, and significant difference was found with *p*-values < 0.05 (***) < 0.001, ** < 0.01, * < 0.05).

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms221910469/s1>.

Author Contributions: X.Z., J.M., R.B., and J.-P.G. designed the research. X.Z., J.M., E.R. and S.P. performed the research. J.M., M.A., H.S.C., R.B. and J.-P.G. carried out RNA-seq analyses. X.Z., J.M., R.B. and J.-P.G. analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript. E.L. critically revised the manuscript. All the authors have approved the submitted version of the manuscript and declare no conflicts of interest. X.Z. and J.M. contributed equally to the work, and R.B. and J.-P.G. supervised the project. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: X.Z. was the recipient of a fellowship from the China Scholarship Council (CSC) and J.M. is fellow from the French Ministry of National Education and Research. This work was supported by the Université Paul Sabatier (Toulouse, France), the CNRS (France) and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-17-CE20-0017-01) thanks to the CaPPTure project, the International Science and Technology Cooperation Major Project Cultivation Special Fund of SCAU (2019SCAUGH05), and Pearl River Talent Program for Young Talent (grant no. 2017GC010321). This study is set within the framework of the “Laboratoires d’Excellences (LABEX)” TULIP (ANR-10-LABX-41) and of the “École Universitaire de Recherche (EUR)” TULIP-GS (ANR-18-EURE-0019).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are openly available in SRA database (Accession SRP280329) and on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank C. Mazars, D. Aldon, and M. Mbengue for their comments on this work, E. Belmas (De Sangosse) for the inoculations with *Pc*, A. Leru (TRI GéoToul) for her help with image analyses, and L. Casagrande for her help in gene expression analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Saijo, Y.; Loo, E.P. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytol.* **2019**, *225*, 87–104. [\[CrossRef\]](#)
- Desaint, H.; Aoun, N.; Deslandes, L.; Vaillieu, F.; Roux, F.; Berthomé, R. Fight hard or die trying: When plants face pathogens under heat stress. *New Phytol.* **2021**, *229*, 712–734. [\[CrossRef\]](#)
- Shahzad, A.; Ullah, S.; Dar, A.A.; Sardar, M.F.; Mehmood, T.; Tufail, M.A.; Shakoor, A.; Haris, M. Nexus on climate change: Agriculture and possible solution to cope future climate change stresses. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 14211–14232. [\[CrossRef\]](#)
- Bebber, D.P.; Gurr, S.J. Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. *Fungal Genet. Biol.* **2015**, *74*, 62–64. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- McDonald, B.A.; Stukenbrock, E.H. Rapid emergence of pathogens in agro-ecosystems: Global threats to agricultural sustainability and food security. *Philos. Trans. R. Soc. B* **2016**, *371*, 20160026. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jones, J.D.G.; Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature* **2006**, *444*, 323–329. [\[CrossRef\]](#)
- Mur, L.A.J.; Kenton, P.; Lloyd, A.J.; Ougham, H.; Prats, E. The hypersensitive response; The centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 501–520. [\[CrossRef\]](#)
- Thomma, B.P.H.J.; Nürnberger, T.; Joosten, M.H.A.J. Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* **2011**, *23*, 4–15. [\[CrossRef\]](#)
- Lu, Y.; Tsuda, K. Intimate Association of PRR- and NLR-Mediated Signaling in Plant Immunity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2021**, *34*, 3–14. [\[CrossRef\]](#)
- Young, N.D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1996**, *34*, 479–501. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bartoli, C.; Roux, F. Genome-wide association studies in plant pathosystems: Toward an ecological genomics approach. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 763. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Roux, F.; Voisin, D.; Badet, T.; Balagué, C.; Barlet, X.; Huard-Chauveau, C.; Roby, D.; Raffaele, S. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: Placing plant quantitative disease resistance on the map. *Mol. Plant Pathol.* **2014**, *15*, 427–432. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Delplace, F.; Huard-Chauveau, C.; Dubiella, U.; Khafif, M.; Alvarez, E.; Langin, G.; Roux, F.; Peyraud, R.; Roby, D. Robustness of plant quantitative disease resistance is provided by a decentralized immune network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 18099–18109. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tian, W.; Wang, C.; Gao, Q.; Li, L.; Luan, S. Calcium spikes, waves and oscillations in plant development and biotic interactions. *Nat. Plants* **2020**, *6*, 750–759. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lee, H.; Seo, P.J. Ca²⁺-talyzing Initial Responses to Environmental Stresses. *Trends Plant Sci.* **2021**, *8*, 849–870. [\[CrossRef\]](#)
- Reddy, A.S.N.; Ali, G.S.; Celesnik, H.; Day, I.S. Coping with Stresses: Roles of Calcium- and Calcium/Calmodulin-Regulated Gene Expression. *Plant Cell* **2011**, *23*, 2010–2032. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Aldon, D.; Mbengue, M.; Mazars, C.; Galaud, J.P. Calcium signalling in plant biotic interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 665. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Grant, M.; Brown, I.; Adams, S.; Knight, M.; Ainslie, A.; Mansfield, J. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* **2000**, *23*, 441–450. [\[CrossRef\]](#)

19. Kleist, T.J.; Spencley, A.L.; Luan, S. Comparative phylogenomics of the CBL-CIPK calcium-decoding network in the moss *Physcomitrella*, *Arabidopsis*, and other green lineages. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 1–17. [[CrossRef](#)]
20. Hamel, L.-P.; Sheen, J.; Séguin, A. Ancient signals: Comparative genomics of green plant CDPKs. *Trends Plant Sci.* **2014**, *19*, 79–89. [[CrossRef](#)]
21. Zhu, X.; Dunand, C.; Snedden, W.; Galaud, J.P. CaM and CML emergence in the green lineage. *Trends Plant Sci.* **2015**, *20*, 483–489. [[CrossRef](#)]
22. Yamaguchi, T.; Aharon, G.S.; Sottosanto, J.B.; Blumwald, E. Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca²⁺- and pH-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16107–16112. [[CrossRef](#)]
23. Xu, B.; Cheval, C.; Laohavisit, A.; Hocking, B.; Chiasson, D.; Olsson, T.S.G.; Shirasu, K.; Faulkner, C.; Gilliam, M. A calmodulin-like protein regulates plasmodesmal closure during bacterial immune responses. *New Phytol.* **2017**, *215*, 77–84. [[CrossRef](#)]
24. Magnan, F.; Ranty, B.; Charpentreau, M.; Sotta, B.; Galaud, J.P.; Aldon, D. Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *Plant J.* **2008**, *56*, 575–589. [[CrossRef](#)]
25. Leba, L.-J.; Cheval, C.; Ortiz-Martin, I.; Ranty, B.; Beuzon, C.R.; Galaud, J.P.; Aldon, D. CML9, an *Arabidopsis* calmodulin-like protein, contributes to plant innate immunity through a flagellin-dependent signalling pathway. *Plant J.* **2012**, *71*, 976–989. [[CrossRef](#)]
26. Zhu, X.; Robe, E.; Jomat, L.; Aldon, D.; Mazars, C.; Galaud, J.P. CML8, an *Arabidopsis* calmodulin-like protein, plays a role in *Pseudomonas syringae* plant immunity. *Plant Cell Physiol.* **2017**, *58*, 307–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Elphinstone, J.G. *The Current Bacterial Wilt Situation: A Global Overview*; Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C., Eds.; Bacterial; American Phytopathological Society Press: St Paul, MN, USA, 2005; ISBN 9780890543290.
28. Genin, S.; Denny, T.P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2012**, *50*, 67–89. [[CrossRef](#)]
29. Salanoubat, M.; Schiex, T.; Thébault, P.; Levy, M.; Weissenbach, J.; Genin, S.; Artiguenave, F.; Gouzy, J.; Mangenot, S.; Arlat, M.; et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **2002**, *415*, 497–502. [[CrossRef](#)]
30. Zolobowska, L.; Van Gijsegem, F. Induction of lateral root structure formation on petunia roots: A novel effect of GMI1000 *Ralstonia solanacearum* infection impaired in Hrp mutants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2006**, *19*, 597–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Casimiro, I.; Beeckman, T.; Graham, N.; Bhalerao, R.; Zhang, H.; Casero, P.; Sandberg, G.; Bennett, M.J. Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* **2003**, *8*, 165–171. [[CrossRef](#)]
32. Péret, B.; De Rybel, B.; Casimiro, I.; Benková, E.; Swarup, R.; Laplaze, L.; Beeckman, T.; Bennett, M.J. *Arabidopsis* lateral root development: An emerging story. *Trends Plant Sci.* **2009**, *14*, 399–408. [[CrossRef](#)]
33. Vasse, J.; Frey, P.; Trigalet, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1995**, *8*, 241–251. [[CrossRef](#)]
34. McLaughlin, J.E.; Bin-Umer, M.A.; Widiez, T.; Finn, D.; McCormick, S.; Tumer, N.E. A lipid transfer protein increases the glutathione content and enhances *Arabidopsis* resistance to a trichothecene mycotoxin. *PLoS ONE* **2015**, *10*, 1–20. [[CrossRef](#)]
35. Ficarra, F.A.; Grandellis, C.; Garavaglia, B.S.; Gottig, N.; Ottado, J. Bacterial and plant natriuretic peptides improve plant defence responses against pathogens. *Mol. Plant Pathol.* **2018**, *19*, 801–811. [[CrossRef](#)]
36. Ogawa, T.; Muramoto, K.; Takada, R.; Nakagawa, S.; Shigeoka, S.; Yoshimura, K. Modulation of NADH Levels by *Arabidopsis* Nudix Hydrolases, AtNUDX6 and 7, and the Respective Proteins Themselves Play Distinct Roles in the Regulation of Various Cellular Responses Involved in Biotic/Abiotic Stresses. *Plant Cell Physiol.* **2016**, *57*, 1295–1308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Yocgo, R.E.; Geza, E.; Chimusa, E.R.; Mazandu, G.K. A post-gene silencing bioinformatics protocol for plant-defence gene validation and underlying process identification: Case study of the *Arabidopsis thaliana* NPR1. *BMC Plant Biol.* **2017**, *17*, 218. [[CrossRef](#)]
38. Pathuri, I.P.; Reitberger, I.E.; Hückelhoven, R.; Proels, R.K. Alcohol dehydrogenase 1 of barley modulates susceptibility to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 3449–3457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Esch, L.; Schaffrath, U. An update on jacalin-like lectins and their role in plant defense. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Attard, A.; Gourgues, M.; Callemeyn-Torre, N.; Keller, H. The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytol.* **2010**, *187*, 449–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Stringlis, I.A.; Proietti, S.; Hickman, R.; Van Verk, M.C.; Zamioudis, C.; Pieterse, C.M.J. Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists. *Plant J.* **2018**, *93*, 166–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Robert-Seilaniantz, A.; MacLean, D.; Jikumaru, Y.; Hill, L.; Yamaguchi, S.; Kamiya, Y.; Jones, J.D.G. The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *Plant J.* **2011**, *67*, 218–231. [[CrossRef](#)]
43. Tintor, N.; Ross, A.; Kanehara, K.; Yamada, K.; Fan, L.; Kemmerling, B.; Nurnberger, T.; Tsuda, K.; Saijo, Y. Layered pattern receptor signaling via ethylene and endogenous elicitor peptides during *Arabidopsis* immunity to bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 6211–6216. [[CrossRef](#)]

44. Voxeur, A.; Habrylo, O.; Guénin, S.; Miart, F.; Soulié, M.C.; Rihouey, C.; Pau-Roblot, C.; Domon, J.M.; Gutierrez, L.; Pelloux, J.; et al. Oligogalacturonide production upon Arabidopsis thaliana-Botrytis cinerea interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 19743–19752. [[CrossRef](#)]
45. Whalley, H.J.; Sargeant, A.W.; Steele, J.F.C.; Lacoere, T.; Lamb, R.; Saunders, N.J.; Knight, H.; Knight, M.R. Transcriptomic Analysis Reveals Calcium Regulation of Specific Promoter Motifs in Arabidopsis. *Plant Cell* **2011**, *23*, 4079–4095. [[CrossRef](#)]
46. Le Berre, J.Y.; Gourgues, M.; Samans, B.; Keller, H.; Panabières, F.; Attard, A. Transcriptome dynamic of Arabidopsis roots infected with Phytophthora parasitica identifies VQ29, a gene induced during the penetration and involved in the restriction of infection. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–25. [[CrossRef](#)]
47. Pandey, S.P.; Roccaro, M.; Schön, M.; Logemann, E.; Somssich, I.E. Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of Arabidopsis. *Plant J.* **2010**, *64*, 912–923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Zhu, Q.H.; Stephen, S.; Kazan, K.; Jin, G.; Fan, L.; Taylor, J.; Dennis, E.S.; Helliwell, C.A.; Wang, M.B. Characterization of the defense transcriptome responsive to Fusarium oxysporum-infection in Arabidopsis using RNA-seq. *Gene* **2013**, *512*, 259–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Truman, W.; De Zabala, M.T.; Grant, M. Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant J.* **2006**, *46*, 14–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Thilmony, R.; Underwood, W.; He, S.Y. Genome-wide transcriptional analysis of the Arabidopsis thaliana interaction with the plant pathogen Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 and the human pathogen Escherichia coli O157:H7. *Plant J.* **2006**, *46*, 34–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Denoux, C.; Galletti, R.; Mammarella, N.; Gopalan, S.; Werck, D.; De Lorenzo, G.; Ferrari, S.; Ausubel, F.M.; Dewdney, J. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Mol. Plant* **2008**, *1*, 423–445. [[CrossRef](#)]
52. Moreau, M.; Degrave, A.; Vedel, R.; Bitton, F.; Patrit, O.; Renou, J.P.; Barny, M.A.; Fagard, M. EDS1 contributes to nonhost resistance of Arabidopsis thaliana against Erwinia amylovora. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2012**, *25*, 421–430. [[CrossRef](#)]
53. Bartsch, M.; Gobbato, E.; Bednarek, P.; Svenja, D.; Schultze, J.L.; Bautor, J.; Parker, J.E. Salicylic Acid-Independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Signaling in Arabidopsis Immunity and Cell Death Is Regulated by the Monooxygenase FMO1 and the Nudix Hydrolase NUDT7. *Plant Cell* **2006**, *18*, 1038–1051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Adams-Phillips, L.; Wan, J.; Tan, X.; Dunning, F.M.; Meyers, B.C.; Michelmore, R.W.; Bent, A.F. Discovery of ADP-Ribosylation and Other Plant Defense Pathway Elements Through Expression Profiling of Four Different Arabidopsis–Pseudomonas R-avr Interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2008**, *21*, 646–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hu, J.; Barlet, X.; Deslandes, L.; Hirsch, J.; Feng, D.X.; Somssich, I.; Marco, Y. Transcriptional responses of Arabidopsis thaliana during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, Ralstonia solanacearum. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Denancé, N.; Ranocha, P.; Oria, N.; Barlet, X.; Rivière, M.P.; Yadeta, K.A.; Hoffmann, L.; Perreau, F.; Clément, G.; Maia-Grondard, A.; et al. Arabidopsis wat1 (walls are thin1)-mediated resistance to the bacterial vascular pathogen, Ralstonia solanacearum, is accompanied by cross-regulation of salicylic acid and tryptophan metabolism. *Plant J.* **2013**, *73*, 225–239. [[CrossRef](#)]
57. Hernández-Blanco, C.; Feng, D.X.; Hu, J.; Sánchez-Vallet, A.; Deslandes, L.; Llorente, F.; Berrocal-Lobo, M.; Keller, H.; Barlet, X.; Sánchez-Rodríguez, C.; et al. Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* **2007**, *19*, 890–903. [[CrossRef](#)]
58. Zhao, C.; Wang, H.; Lu, Y.; Hu, J.; Qu, L.; Li, Z.; Wang, D.; He, Y.; Valls, M. Deep Sequencing Reveals Early Reprogramming of Arabidopsis Root Transcriptomes Upon Ralstonia solanacearum Infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2019**, *32*, 813–827. [[CrossRef](#)]
59. Sohn, K.H.; Segonzac, C.; Rallapalli, G.; Sarris, P.F.; Woo, J.Y.; Williams, S.J.; Newman, T.E.; Paek, K.H.; Kobe, B.; Jones, J.D.G. The Nuclear Immune Receptor RPS4 Is Required for RRS1SLH1-Dependent Constitutive Defense Activation in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Che, P.; Lall, S.; Nettleton, D.; Howell, S.H. Gene expression programs during shoot, root, and callus development in Arabidopsis tissue culture. *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 620–637. [[CrossRef](#)]
61. Parizot, B.; De Rybel, B.; Beeckman, T. VisualRTC: A New View on Lateral Root Initiation by Combining Specific Transcriptome Data Sets. *Plant Physiol.* **2010**, *153*, 34–40. [[CrossRef](#)]
62. Zhang, X.; Pang, J.; Ma, X.; Zhang, Z.; He, Y.; Hirsch, C.N.; Zhao, J. Multivariate analyses of root phenotype and dynamic transcriptome underscore valuable root traits and water-deficit responsive gene networks in maize. *Plant Direct* **2019**, *3*, 1–18. [[CrossRef](#)]
63. Brady, S.M.; Orlando, D.A.; Lee, J.-Y.; Wang, J.Y.; Koch, J.; Dinneny, J.R.; Mace, D.; Ohler, U.; Benfey, P.N. A High-Resolution Root Spatiotemporal Map Reveals Dominant Expression Patterns. *Science (80-.)* **2007**, *318*, 801–806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Zeng, H.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Pi, E.; Zhu, Y. Analysis of EF-hand proteins in soybean genome suggests their potential roles in environmental and nutritional stress signaling. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Liao, J.; Deng, J.; Qin, Z.; Tang, J.; Shu, M.; Ding, C.; Liu, J.; Hu, C.; Yuan, M.; Huang, Y.; et al. Genome-Wide identification and analyses of calmodulins and Calmodulin-Like proteins in lotus japonicas. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Guo, N.; Wang, G.; Zong, M.; Han, S.; Liu, F. Genome-wide identification, and phylogenetic and expression profiling analyses of CaM and CML genes in Brassica rapa and Brassica oleracea. *Gene* **2018**, *677*, 232–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

67. He, X.; Liao, L.; Xie, S.; Yao, M.; Xie, P.; Liu, W.; Kang, Y.; Huang, L.; Wang, M.; Qian, L.; et al. Comprehensive analyses of the annexin (ANN) gene family in *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* and *Brassica napus* reveals their roles in stress response. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–13. [[CrossRef](#)]
68. Zielinski, R.E. Characterization of three new members of the *Arabidopsis thaliana* calmodulin gene family: Conserved and highly diverged members of the gene family functionally complement a yeast calmodulin null. *Planta* **2002**, *214*, 446–455. [[CrossRef](#)]
69. Park, H.C.; Park, C.Y.; Koo, S.C.; Cheong, M.S.; Kim, K.E.; Kim, M.C.; Lim, C.O.; Lee, S.Y.; Yun, D.J.; Chung, W.S. AtCML8, a calmodulin-like protein, differentially activating CaM-dependent enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* **2010**, *29*, 1297–1304. [[CrossRef](#)]
70. Melotto, M.; Underwood, W.; Yang He, S. Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2008**, *46*, 101–122. [[CrossRef](#)]
71. Gravot, A.; Richard, G.; Lime, T.; Lemarié, S.; Jubault, M.; Lariagon, C.; Lemoine, J.; Vicente, J.; Robert-Seilaniantz, A.; Holdsworth, M.J.; et al. Hypoxia response in *Arabidopsis* roots infected by *Plasmodiophora brassicae* supports the development of clubroot. *BMC Plant Biol.* **2016**, *16*, 1–10. [[CrossRef](#)]
72. Ismond, K.P.; Dolferus, R.; De Pauw, M.; Dennis, E.S.; Good, A.G. Enhanced low oxygen survival in *Arabidopsis* through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 1292–1302. [[CrossRef](#)]
73. Weidenbach, D.; Esch, L.; Möller, C.; Hensel, G.; Kumlehn, J.; Höfle, C.; Hüchelhoven, R.; Schaffrath, U. Polarized Defense Against Fungal Pathogens Is Mediated by the Jacalin-Related Lectin Domain of Modular Poaceae-Specific Proteins. *Mol. Plant* **2016**, *9*, 514–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Vadassery, J.; Reichelt, M.; Hause, B.; Gershenson, J.; Boland, W.; Mithöfer, A. CML42-mediated calcium signaling coordinates responses to Spodoptera herbivory and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2012**, *159*, 1159–1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Bender, K.W.; Rosenbaum, D.M.; Vanderbeld, B.; Ubaid, M.; Snedden, W.A. The *Arabidopsis* calmodulin-like protein, CML39, functions during early seedling establishment. *Plant J.* **2013**, *76*, 634–647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Pieterse, C.M.J.; Van Der Does, D.; Zamioudis, C.; Leon-Reyes, A.; Van Wees, S.C.M. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2012**, *28*, 489–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Üstün, S.; Bartetzko, V.; Börnke, F. The *Xanthomonas campestris* Type III Effector XopJ Targets the Host Cell Proteasome to Suppress Salicylic-Acid Mediated Plant Defence. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003427. [[CrossRef](#)]
78. Li, Q.; Wang, J.; Bai, T.; Zhang, M.; Jia, Y.; Shen, D.; Zhang, M.; Dou, D. A *Phytophthora capsici* effector suppresses plant immunity via interaction with EDS1. *Mol. Plant Pathol.* **2019**, *21*, 502–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Lowe-Power, T.M.; Jacobs, J.M.; Ailloud, F.; Fochs, B.; Prior, P.; Allen, C. Degradation of the plant defense signal salicylic acid protects *Ralstonia solanacearum* from toxicity and enhances virulence on tobacco. *MBio* **2016**, *7*, 1–12. [[CrossRef](#)]
80. Valls, M.; Genin, S.; Boucher, C. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* **2006**, *2*, 0798–0807. [[CrossRef](#)]
81. Shen, L.; Yang, S.; Guan, D.; He, S. CaCML13 acts positively in pepper immunity against *Ralstonia solanacearum* infection forming feedback loop with CabZIP63. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4186. [[CrossRef](#)]
82. Zheng, X.; Li, X.; Wang, B.; Cheng, D.; Li, Y.; Li, W.; Huang, M.; Tan, X.; Zhao, G.; Song, B.; et al. A systematic screen of conserved *Ralstonia solanacearum* effectors reveals the role of RipAB, a nuclear-localized effector that suppresses immune responses in potato. *Mol. Plant Pathol.* **2019**, *20*, 547–561. [[CrossRef](#)]
83. Meng, H.; Sun, M.; Jiang, Z.; Liu, Y.; Sun, Y.; Liu, D.; Jiang, C.; Ren, M.; Yuan, G.; Yu, W.; et al. Comparative transcriptome analysis reveals resistant and susceptible genes in tobacco cultivars in response to infection by *Phytophthora nicotianae*. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–13. [[CrossRef](#)]
84. Rao, S.S.; El-Habbak, M.H.; Havens, W.M.; Singh, A.; Zheng, D.; Vaughn, L.; Haudenschild, J.S.; Hartman, G.L.; Korban, S.S.; Ghabrial, S.A. Overexpression of GmCaM4 in soybean enhances resistance to pathogens and tolerance to salt stress. *Mol. Plant Pathol.* **2014**, *15*, 145–160. [[CrossRef](#)]
85. Thomas, N.C.; Hendrich, C.G.; Gill, U.S.; Allen, C.; Hutton, S.F.; Schultink, A. The Immune Receptor Roq1 Confers Resistance to the Bacterial Pathogens *Xanthomonas*, *Pseudomonas syringae*, and *Ralstonia* in Tomato. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Aoun, N.; Tauleigne, L.; Lonjon, F.; Deslandes, L.; Vaillau, F.; Roux, F.; Berthomé, R. Quantitative Disease Resistance under Elevated Temperature: Genetic Basis of New Resistance Mechanisms to *Ralstonia solanacearum*. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1–16. [[CrossRef](#)]
87. Hilleary, R.; Paez-Valencia, J.; Vens, C.; Toyota, M.; Palmgren, M.; Gilroy, S. Tonoplast-localized Ca²⁺ pumps regulate Ca²⁺ signals during pattern-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 18849–18857. [[CrossRef](#)]
88. Deslandes, L.; Olivier, J.; Peeters, N.; Feng, D.X.; Khounlotham, M.; Boucher, C.; Somssich, I.; Genin, S.; Marco, Y. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8024–8029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Plener, L.; Manfredi, P.; Valls, M.; Genin, S. PrhG, a transcriptional regulator responding to growth conditions, is involved in the control of the type III secretion system regulon in *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 1011–1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Guy, E.; Lautier, M.; Chabannes, M.; Roux, B.; Lauber, E.; Arlat, M.; Noël, L.D. xopAC-triggered Immunity against *Xanthomonas* Depends on *Arabidopsis* Receptor-Like Cytoplasmic Kinase Genes PBL2 and RIPK. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

91. Cerutti, A.; Jauneau, A.; Auriac, M.C.; Lauber, E.; Martinez, Y.; Chiarenza, S.; Leonhardt, N.; Berthomé, R.; Noël, L.D. Immunity at cauliflower hydathodes controls systemic infection by *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *Plant Physiol.* **2017**, *174*, 700–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Blanvillain, S.; Meyer, D.; Boulanger, A.; Lautier, M.; Guynet, C.; Denancé, N.; Vasse, J.; Lauber, E.; Arlat, M. Plant carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors: A feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e224. [[CrossRef](#)]
93. Larroque, M.; Belmas, E.; Martinez, T.; Vergnes, S.; Ladouce, N.; Lafitte, C.; Gaulin, E.; Dumas, B. Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity and resistance to the root pathogen *Phytophthora parasitica* in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 3615–3625. [[CrossRef](#)]
94. Deslandes, L.; Pileur, F.; Liaubet, L.; Camut, S.; Can, C.; Williams, K.; Holub, E.; Beynon, J.; Arlat, M.; Marco, Y. Genetic Characterization of *RRS1*, a Recessive Locus in *Arabidopsis thaliana* that Confers Resistance to the Bacterial Soilborne Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1998**, *11*, 659–667. [[CrossRef](#)]
95. Meyer, D.; Lauber, E.; Roby, D.; Arlat, M.; Kroj, T. Optimization of pathogenicity assays to study the *Arabidopsis thaliana*-*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathosystem. *Mol. Plant Pathol.* **2005**, *6*, 327–333. [[CrossRef](#)]
96. Xu, R.Q.; Blanvillain, S.; Feng, J.X.; Jiang, B. Le; Li, X.Z.; Wei, H.Y.; Kroj, T.; Lauber, E.; Roby, D.; Chen, B.; et al. AvrACXcc8004, a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 343–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Muoki, R.C.; Paul, A.; Kumari, A.; Singh, K.; Kumar, S. An improved protocol for the isolation of RNA from roots of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Mol. Biotechnol.* **2012**, *52*, 82–88. [[CrossRef](#)]
98. McCarthy, D.J.; Chen, Y.; Smyth, G.K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 4288–4297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Provar, N.; Tong, Z. A Browser-based Functional Classification SuperViewer for *Arabidopsis* Genomics. *Curr. Comput. Mol. Biol.* **2003**, 271–272.
100. Warde-Farley, D.; Donaldson, S.L.; Comes, O.; Zuberi, K.; Badrawi, R.; Chao, P.; Franz, M.; Grouios, C.; Kazi, F.; Lopes, C.T.; et al. The GeneMANIA prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 214–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Lewis, D.R.; Olex, A.L.; Lundy, S.R.; Turkett, W.H.; Fetrow, J.S.; Muday, G.K. A Kinetic Analysis of the Auxin Transcriptome Reveals Cell Wall Remodeling Proteins That Modulate Lateral Root Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2013**, *25*, 3329–3346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Zipfel, C.; Robatzek, S.; Navarro, L.; Oakeley, E.J.; Jones, J.D.G.; Felix, G.; Boller, T. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **2004**, *428*, 764–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Zipfel, C.; Kunze, G.; Chinchilla, D.; Caniard, A.; Jones, J.D.G.; Boller, T.; Felix, G. Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. *Cell* **2006**, *125*, 749–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Gust, A.A.; Biswas, R.; Lenz, H.D.; Rauhut, T.; Ranf, S.; Kemmerling, B.; Götz, F.; Glawischnig, E.; Lee, J.; Felix, G.; et al. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 32338–32348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Hanemian, M.; Barlet, X.; Sorin, C.; Yadeta, K.A.; Keller, H.; Favery, B.; Simon, R.; Thomma, B.P.H.J.; Hartmann, C.; Crespi, M.; et al. *Arabidopsis* CLAVATA1 and CLAVATA2 receptors contribute to *Ralstonia solanacearum* pathogenicity through a miR169-dependent pathway. *New Phytol.* **2016**, *211*, 502–515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer-Verlag: New York, NY, USA, 2016.
107. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1101–1108. [[CrossRef](#)]

Partie II : Résultats complémentaires non intégrés dans l'article Zhu, Mazard et al. (2021)

1) Avant-propos

Le travail effectué pendant cette thèse a fait partie intégrante du projet ANR CaPPTure (Interaction plante-pathogène: influence de la température et contribution de la signalisation calcium, 2018-2021) qui a principalement étudié la contribution des CMLs et l'impact d'une augmentation permanente de la température (3°C à 5°C) sur l'interaction d'*Arabidopsis* et de la tomate avec *Rs* et *Pst* en portant une attention particulière aux processus moléculaires contrôlés par les CMLs à travers l'identification de leurs cibles en aval. Ainsi le rôle de CML8 lors d'un stress combiné (infection par *Rs* à température élevée) et l'interaction potentielle de CML8 avec deux protéines « strictosidine synthase-like » ont été évalués. Dans la continuité des résultats obtenus par RNA-sequencing et des travaux présentés dans l'article Zhu, Mazard et al. (2021), la contribution de CML8 à la réponse de la plante contre deux champignons nécrotrophes et l'étude du rôle de sept gènes candidats, sélectionnés suite à l'analyse du transcriptome de la réponse de plantes transgéniques réprimant ou sur-exprimant *CML8* lors d'une cinétique précoce après infection par *Rs*, a été initiée.

2) Analyse des lignées transgéniques *CML8* infectées avec deux champignons nécrotrophes *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum*

D'après les résultats de notre analyse transcriptomique, la réponse de défense liée à CML8 correspondrait à une réponse immunitaire conférant une résistance à large spectre efficace contre différentes espèces de pathogènes. En quantifiant le développement des symptômes de maladie par analyse d'image, j'ai montré, par comparaison au phénotype de plantes contrôles sauvage (WT), que les plantes sur-exprimant et sous-exprimant *CML8* étaient respectivement moins sensibles et plus sensibles à l'infection par l'oomycète *Pc*. De façon intéressante, seules les plantes transgéniques sous-exprimant *CML8* sont apparues systématiquement plus sensibles à l'infection par *Xcc*. Ces derniers résultats ont été

confirmés par IGC (« Inoculum Growth Content ») où davantage de bactéries ont été quantifiés dans les plantes sous-exprimant *CML8*. Étonnamment, *Xcc* se multiplie moins dans les sur-expressesurs *CML8* sept jours après inoculation bien qu'aucune différence phénotypique n'ait été observée, suggérant que l'induction de l'expression contribue à la résistance à *Xcc*.

Dans la mesure où l'expression de *CML8* n'est pas limitée aux parties racinaires mais également retrouvée au niveau des tissus vasculaires et des cellules compagnes des feuilles (Zhu *et al.*, 2017), nous avons souhaité explorer plus en détail l'efficacité de cette résistance à large spectre face à d'autres microorganismes pathogènes présentant des cycles différents : les champignons foliaires nécrotrophes *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) et *S. sclerotiorum*. Les lignées sous- et sur-exprimant *CML8* ont ainsi été phénotypées avec ces deux autres pathogènes dans le cadre de travaux menés avec deux équipes présentes sur le campus, le LabCom BioPlantProtec LRSV/DE SANGOSSE pour les expériences avec *B. cinerea* et l'équipe « Immunité quantitative chez les plantes » dirigée par S. Raffaele du LIPME pour les expériences avec *S. sclerotiorum*.

B. cinerea est un champignon phytopathogène nécrotrophe classé deuxième dans le top 10 des pathogènes fongiques en termes de pertinence économique et scientifique et causant des maladies sur 200 espèces végétales (Dean *et al.*, 2012), en particulier les fruits et légumes frais. Ce microorganisme entraîne des pertes économiques allant de 10 à 100 milliards de dollars dans le monde et envahit presque toutes les parties des plantes, y compris les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits et les graines aux stades de pré- et post-récolte. Il provoque plusieurs symptômes de maladie : des taches foliaires, des brûlures des pousses ou des bourgeons, ou des chancre en fonction de la partie spécifique de la plante qui est infectée. Il induit aussi la pourriture grise, en conditions humides qui entraîne la perte des plantes infectées, et la pourriture noble, dans des conditions sèches qui peuvent avoir pour effet de rendre plus sucrés les grains de raisin (Hua *et al.*, 2018).

S. sclerotiorum est un champignon phytopathogène dévastateur avec une large gamme d'hôtes comprenant des plantes des familles Solanaceae, Cruciferae, Umbelliferae, Chenopodiaceae et Leguminosae. Ce microorganisme est un

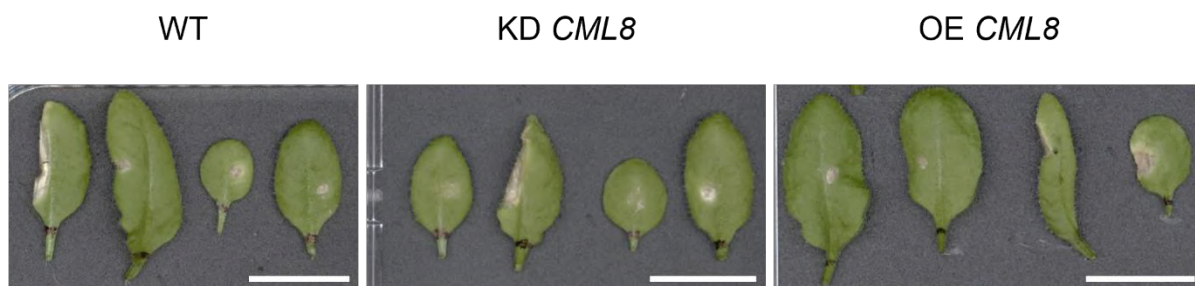


Figure 14. Analyse comparative des réponses des lignées transgéniques *CML8* après inoculation avec *B. cinerea*. Des plantes de 4 semaines des lignées transgéniques sous- (amiRNA 2.3.2 KD) et sur-exprimant (OECML8 2.3) *CLML8* et de la lignée sauvage (Col-8 WT) ont été inoculées avec 10 μ L de solution de spores de *B. cinerea* concentrée à 10⁵ spores. mL⁻¹ déposés sur les feuilles. Les photos ont été prises 10 jours après inoculation et sont représentatives des résultats obtenus lors de deux répliques biologiques indépendants. Barres d'échelle = 2 cm.

ascomycète avec un mode de vie nécrotrophe, sécrétant des enzymes et des toxines dégradants la paroi cellulaire végétale, telles que l'acide oxalique pour tuer les cellules hôtes (Smolińska & Kowalska, 2018; Wang *et al.*, 2019). Les maladies causées par *S. sclerotiorum* ont une distribution mondiale et sont généralement appelées pourriture de la tige sclérotique ou moisissure blanche. Aux États-Unis, les pertes annuelles causées par ce pathogène ont dépassé 200 millions de dollars. Par exemple, en 1999 aux États-Unis, la perte de récolte due à une épidémie de pourriture sclérotique sur les tournesols a été évaluée à 100 millions de dollars (Bolton *et al.*, 2006).

Lors des inoculations avec *B. cinerea*, des gouttes de 10 µL d'une solution de spores concentrée à 10⁵ spores/mL ont été déposées sur les feuilles de plantes sous- et sur-exprimant *CML8*. Pour chaque génotype, une variabilité importante dans la réponse des plantes a été observée, certaines feuilles ne développant aucun symptôme quand d'autres étaient fortement nécrosées. Malgré cela, aucune différence significative n'a été détectée dans le développement des symptômes entre les lignées transgéniques *CML8* et la lignée sauvage, suggérant que *CML8* ne semble pas jouer un rôle majeur et visible dans la réponse des différentes lignées transgéniques à ce champignon (Figure 14).

Lors des inoculations avec *S. sclerotiorum*, des plugs de milieu sur lequel a été cultivé le champignon ont été déposés sur les feuilles détachées des plantes des lignées transgéniques *CML8* et de la lignée sauvage correspondante Col-8. La lignée sauvage Col-0 a également été utilisée comme contrôle négatif de l'infection et pour vérifier que Col-8 se comportait de manière similaire. Une autre accession d'*Arabidopsis*, la lignée Rubezhnoe (Rub) a été employée comme contrôle positif dans la mesure où cette accession est plus sensible à l'infection par le champignon que les autres écotypes d'*A. thaliana*. Le développement des symptômes nécrotiques sur les feuilles a été suivi par prise automatisée de photos des feuilles inoculées toutes les 10 minutes pendant 72 heures selon le protocole mis en place par S. Raffaele. Chaque point sur la figure 15 représente pour chaque feuille les résultats du temps nécessaire au doublement de la taille de la lésion nécrotique provoquée par le champignon sur la feuille. Plus ce temps de doublement est

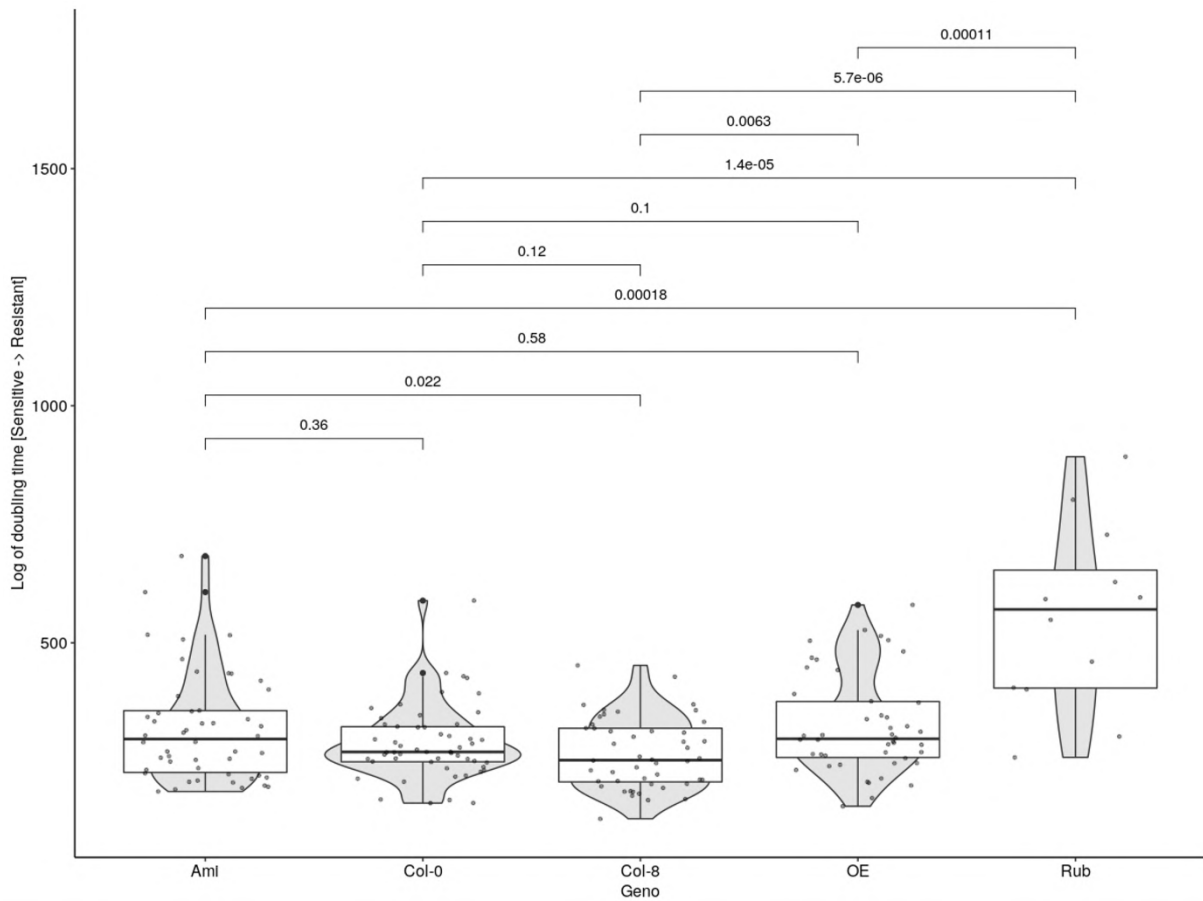


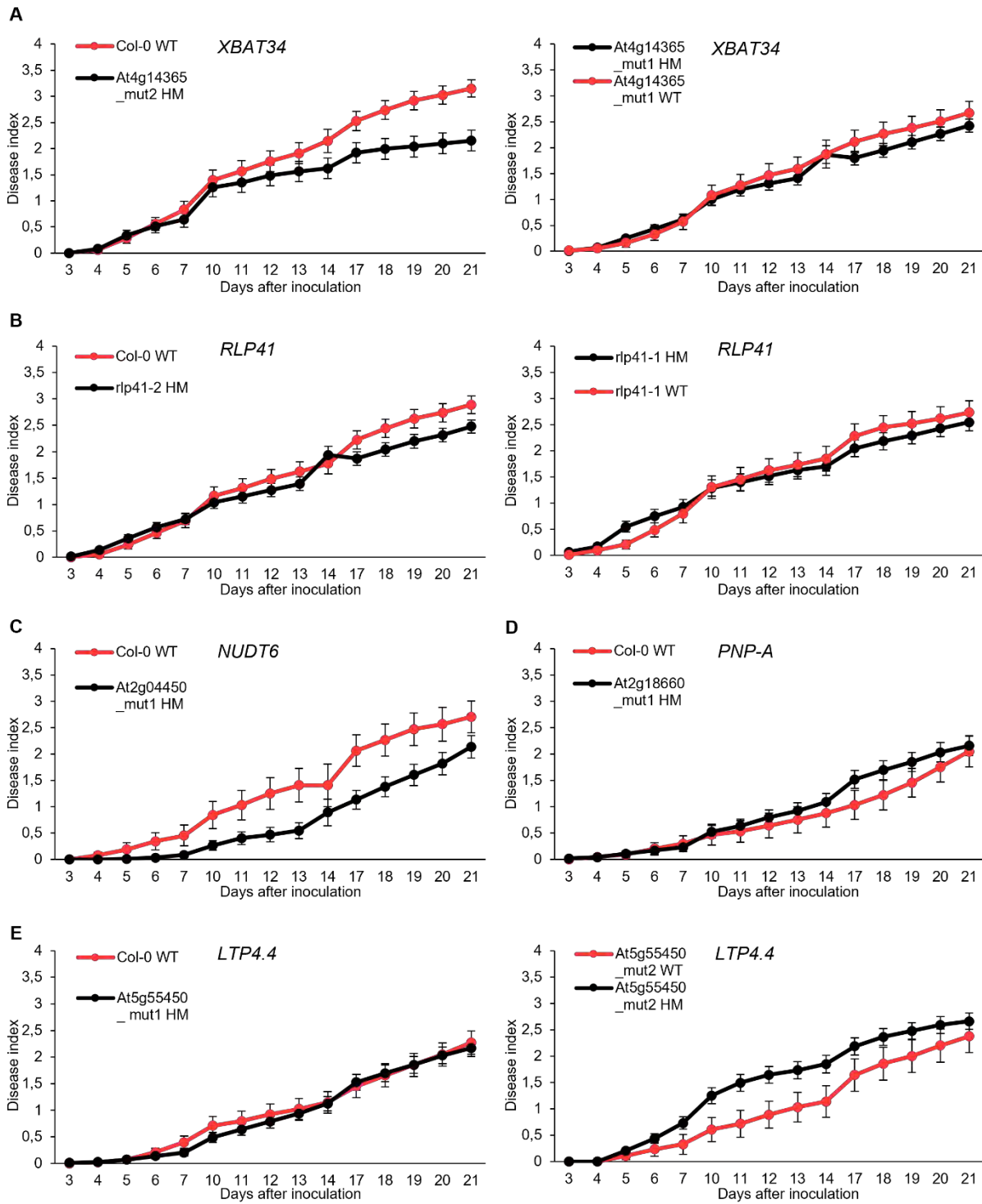
Figure 15. Analyse comparative des réponses des lignées transgéniques *CML8* après inoculation avec *S. sclerotiorum*. Des feuilles de plantes de 4 semaines des lignées transgéniques sous- (amiRNA 2.3.2 KD) et sur-exprimant (OECML8 2.3) *CLML8* et des lignées sauvages (Col-0, Rub, Col-8 WT) ont été inoculées avec des plugs de gélose sur laquelle a été cultivé *S. sclerotiorum*. Les boxplots représentent le temps de doublement de la liaison nécrotique provoquée par *S. sclerotiorum* sur les feuilles.

rapide, plus le génotype est considéré sensible à l'infection. Les résultats présentés dans la figure 15 correspondent à trois répliques biologiques indépendants. Les écotypes sauvages Col-0 et Rub se sont comportés comme attendus et les résultats obtenus pour le génotype sauvage Col-8 sont statistiquement semblables à ceux de Col-0. De la même façon, Col-8 est aussi significativement plus résistant que Rub, démontrant ainsi que les contrôles positifs et négatifs sont conformes aux données connues. En ce qui concerne les lignées KD et OE *CML8*, elles étaient toutes les deux légèrement plus sensibles que Col-8 mais elles n'ont pas été mises en évidence comme significativement différentes l'une de l'autre, indiquant que la sous- ou surexpression de *CML8* n'entraîne pas de différence majeure dans la réponse à *S. sclerotiorum* et dans le développement de la maladie (Figure 15).

Ainsi aucune différence n'a été détecté dans le développement des symptômes de maladie dans les conditions testées lors des infections avec les champignons nécrotrophes *S. sclerotiorum* et *B. cinerea*, suggérant que la réponse dépendante de *CML8* ne semble pas impliquée dans la défense contre ce type de pathogène.

3) Analyse des lignées mutantes correspondant aux gènes candidats sélectionnés par RNA-sequencing en réponse à l'infection par *Rs*

Afin de valider fonctionnellement les résultats obtenus lors de nos analyses du transcriptome, les gènes candidats formant des réseaux de co-expression et d'interaction ont été sélectionnés sur la base de la pertinence de la catégorie fonctionnelle à laquelle ils appartenaient, de leurs profils d'expression dans les racines et dans d'autres tissus où *CML8* est exprimé ainsi qu'en réponse à des stress biotiques. Sept gènes candidats dans notre étude ont donc été sélectionnés pour valider fonctionnellement les données de RNA-sequencing par des tests *in planta*. Après méta-analyses des données transcriptomiques correspondant à des études sur les stress biotiques disponibles dans Genevestigator, il est apparu que *RLP41*, *NUDT6*, *LTP4.4*, *XBAT34*, *PNP-A* sont tous fortement surexprimés en condition de stress biotiques. A l'inverse, *PDC1* est non-induit ou réprimé dans ces études mais



de manière intéressante, il est surexprimé dans des études où *CML8* est réprimé.

Des mutants d'insertion d'ADN-T potentiels ont été repérés dans les bases de données disponibles et les graines correspondantes ont été commandées au Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC ; <http://arabidopsis.info/>) en vue de leur génotypage afin de ne conserver que des plantes homozygotes pour les insertions. Néanmoins, il s'avère que les mutants disponibles ne présentaient pas tous des insertions d'ADN-T positionnées dans des exons. Certaines insertions sont donc localisées dans des introns ou dans les régions 5' UTR et 3' UTR, pouvant éventuellement expliquer les différences observées entre deux mutants alléliques d'un même gène dans les expériences de phénotypage ultérieures. Les plantes homozygotes pour les mutations ont ensuite été amenées à graines avant d'être phénotypées pour leur réponse à une infection par *Rs*. Pour cinq des gènes candidats, deux lignées mutantes alléliques indépendantes ont été testées. Par contre, pour les gènes *NUDT6* et *PNP-A*, un seul mutant a pu être obtenu.

Pour plusieurs des lignées testées, leur comportement suite à l'infection par *Rs* n'était pas différent de celui de la lignée sauvage correspondante. Ainsi, les plantes des deux mutants alléliques pour *RLP41* (Figure 16B), celles des deux mutants alléliques pour *JAL23* (Figure 16G), et celle du mutant allélique unique de *PNP-A* (Figure 16D) ont une apparition des symptômes de flétrissement comparables à celle des plantes sauvages. Ces résultats suggèrent que ces gènes ne jouent pas de rôle majeur dans les réponses immunitaires de la plante à *Rs* car leur potentielle absence n'impacte pas le déroulement et l'issue de l'infection. Pour les autres gènes candidats étudiés, des réponses différentes ont été obtenues pour les deux mutants alléliques de ces gènes. Ainsi, le mutant 2 pour *LTP4.4* était le seul à être plus sensible que la lignée sauvage correspondante lors de l'inoculation avec la bactérie (Figure 16E), ce qui semblerait indiquer que ce gène pourrait être un gène de résistance, son absence rendant les plantes plus sensibles à l'infection par *Rs*.

Ces résultats sont néanmoins à pondérer par le fait que le second mutant allélique testé pour *LTP4.4* se comportait de manière identique au sauvage (Figure 16E). A l'inverse, le mutant 1 pour *PDC1* (Figure 16F) et le mutant 2 pour *XBAT34*

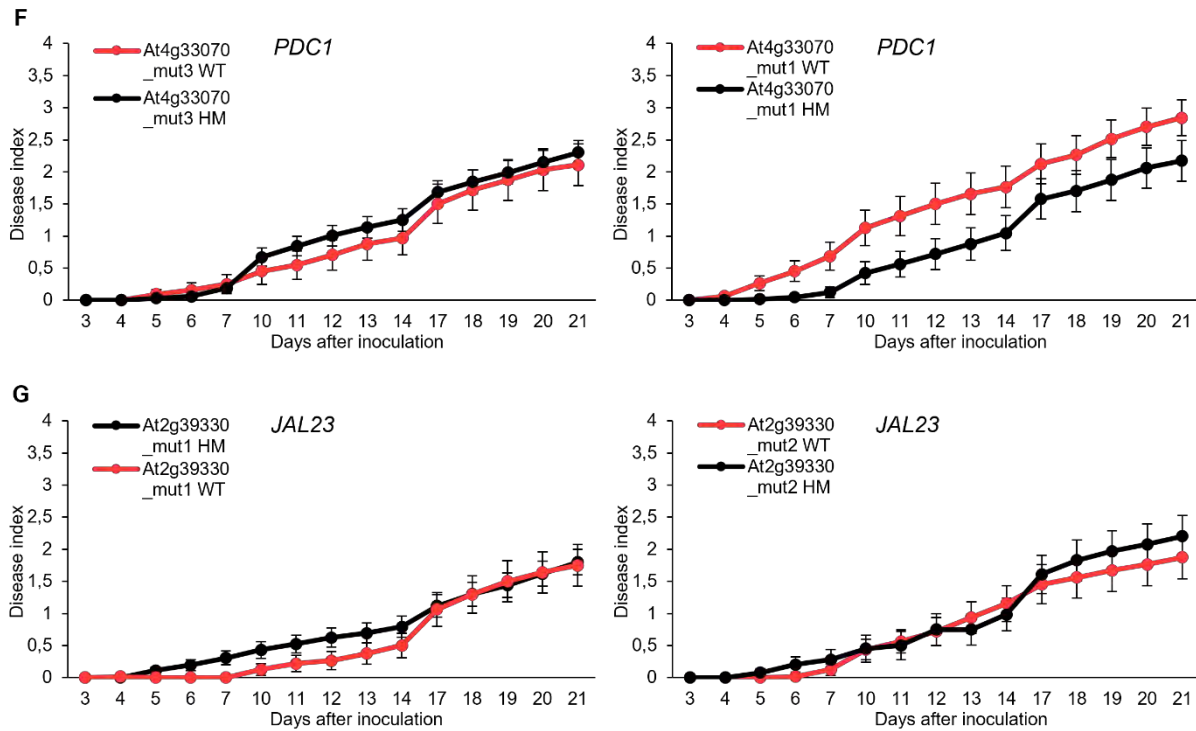


Figure 16. Analyse comparative des réponses des lignées mutantes pour les gènes candidats sélectionnés suite à l'analyse RNA-seq après inoculation avec *Rs*. Des plantes de 4 semaines des lignées transgéniques mutantes homozygotes de (A) *XBAT34*, (B) *RLP41*, (C) *NUDT6*, (D) *PNP-A*, (E) *LTP4.4*, (F) *PDC1* et (G) *JAL23*, et des lignées sauvages (Col-0 WT) ont été inoculées avec une solution bactérienne de la souche GMI1000 de *Rs* de concentration 10^8 bactéries/mL. Le score de l'indice de maladie a été enregistré de 3 jours à 21 jours après inoculation. Un indice de maladie de « 0 » signifie aucun symptôme, alors qu'un indice de maladie de « 4 » signifie que toutes les feuilles des plantes présentent des symptômes de flétrissement. Barres d'erreurs = SEM de 2 à 3 réplicas biologiques indépendants. Les courbes rouges représentent les plantes sauvages et les courbes noires représentent les plantes mutantes.

(Figure 16A) étaient plus résistants à l'infection que les lignées sauvages correspondantes. Cependant, les plantes des deux autres mutants alléliques testés pour ces gènes ne différaient pas des sauvages. Les plantes du mutant allélique unique testée pour *NUDT6* (Figure 16C) étaient également plus résistantes à l'infection par *Rs* que celles de la lignée sauvage. Si les mutants pour ces trois gènes étaient tous plus résistants à *Rs* que les lignées sauvages, les profils de leurs courbes de flétrissement n'étaient pas identiques. En effet, la courbe du mutant 2 pour *XBAT34* commençait par suivre celle du sauvage avant de se séparer après 10 jours après infection et d'être plus basse que celle du sauvage jusqu'à la fin de l'inoculation (Figure 16A), alors que les courbes du mutant 1 pour *PDC1* et du mutant unique pour *NUDT6* sont toujours plus basses que celles des sauvages du début à la fin de l'inoculation (Figures 16F et 16C). Ces résultats suggèrent que ces gènes pourraient être des facteurs de susceptibilité. En effet, si la bactérie a besoin de les manipuler pour un bon établissement de la maladie, leur absence aura pour conséquence de rendre les plantes plus résistantes à *Rs*. L'ensemble de ces résultats, obtenus à la fin de mon projet, sont intéressants mais restent très préliminaires. L'impact des insertions devra être confirmé par des RT-qPCR permettant d'évaluer l'ampleur de la modification de l'expression du gène par l'insertion d'ADN-T. D'autre part, les expériences de phénotypage avec *Rs* sont fortement dépendantes de conditions micro-environnementales des chambres de cultures, obligeant à répéter ces expériences entre trois à quatre fois sur des effectifs importants (30 plantes). Enfin, une analyse statistique des résultats de phénotypage reste à faire.

Le projet ANR CaPPTure dans lequel s'est intégré ce travail de thèse est composé de plusieurs axes de travail. L'un d'entre eux consiste à évaluer la contribution de la signalisation calcique dans les réponses immunitaires des plantes en fonction de la température. Dans ce but, la participation de CML8 aux défenses de la plante lors d'une infection par *Rs* à deux températures différentes a été examinée. Un autre axe du projet ANR a pour but d'analyser les processus moléculaires directement contrôlés par les CMLs et cela en recherchant leurs

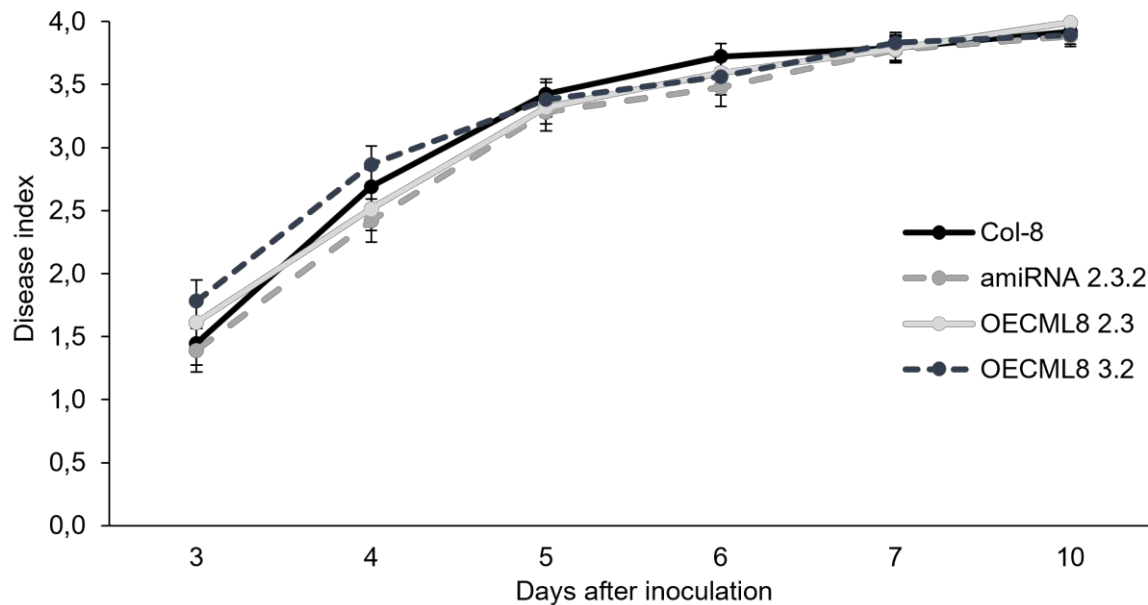


Figure 17. Analyse comparative de réponse des lignées transgéniques CML8 après inoculation de *Rs* à 30°C. Des plantes de 4 semaines des lignées transgéniques WT (Col-8), sous- (amiRNA 2.3.2) et sur-exprimant CML8 (OECML8 2.3 et OECML8 3.2) ont été inoculées avec la souche GMI1000 de *Rs*. Le score de l'indice de maladie a été enregistré de 3 jours à 10 jours. Un indice de maladie de « 0 » signifie aucun symptôme, alors qu'un indice de maladie de « 4 » signifie que toutes les feuilles des plantes présentent des symptômes de flétrissement. Barres d'erreurs = SEM de 3 réplicas biologiques indépendants.

interactants directs par une stratégie de levure double-hybride à haut débit. La même méthode de levure double-hybride a été employée pendant ma thèse pour tester l'interaction entre CML8 et deux protéines candidates.

4) Analyse des lignées transgéniques CML8 lors d'un stress combiné

De nombreuses études impliquant divers pathosystèmes ont montré une inhibition des mécanismes de résistance lors d'un stress thermique (augmentation de température de 3°C à 7°C) (Aoun *et al.*, 2017; Desaint *et al.*, 2021). En ce qui concerne les réponses à *Rs*, il a été montré par Aoun *et al.* (2017) que la plupart des écotypes d'*Arabidopsis* résistants à *Rs* à la température classique d'infection (27°C) deviennent sensibles à une température plus élevée de quelques degrés (30°C).

Comme montré précédemment, les lignées sous- et sur-exprimant *CML8* sont respectivement plus sensibles et plus résistantes à l'infection par *Rs* à 27°C que la lignée sauvage. Ainsi pour évaluer si les réponses dépendantes de *CML8* à *Rs* sont affectées par une élévation des conditions température, les différentes lignées altérées dans l'expression de *CML8* ont été inoculées avec la souche GMI1000 de *Rs* à 30°C. De façon intéressante, à 30°C, les lignées sous- et sur-exprimant *CML8* se comportent différemment de lors des expériences réalisées à 27°C. Comme dans la majeure partie des expériences de phénotypage réalisées à 30°C, l'apparition des symptômes de flétrissement et le développement de la maladie sur des plantes sensibles est plus rapide à 30°C (1 jour de décalage) (Figure 17).

Par contre, toutes nos lignées présentent le même comportement à 30°C, toutes étant sensibles à *Rs* (Figure 17). Ces résultats suggèrent que la résistance médiée par l'induction de l'expression de *CML8* est efficace lors d'une infection par *Rs* à 27°C mais qu'elle est altérée à 30°C comme beaucoup des mécanismes de défenses des plantes à *Rs*, notamment les mécanismes dépendants de RRS1-R/RPS4 (Aoun *et al.*, 2017).

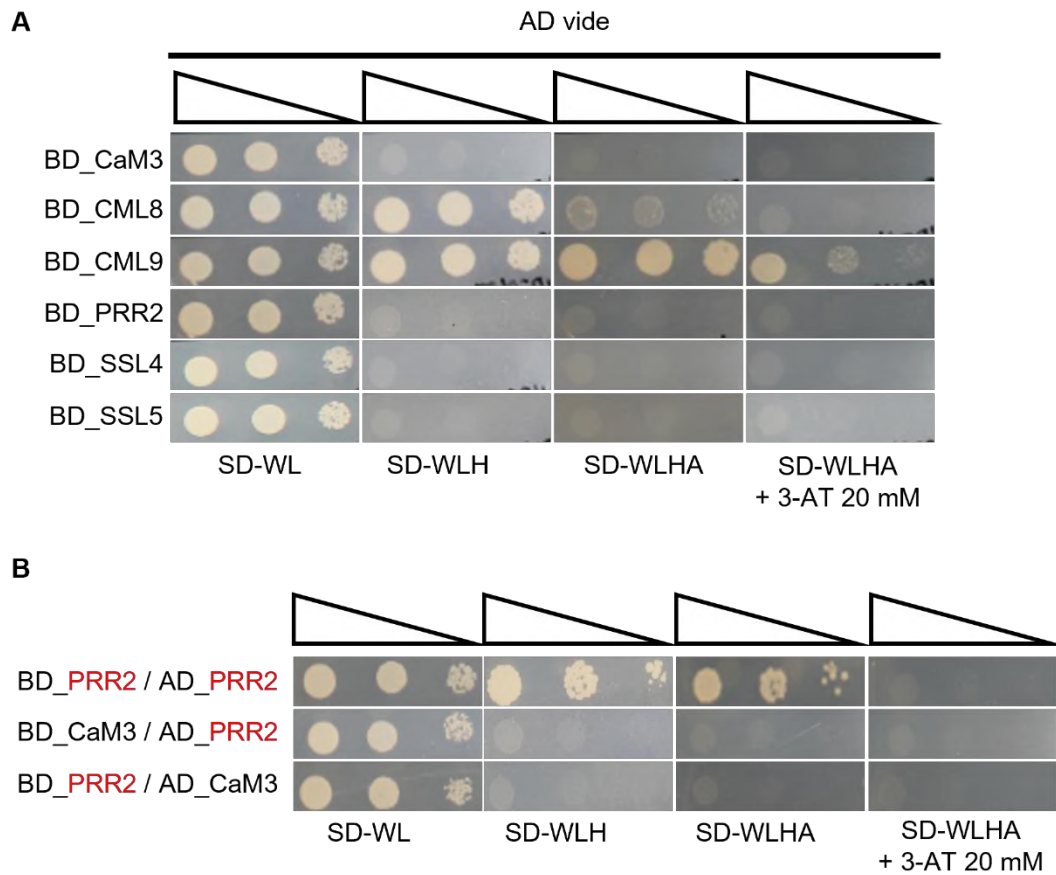


Figure 18. Tests d'auto-activation de levure double-hybride (A) et tests d'interactions positives et négatives (B). Les levures sont cultivées pendant deux à trois jours à 28°C dans des conditions sélectives de co-transformation (SD-WL) ou d'interaction (-WLH, -WLHA). Des dilutions en série de cellules transformées (DO = 1, 0,1, 0,01) sont indiquées par des triangles vides se rétrécissant. **(A)** Tests d'auto-activation. Interactions en levure double-hybride utilisant la souche de levure AH109 co-transformée avec des constructions contenant CaM3, CML8, CML9, PRR2, SSL4 et SSL5 en configuration BD avec le plasmide AD vide. **(B)** Tests de contrôle d'interaction positive et négative utilisant BD_PRR2 et AD_PRR2 comme contrôle positif et BD_CaM3 et AD_PRR2 et BD_PRR2 et AD_CaM3 comme contrôles négatifs (Perochon *et al.*, 2010).

5) Etude de l'interaction entre CML8 et deux « strictosidine synthase-like » (SSL)

Comme les protéines CML n'ont pas de fonction intrinsèque connue en dehors de la liaison au Ca^{2+} , il est crucial d'identifier leurs protéines partenaires afin de comprendre leurs fonctions. À ce jour, très peu de cibles des CMLs ont été identifiées et un effort particulier a été fait au cours du projet ANR pour tenter d'identifier des cibles de CMLs chez *Arabidopsis* en utilisant une stratégie de levure double-hybride à haut débit en partenariat avec la plateforme SPOmics (Paris-Saclay) qui dispose d'une banque de données de 12 000 protéines d'*Arabidopsis*. Dans le même temps, lors d'une étude d'association à l'échelle du génome (GWAS), un QTL impliqué dans les premières réponses de défense des plantes contre *Rs* à 30°C a été identifié. Deux gènes de ce QTL, *SSL4* et *SSL5* appartenant à une famille de quatre gènes codant pour des protéines de type strictosidine synthase, ont été validés fonctionnellement et se sont révélés impliqués dans la réponse de défense précoce de la plante contre *Rs* à 30 °C (Aoun *et al.*, 2017). De manière intéressante, ces deux protéines possèdent dans leurs séquences d'acides aminés des domaines prédits de liaison à la CaM en position 201-219. L'hypothèse a donc été émise que *SSL4* et *SSL5* pourraient être des cibles directes de CML8 et l'analyse de ces interactions potentielles a donc été réalisée par la méthode du double-hybride (Y2H). La spécificité de l'interaction avec CML8 a été évaluée en cherchant des interactions potentielles avec CML9 et la CaM3.

Les différents cadres de lecture de chaque ADNc ont été insérés dans le vecteur Gateway Y2H et nous avons d'abord vérifié si ces constructions sont responsables d'une activation de la transcription du gène rapporteur sans liaison à une protéine partenaire (Figure 18A). Ni PRR2, un contrôle positif de l'interaction, ni *SSL4*, *SSL5* et CaM3 n'ont été capables d'auto-activer la transcription car aucune levure n'a poussé sur les milieux sélectifs (SD-WLH ou -WLHA). En revanche, CML8 et CML9 se sont révélées auto-activatrices dans ces conditions. Le faux signal a été inhibé avec 20 mM de 3-AT (3-Amino-1,2,4-Triazol), un inhibiteur compétitif de la transcription utilisé pour empêcher l'auto-activation. Cette méthode a fonctionné pour CML8 mais fut moins concluante pour CML9. Pour valider ces conditions

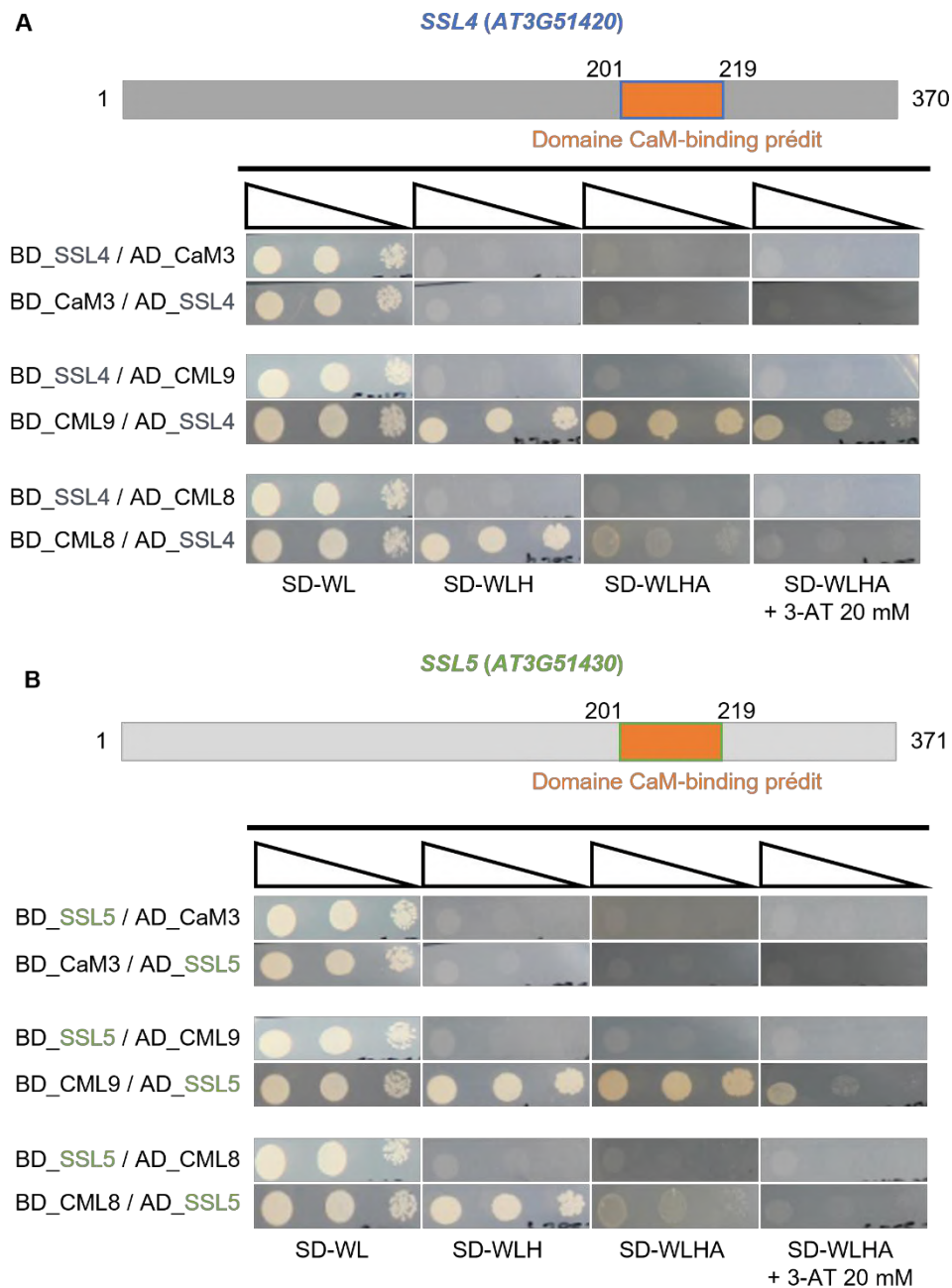


Figure 19. Tests d'interaction par levure double-hybride entre SSL4 et SSL5 avec CaM3, CML9 et CML8. Les levures sont cultivées pendant deux à trois jours à 28°C dans des conditions sélectives de co-transformation (SD-WL) ou d'interaction (-WLH, -WLHA). Des dilutions en série de cellules transformées (DO = 1, 0,1, 0,01) sont indiquées par des triangles vides se rétrécissant. **(A)** Représentation schématique de la protéine SSL4 et de la position du domaine prédit de liaison à la CaM. Interactions par levure double-hybride utilisant la souche de levure AH109 co-transformée avec des constructions contenant SSL4, CaM3, CML8, CML9 dans les configurations BD et AD comme indiqué. **(B)** Représentation schématique de la protéine SSL5 et de la position du domaine prédit de liaison à la CaM. Interactions par levure double-hybride utilisant la souche de levure AH109 co-transformée avec des constructions contenant SSL5, CaM3, CML8, CML9, dans les configurations BD et AD comme indiqué.

expérimentales, des tests d'interaction ont ensuite été réalisés à l'aide de contrôles positifs et négatifs sur la base des résultats obtenus dans le groupe (Perochon *et al.*, 2010). Comme attendu, PRR2 peut interagir avec lui-même mais ne peut pas interagir avec CaM3. En effet, les levures co-transformées avec BD_PRR2/AD_PRR2 (BD : « Binding Domain » ; AD : « Activation Domain ») ont proliféré sur les milieux sélectifs mais pas les levures co-transformées avec BD_CaM3/AD_PRR2 et BD_PRR2/AD_CaM3 (Figure 18B).

Ensuite, l'interaction de SSL4 et SSL5 avec la CaM3, CML9 et CML8 a été testée. Les levures co-transformées avec CaM3 et SSL4 ou SSL5 dans les configurations AD et BD ne se sont pas développées sur un milieu sélectif suggérant que CaM3 n'interagit pas avec les protéines SSL (Figures 19A et 19B). Quant aux levures co-transformées avec CML9 et CML8 fusionnées au domaine BD et SSL4 et SSL5 fusionnées au domaine AD, elles ont poussé sur les milieux sélectifs, légèrement mieux pour celles co-transformées avec CML9, suggérant une interaction potentielle mais faible de SSL4 et SSL5 avec CML8 et une interaction plus forte avec CML9. Cependant, considérant que CML9 et CML8 sont des auto-activateurs, les constructions AD et BD ont été échangées pour valider ces résultats. Après l'échange, l'interaction vue auparavant n'a pas été reproduite car les levures co-transformées avec SSL4 et SSL5 dans BD et CML9 et CML8 dans AD ne se sont pas développées sur les milieux sélectifs (Figures 19A et 19B). Par conséquent, il semble que ni CML8 ni CML9 n'interagissent directement avec SSL4 ou SSL5 chez la levure dans les conditions testées. Il est cependant difficile en l'état de conclure sur une interaction éventuelle, le double-hybride ne permettant de détecter que des interactions directes et fortes, et l'interaction de CML8 avec d'éventuelles cibles étant probablement faible et très dynamique. D'autres méthodes, comme le BioID permettent d'identifier ce type d'interaction dynamique et labile (Roux *et al.*, 2018) et seraient donc pertinentes à développer pour tester l'interaction de CML8 avec d'éventuelles cibles.

Partie III : Discussion

Des précédents résultats avaient démontré l'induction de l'expression de *CML8* au niveau des feuilles d'*Arabidopsis* et son importance dans les réponses immunitaires de la plante à la bactérie pathogène foliaire *Pst* (Zhu *et al.*, 2017). La régulation transcriptionnelle, forte et localisée de *CML8* au niveau de l'émergence des racines latérales, point d'entrée de pathogènes dans la plante notamment la bactérie tellurique *Rs*, a été à l'origine de l'hypothèse que *CML8* pouvait également contribuer à la mise en place de mécanismes de défense contre *Rs* au niveau des racines. En effet, de manière similaire à *Pst*, la surexpression de *CML8* a été montrée comme conférant une meilleure résistance à *Rs* tandis que la sous-expression de *CML8* a résulté en une plus grande sensibilité des plantes à l'infection par la bactérie. Ces résultats sont donc à l'origine de l'analyse transcriptomique réalisée pour identifier les mécanismes moléculaires dépendant de *CML8* et contrôlant la réponse de défense de la plante à *Rs*. Cette analyse, réalisée par RNA-sequencing sur des temps courts après infection et en se focalisant uniquement sur le compartiment racinaire, a ainsi révélé que la réponse immunitaire dépendante de *CML8* était précoce et relevait très probablement d'une résistance basale à large spectre.

1) Est-ce que *CML8* pourrait être une protéine multifonctionnelle face à des pathogènes de différents types trophiques ?

Pour tester cette hypothèse, les lignées transgéniques *CML8* ont été phénotypées contre la bactérie foliaire vasculaire biotrophe *Xcc*, l'oomycète racinaire hemibiotrophe *Pc*, et les champignons foliaires nécrotrophes *B. cinerea* et *S. sclerotiorum*. Les résultats de ces phénotypages ont montré que *CML8* était un régulateur positif des réponses de défense des plantes contre *Xcc* et *Pc* mais pas contre *B. cinerea* et *S. sclerotiorum*, indiquant que *CML8* participerait à la résistance à large spectre mais en fonction du mode d'infection des pathogènes.

Cependant, des méthodes fiables d'évaluation de la gravité de la maladie sont d'une importance capitale dans l'étude des interactions phytopathogènes.

L'évaluation visuelle des symptômes bien qu'efficace ne peut pas toujours permettre de distinguer des phénotypes de résistance subtils notamment dans les phases précoces de l'infection. Ainsi il est possible que la contribution de CML8 à la réponse immunitaire contre *B. cinerea* n'ait pas été observée au niveau phénotypique mais qu'un test de pathogénicité basé sur la quantification relative de l'ADN fongique et végétal dans les feuilles infectées d'*A. thaliana* au moyen de qPCR (Gachon & Saindrenan, 2004) permettrait de suivre quantitativement la croissance de *B. cinerea* dans les lignées transgéniques CML8.

Néanmoins, CML8 serait actif contre des pathogènes biotrophes et hémibiotrophes mais pas ou peu contre des pathogènes nécrotrophes. Ces résultats sont cohérents avec les données de transcriptomiques et les résultats obtenus avec *Pst*, qui ont montré que la réponse liée à CML8 était dépendante du SA (Zhu *et al.*, 2017). En effet il est connu que les réponses immunitaires contre les biotrophes et hémibiotrophes sont liés à la production et aux voies de signalisation du SA qui sont antagonistes de celles du JA impliquées dans la défense de l'hôte contre les nécrotrophes (Pieterse *et al.*, 2012). De façon intéressante, la signalisation du SA a été montrée comme altérée à température élevée (Velásquez *et al.*, 2018; Desaint *et al.*, 2021).

2) Est-ce que CML8 pourrait être une protéine multifonctionnelle lors de stress combinés ?

La contribution de la protéine CML8 d'*A. thaliana* lors d'une attaque par *Rs* dans des conditions de température élevée a également été étudiée. En effet, CML8 a été montrée comme impliquée dans la réponse de défense des plantes à cette bactérie à 27°C. Un des objectifs de mon projet était donc d'étudier le rôle de CML8 lors de stress combinés, lorsque des plantes, soumises à une augmentation de température de 3°C en conditions contrôlées (27°C à 30°C) étaient aussi infectées par *Rs*. Les résultats de phénotypage obtenus ont montré qu'à cette température, les phénotypes différentiels des lignées transgéniques CML8 observés à 27°C n'étaient pas conservés car toutes les lignées développent les mêmes symptômes

de flétrissement au même rythme mais plus rapidement qu'à 27°C, suggérant que la voie de signalisation dépendante de CML8 et impliqué dans la résistance à *Rs* est perturbée à des températures élevées. L'effet drastique d'une élévation de la température conduisant à une plus grande sensibilité d'une majorité d'accessions d'*A.thaliana* en réponse à *Rs* à 30°C a déjà été observé et décrit pour de nombreux autres pathosystèmes (Aoun *et al.*, 2017, 2020; Desaint *et al.*, 2021). Il conduit notamment à l'inhibition de la résistance à *Rs* médiée par le couple d'immunorécepteurs RPS4/RRS1-R (Aoun *et al.*, 2017). Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène restent mal connus. Pour ce pathosystème, des travaux sont en cours dans l'équipe REACH (LIPME, INRAE, Toulouse) et explorent l'impact d'une élévation sur les deux partenaires de l'interaction à température élevée.

3) Est-ce que les gènes dont l'expression semble dépendre de CML8 lors d'une infection sont impliqués dans la réponse de la plante à *Rs* ?

Dans le but de valider fonctionnellement les résultats obtenus dans notre analyse transcriptomique, sept gènes candidats remplissant des critères de co-expression, de localisation d'expression tissulaire prédite et de pertinence fonctionnelle, ont été sélectionnés. Il s'agit de *RLP41*, *NUDT6*, *LTP4.4*, *XBAT34*, *PNP-A*, *PDC1* et *JAL23*. Pour cela, des lignées transgéniques mutantes pour ces gènes ont été sélectionnées et génotypées avant d'être phénotypées pour évaluer leur contribution dans la réponse des plantes à une inoculation par *Rs*. Dû à des fortes variabilités lors des expériences liées au dysfonctionnement du laboratoire de quarantaine, les phénotypages ont été rendus difficiles. Les insertions des ADN-T (ADN de Transfert) dans les mutants des gènes candidats sélectionnés ne sont pas toutes positionnées dans des exons. Même s'il reste difficile de tirer des conclusions en l'absence d'étude du profil d'expression des gènes sélectionnés potentiellement mutés dans ces différents mutants, ces différences dans les sites d'insertion phénotypage pourraient expliquer la variabilité des résultats obtenus en phénotypage, notamment entre deux mutants alléliques indépendants pour un même gène. Par exemple, contrairement au mutant 2, le mutant 1 de *XBAT34* n'a

pas été observé plus résistant que le sauvage à l'infection par *Rs*. Or, dans ce mutant, l'ADN-T est inséré au niveau du promoteur du gène, ce qui pourrait ne pas nécessairement résulter en un KO de l'expression du gène mais pourrait potentiellement altérer son expression, conduisant soit à une répression, soit à une surexpression du gène. Un phénomène similaire peut expliquer l'absence de phénotype pour le mutant allélique de *PNP-A* dont l'insertion est localisée dans un intron du gène et donc potentiellement épissé lors de l'épissage de l'ARN messenger sans impacter l'expression du gène. En ce qui concerne les gènes *RLP41* et *JAL23* pour lesquelles aucun phénotype n'a été observé lors des inoculations avec *Rs* avec deux lignées alléliques mutantes indépendantes dont les insertions de ADN-T sont de plus situées dans des exons, il est possible que la redondance fonctionnelle ait empêché d'observer un effet chez des mutants simples. En effet, les familles des RLP et des JAL sont composées de 56 et 48 membres, respectivement (Nagano *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

4) Quelles sont les protéines interagissant avec CML8 ?

CML8, comme les autres CMLs et CaMs, sont des protéines liant le Ca^{2+} et agissant uniquement comme des senseurs devant donc interagir avec d'autres protéines pour moduler l'activité des protéines et déclencher une réponse (Cheval *et al.*, 2013). Un moyen de mieux comprendre la fonction de CML8 lors d'une infection par *Rs* est d'identifier ses cibles en aval. Deux gènes, *SSL4* et *SSL5*, codant pour des protéines ayant une activité de type strictosidine synthase et un domaine putatif de liaison à la CaM, ont été identifiés comme des gènes de susceptibilité conférant une résistance à *Rs* à 30 °C lorsqu'ils sont mutés (Aoun *et al.*, 2017). Il a donc été spéculé que CML8 pouvait potentiellement interagir avec *SSL4* et/ou *SSL5*, interaction qui pourrait être modulée par les bactéries pendant le processus d'infection. À cette fin, un test d'interaction par levure double-hybride a été développé. L'interaction de *SSL4* et *SSL5* a également été testée avec CML9, un membre de la famille proche de CML8, et avec CaM3, une CaM typique, pour évaluer la spécificité de l'interaction. Cependant, l'interaction entre CML8 et *SSL4* ou *SSL5* n'a pas pu être formellement établie dans les conditions testées. Il est

possible que l'interaction recherchée ne puisse pas avoir lieu dans la levure mais puisse se produire dans les cellules végétales, ou que les niveaux de concentration de Ca^{2+} dans la levure ne soient pas suffisants pour que l'interaction se produise. Cependant, nous n'avons pas détecté d'interaction de SSL4 ou SSL5 avec la CaM3, ce qui suggère que le domaine de liaison à la CaM prédit par la base de données www.calcium.uhnres.utoronto.ca pourrait ne pas être fonctionnel.

Actuellement, plusieurs approches sont développées dans l'équipe pour décrypter le rôle des CMLs, et en particulier de CML8, dans la réponse de la plante aux stress biotiques et abiotiques. Une stratégie de criblage global d'interaction en levure double-hybride à haut débit pour identifier les cibles de plusieurs CMLs d'*Arabidopsis*, dont CML8 a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Claire Lurin au laboratoire IPS2 (Paris Saclay). Les mêmes problèmes d'auto-activation des CMLs ont rendu compliqués l'obtention de résultats et très peu d'interactants ont été identifiés par cette méthode (un seul interactant identifié pour CML10 et CML11, deux interactants identifiés pour CML40, et 15 interactants identifiés pour CML39, la seule des neuf CMLs testées à ne pas avoir été auto-activatrice). Ce criblage n'a permis d'identifier aucun interactant pour CML8. Ainsi, une autre approche de co-immunoprécipitation de CML8 *in planta* est développée par Amandine Lucchin en thèse dans l'équipe (2019-2022). Ce travail a permis d'identifier les cibles de CML8 au cours du développement racinaire et la même méthode pourra être utilisée pour la recherche des interactants de CML8 en lien avec l'immunité végétale. D'autres méthodes, complémentaires, pourraient également permettre de tester ce type d'interaction : *in vitro* avec la thermophorèse ou *in planta* avec la complémentarité fluorescente bimoléculaire ou le BiOLD.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Partie I : Rôle de l'auxine dans l'interaction entre la bactérie Rs avec la plante

A. thaliana

1) Avant-propos

Le rôle de CML8 lors de l'interaction *A. thaliana*-*Rs* et la localisation de son expression au niveau de l'émergence des racines latérales (Zhu *et al.*, 2017), qui sont des points d'accumulation de l'auxine endogène de la plante, nous ont conduit à nous intéresser au rôle de l'auxine dans les processus immunitaires liés à CML8 lors d'une l'infection par *Rs*, notamment l'auxine produite par la bactérie. En effet, la production d'IAA a été décrite chez de nombreuses bactéries telles que *Xcc*, *Pantoea agglomerans*, *Dickeya* spp., *Pst*, *Agrobacterium* spp. (Fett *et al.*, 1987; Glickmann *et al.*, 1998; Manulis *et al.*, 1998; Jameson, 2000; Barash & Manulis-Sasson, 2007; Spaepen & Vanderleyden, 2011; Crépin *et al.*, 2012; McClerklin *et al.*, 2018).

Les rôles de cette auxine bactérienne sont variés. Ainsi, *Agrobacterium tumefaciens* intègre les gènes *tmr* et *tms* responsables de la synthèse des CK et de l'auxine dans les cellules de la plante hôte, induisant une prolifération anarchique des cellules et la formation de galles (Zhu *et al.*, 2000). Il a également été démontré que l'IAA bactérienne, notamment celle produite par les PGPRs (« Plant-Growth Promoting Rhizobacteria »), telles que *Azospirillum* spp., peut favoriser la croissance des plantes en impactant le développement des racines des plantes (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Spaepen *et al.*, 2007). D'autres études ont également montré que des mutants de la bactérie *Pst* pour un gène codant l'enzyme indole-3-acétaldéhyde déshydrogénase qui intervient dans la synthèse de l'IAA ont été inoculés sur *A. thaliana*. La croissance des bactéries a été montrée comme diminuée dans la plante au cours de l'infection, indiquant que l'IAA bactérienne contribue à la virulence de *Pst* sur *Arabidopsis* notamment en supprimant les défenses induites par le SA (McClerklin *et al.*, 2018).

Chez *Rs*, la biosynthèse de l'IAA a été démontrée dès 1967 mais uniquement chez la souche K60 appartenant au phylotype IIA. En ce qui concerne la souche sauvage GMI1000 appartenant au phylotype I, son séquençage a montré, grâce à la

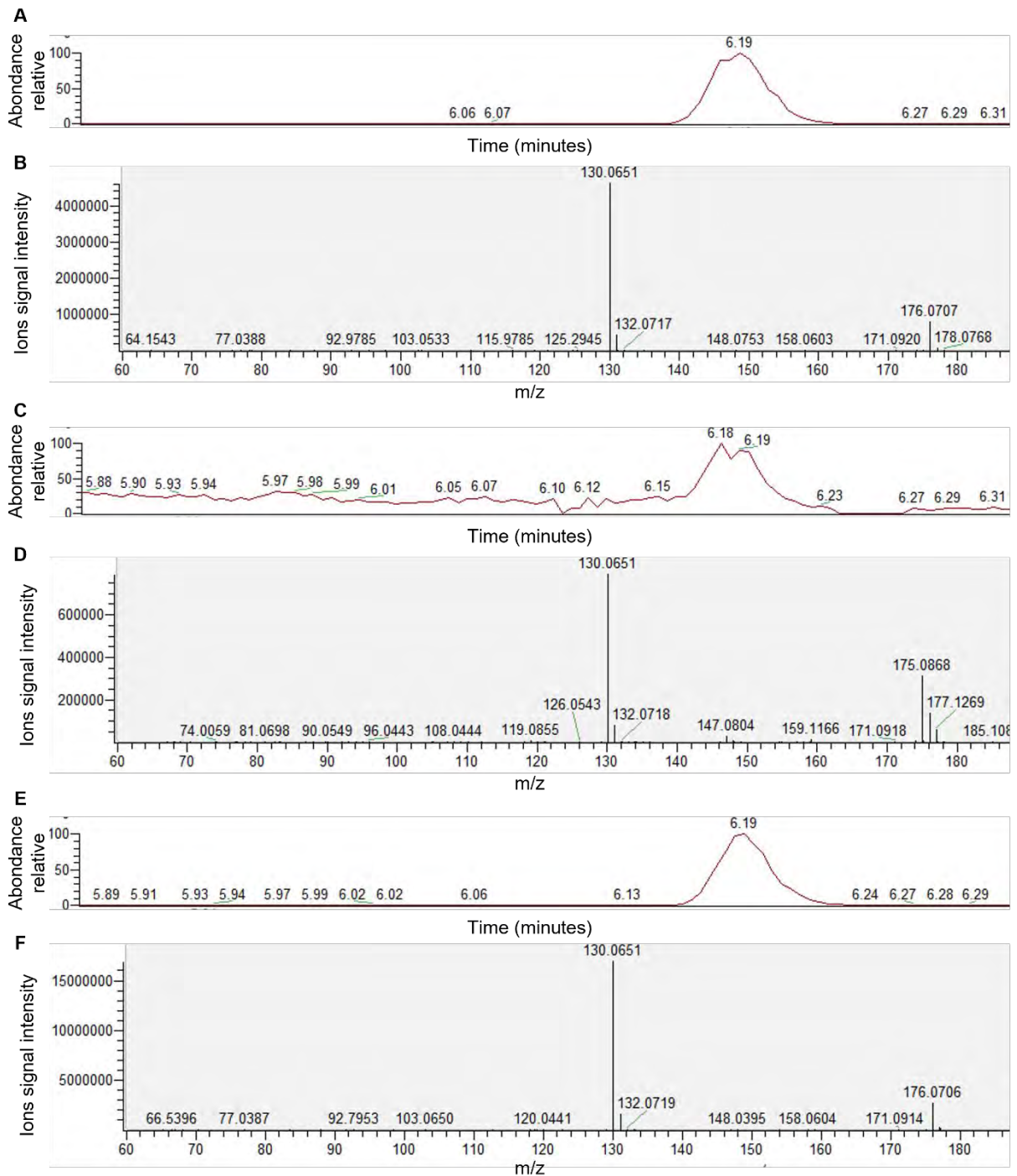


Figure 20. Détection d'auxine (IAA) dans les milieux de culture de *Rs* analysés par LC-MS/MS. Chromatogrammes du standard de l'IAA (**A**), et d'extraits obtenus à partir de milieu de culture Phi en absence de bactéries (**C**) et en présence de *Rs* souche K60 (**E**) et GMI1000 (**G**), et d'extraits obtenus à partir de milieu de culture minimum en absence de bactéries (**I**) et en présence de *Rs* souche GMI1000 (**K**). Spectres du standard de l'IAA (**B**), et d'extraits obtenus à partir de milieu de culture Phi en absence de bactéries (**D**) et en présence de *Rs* souche K60 (**F**) et GMI1000 (**H**), et d'extraits obtenus à partir de milieu de culture minimum en absence de bactéries (**J**) et en présence de *Rs* souche GMI1000 (**L**). (**M**) Schéma de fragmentation de l'ion IAA présentant l'ion pleine taille (m/z = 176,0706) et l'ion fragmenté ayant perdu le groupement carboxyle (m/z = 130,0651).

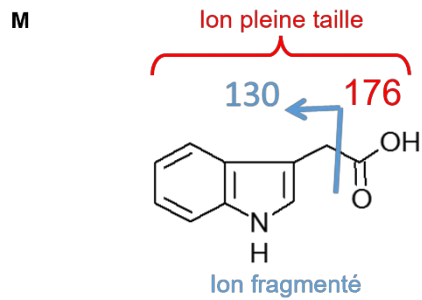
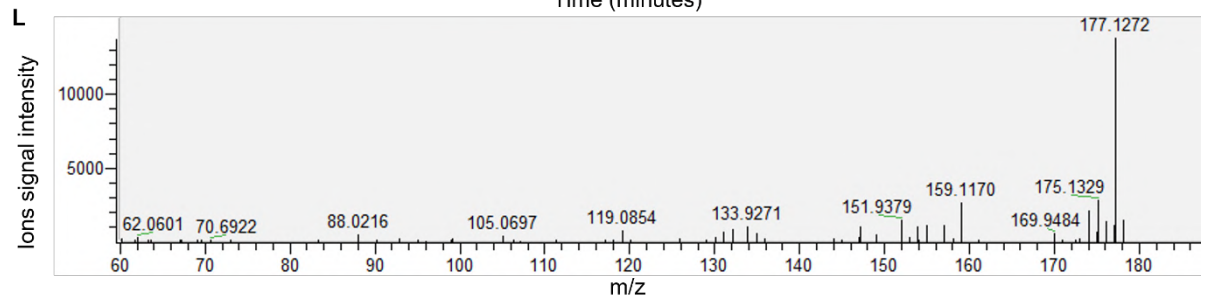
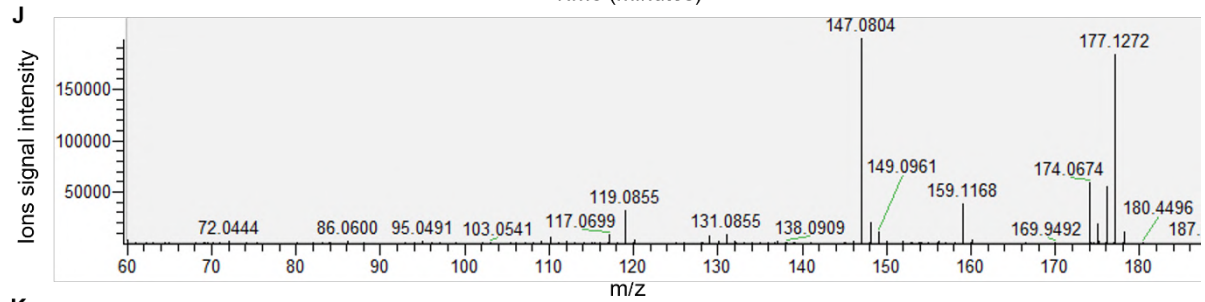
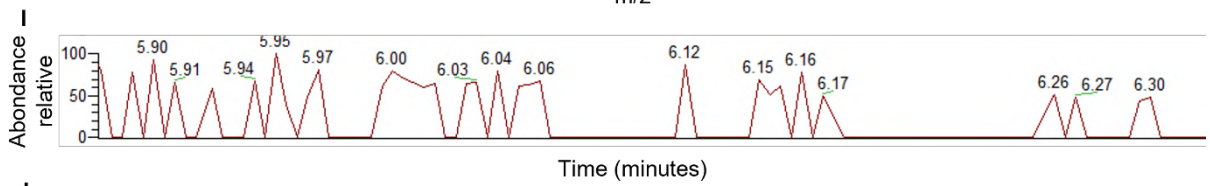
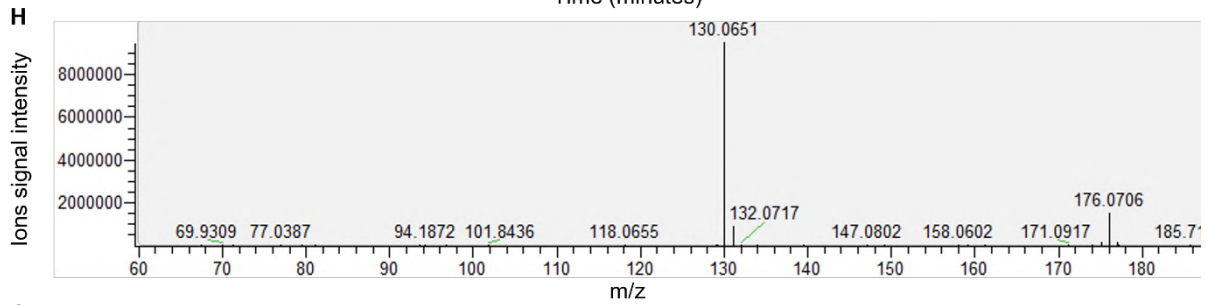
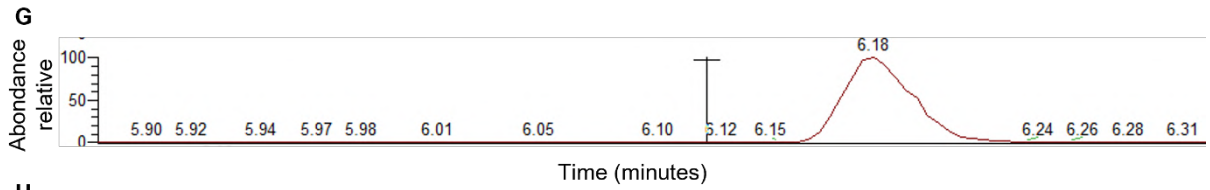
recherche de gènes orthologues chez GMI1000 des gènes de biosynthèse de l'auxine chez les plantes, qu'il était possible que cette souche puisse aussi synthétiser l'auxine ainsi qu'une autre hormone végétale, l'éthylène. Ces gènes ont été originellement classés comme des gènes candidats responsables de la pathogénie chez GMI1000 (Salanoubat *et al.*, 2002). La seule étude à ce jour ayant cherché à savoir si GMI1000 produit de l'IAA est Valls *et al.* (2006) qui a utilisé le dosage colorimétrique de Salkowski pour détecter l'IAA dans les milieux de culture de *Rs*. Cette méthode caractérise la production d'IAA comme le rapport OD_{530}/OD_{600} de la culture bactérienne. Or si cette méthode permet effectivement d'identifier des molécules indoliques, elle n'est pas spécifique de l'IAA (Glickmann & Dessaux, 1995).

Ainsi, afin de confirmer de manière définitive ce résultat, nous avons cherché, dans un premier temps, à démontrer grâce à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) que la souche sauvage GMI1000 de *Rs* produit de l'IAA. Dans un second temps, nous avons regardé l'effet de cette IAA sur les plantes puis nous avons cherché à déterminer si l'IAA était un facteur de virulence de la bactérie grâce à des souches de *Rs* mutées sur des gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'IAA. Enfin, nous avons évalué si l'IAA pouvait induire l'expression des gènes de virulence de *Rs* et influencer la croissance de la bactérie.

Ce travail a été fait en collaboration avec Stéphane Genin. Les expériences ont été réalisées avec l'aide de Julia Audabram lors de son stage de Licence 3 Professionnelle et de Patrick Barberis qui a généré les souches mutantes de *Rs*, de Sylvie Fournier de la plateforme Metatoul pour les analyses de LC-MS/MS et de l'entreprise iMEAN pour la reconstitution *in silico* des voies de biosynthèse de l'IAA chez *Rs*.

2) Détection de la production d'IAA par *Rs*

Dans le but de formellement détecter si la souche sauvage GMI1000 de *Rs* était capable de biosynthétiser et de sécréter dans son milieu de culture l'IAA, la



méthode de la LC-MS/MS a été utilisée. Cette méthode est la même que celle employée par Phelps & Sequeira (1967) pour extraire et identifier l'IAA à partir du surnageant de la souche K60 de *Rs*. Ainsi, nous avons utilisé la souche K60 comme témoin dans la mesure où cette souche produit de l'IAA (Phelps & Sequeira, 1967). Des milieux de culture bactériens riche ou pauvre dans lesquels les souches K60 et GMI1000 de *Rs* ont été cultivées, ont été centrifugés et filtrés pour éliminer les bactéries. Après centrifugation, les surnageants ont été collectés et les composés auxiniques ont été extraits en utilisant une méthode de partitionnement à base d'acétate d'éthyle. Puis les solutions ont été évaporées sous flux d'azote pour concentrer les produits avant de les analyser en LC-MS/MS. L'identification de l'auxine a été réalisée par comparaison avec des temps de rétention chromatographiques et des mesures de masses exactes spécifiques à l'IAA avec ceux des composés standards commerciaux. De plus, le mode MS/MS permet de fractionner la molécule d'intérêt en des composés de masses moléculaires moins importantes mais également détectables qui sont aussi spécifiques à une molécule, ce qui permet de conforter l'identification de la molécule recherchée. Ainsi, l'IAA a un temps de rétention de 6,18-6,19 minutes et une masse de 176,07. En mode MS/MS, on retrouve un composé dérivé de l'IAA à une masse de 130,06 (Figures 20A et 20B). Dans les milieux de culture sans bactérie (Figures 20C et 20D), le signal perçu correspond au bruit de fond d'une contamination, non à la détection de l'IAA.

Lorsque les souches K60 et GMI1000 ont été cultivées en milieu riche, la molécule détectée sur les chromatogrammes (Figures 20E et 20G) et les spectres (Figures 20F et 20H) correspond aux caractéristiques de l'IAA. En revanche, sur ceux du témoin sans bactéries, les pics propres à l'IAA sont absents donc en l'absence de bactéries, le milieu de culture ne contient pas d'IAA. Le résultat de Phelps et Sequeira avec la souche K60 a ainsi pu être répliqué et la production d'IAA par la souche GMI1000 démontré. Le milieu riche utilisé pour cultiver les bactéries contenant du Trp, le précurseur de l'IAA, un autre milieu dit minimum ne contenant pas de Trp a été testé pour analyser si la production d'IAA chez GMI1000 était dépendante du Trp. En milieu minimum, la LC-MS/MS n'a pas révélé de production d'IAA par *Rs* (Figures 20K et 20L). En revanche, lorsque ce même milieu minimum a

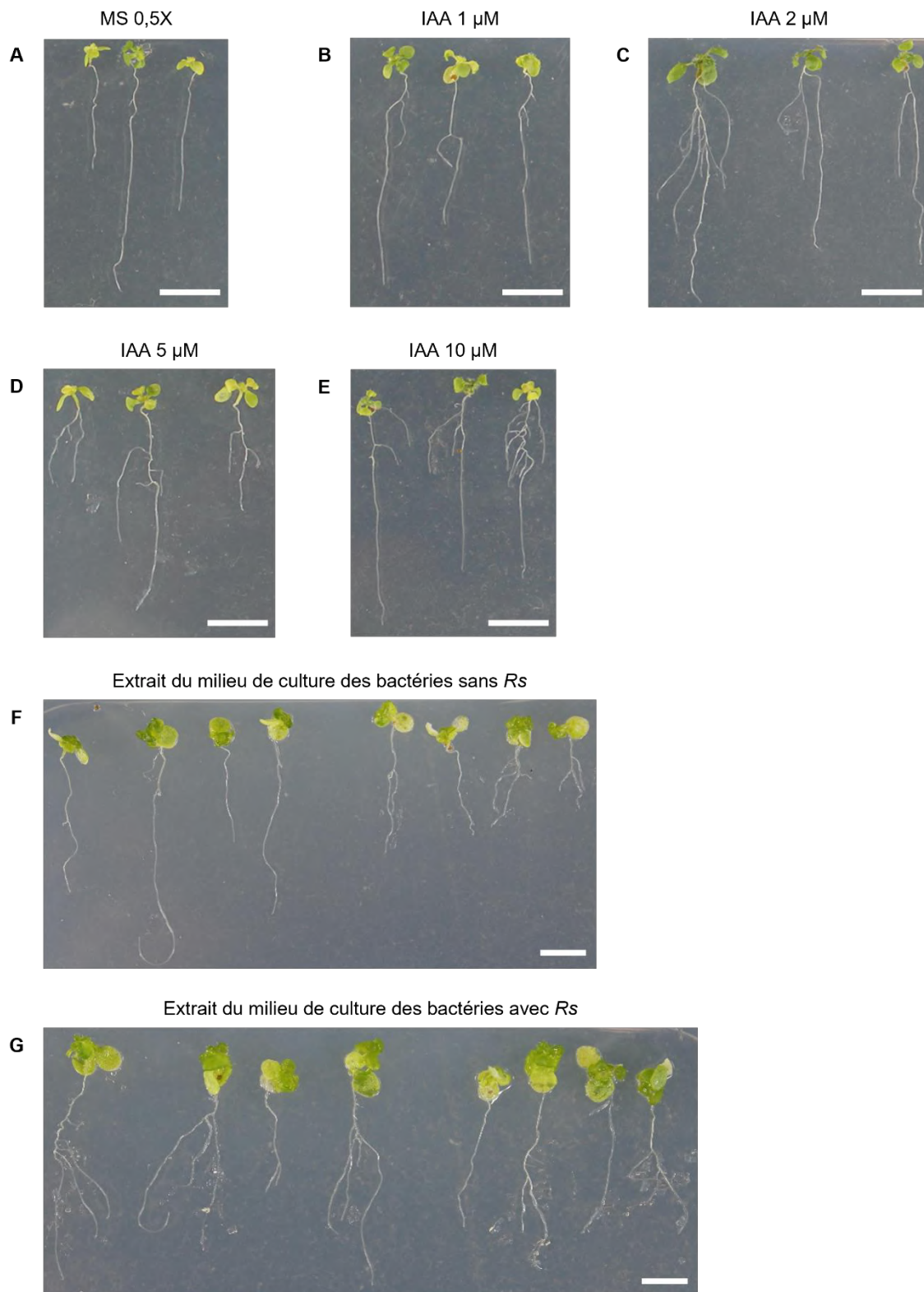


Figure 21. Effet des extraits du milieu de culture bactérien contenant de l'auxine produite par *Rs*. Des plantules d'*A. thaliana* âgées d'une semaine ont été mises en culture sur du milieu MS 0,5X puis transférées sur du milieu MS 0,5X en présence ou non de concentrations croissantes d'IAA et des extraits du milieu de culture bactérien dans lequel ont poussé *Rs* souche GMI1000 ou non. Les photos ont été prises après une semaine. Echelle = 1 cm.

été complétement avec du Trp, la production d'IAA par les bactéries était restaurée, indiquant que la biosynthèse de l'IAA chez *Rs* serait tryptophane-dépendante.

3) Effet de l'auxine de *Rs* sur l'architecture racinaire d'*A. thaliana*

Afin de vérifier que l'IAA produite par *Rs* et détectée dans les milieux de culture bactériens est fonctionnelle, les extraits de ces milieux de culture ont été testés sur des plantules d'*Arabidopsis* dans le but d'analyser leur capacité à induire des réponses auxiniques classiques sur les plantes, comme la production de racines latérales.

Comme contrôle positif, plusieurs concentrations d'IAA commercial (de 1 μM à 10 μM) ont été appliquées pour vérifier l'efficacité du biotest. En absence d'IAA (condition MS 0,5X seul), la racine principale se développe et aucune émergence de racines latérales n'a été observée au bout de sept jours. Cependant, comme attendu en présence d'IAA, une augmentation du nombre de racines latérales a été observée à toutes les concentrations d'IAA appliquées et ce, dès 1 μM , après sept jours (Figures 21A-21E). En ce qui concerne les extraits du milieu de culture des bactéries, si les plantes traitées avec les extraits sans bactérie ont développé des racines latérales, c'était de façon moins importante qu'en présence des extraits qui ont contenu des bactéries. Ce résultat indique que dans les milieux de culture ayant accueillis des bactéries et où l'IAA a été détectée par LC-MS/MS, cette dernière serait fonctionnelle et présenterait une activité biologique stimulant le développement des racines latérales.

4) Analyse de l'induction de gènes de virulence bactériens par l'auxine

Pour tester l'effet de l'IAA sur l'expression de gènes de virulence de la bactérie, un dosage de l'activité β -galactosidase a été opéré sur les souches GMI1425 (HrpG::LacZ) et GMI1475 (HrpB::LacZ) traitées avec différentes concentrations d'IAA commerciale (0 μM , 1 μM , 5 μM et 10 μM). Ces souches bactériennes sont génétiquement modifiées et portent une construction

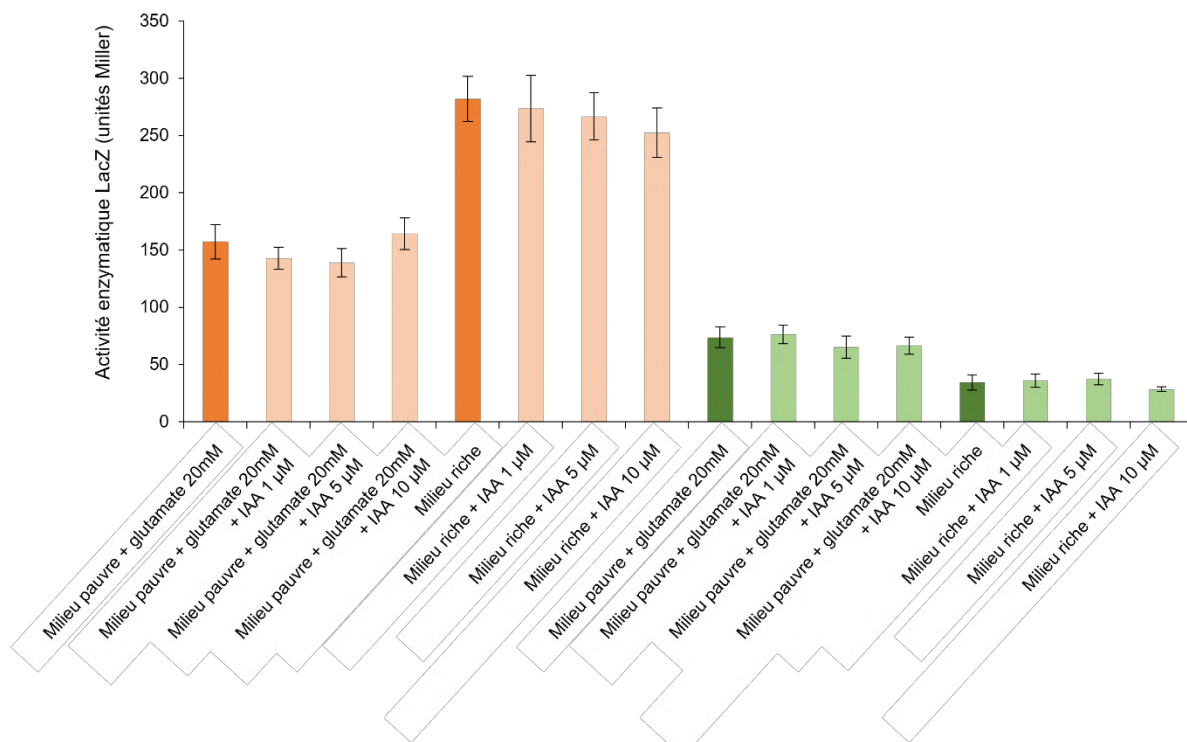


Figure 22. Effet d'un traitement auxinique sur l'expression des principaux régulateurs de virulence HrpB et HrpG de *Rs*. Dosages enzymatiques de l'activité β -galactosidase chez les souches GMI1425 HrpG::LacZ (orange) et GMI1475 HrpB::LacZ (vert) de *Rs*. HrpG et HrpB sont des régulateurs des gènes de virulence de la bactérie, notamment du système de sécrétion de type III. Les souches ont été mises en culture pendant 24 heures dans du milieu riche ou du milieu pauvre + glutamate 20mM additionnés de différentes concentrations d'IAA (1 μ M, 5 μ M et 10 μ M). Les barres d'erreur correspondent à cinq répliques biologiques indépendants.

comprenant les promoteurs des gènes *hrpG* et *hrpB* et la séquence codante du gène rapporteur de la β -galactosidase qui permettent de suivre l'expression de ces gènes de virulence. HrpG est un régulateur de la transcription et joue un rôle clé dans la mise en place de la virulence bactérienne. Il induit notamment *hrpB* qui active l'expression de gènes du système de sécrétion de type III. Une analyse de l'activité β -galactosidase permet de tester l'activation de ces gènes après un traitement avec de l'IAA à de multiples concentrations.

Les niveaux d'expression de *hrpG* et *hrpB* sont dépendants des deux milieux de culture utilisés, selon qu'ils soient riche ou pauvre. Cette différence sert de contrôle au bon déroulement de l'expérience. En effet, le niveau d'expression de *hrpG* est systématiquement plus élevé que celui de *hrpB* dans les deux milieux. De plus, *hrpG* est plus exprimé dans le milieu riche que dans le milieu pauvre complémenté avec 20 mM de glutamate. C'est l'inverse pour *hrpB* qui est plus exprimé dans le milieu pauvre complémenté avec 20 mM de glutamate que dans le milieu riche. Les résultats obtenus correspondent à ceux attendus de GMI1425 et GMI1475 (Brito *et al.*, 1999), ce qui valide le protocole expérimental (Figure 22). En ce qui concerne l'effet des différentes concentrations d'IAA sur l'expression de *hrpG* et *hrpB*, leurs niveaux d'expression n'étaient pas significativement différents, quelle que soit la concentration d'IAA ajoutée dans le milieu (1 μ M, 5 μ M ou 10 μ M) ainsi qu'en absence d'IAA, indiquant que l'IAA n'a pas d'effet sur la régulation de l'expression des gènes de virulence *hrpG* et *hrpB* (Figure 22).

5) Analyse de la croissance bactérienne après un traitement exogène d'auxine

Dans l'objectif d'élucider le rôle de l'IAA pour la bactérie elle-même, l'effet d'un traitement auxinique sur la croissance de plusieurs souches de *Rs* a été analysé à l'aide de deux méthodes. La première méthode a consisté à relever manuellement la densité optique à 600 nm des cultures bactériennes à 0, 4, 8, 24 et 28 heures après le traitement avec deux concentrations d'IAA (1 μ M et 5 μ M). La deuxième méthode utilise un appareil permettant de suivre en temps réel la croissance des

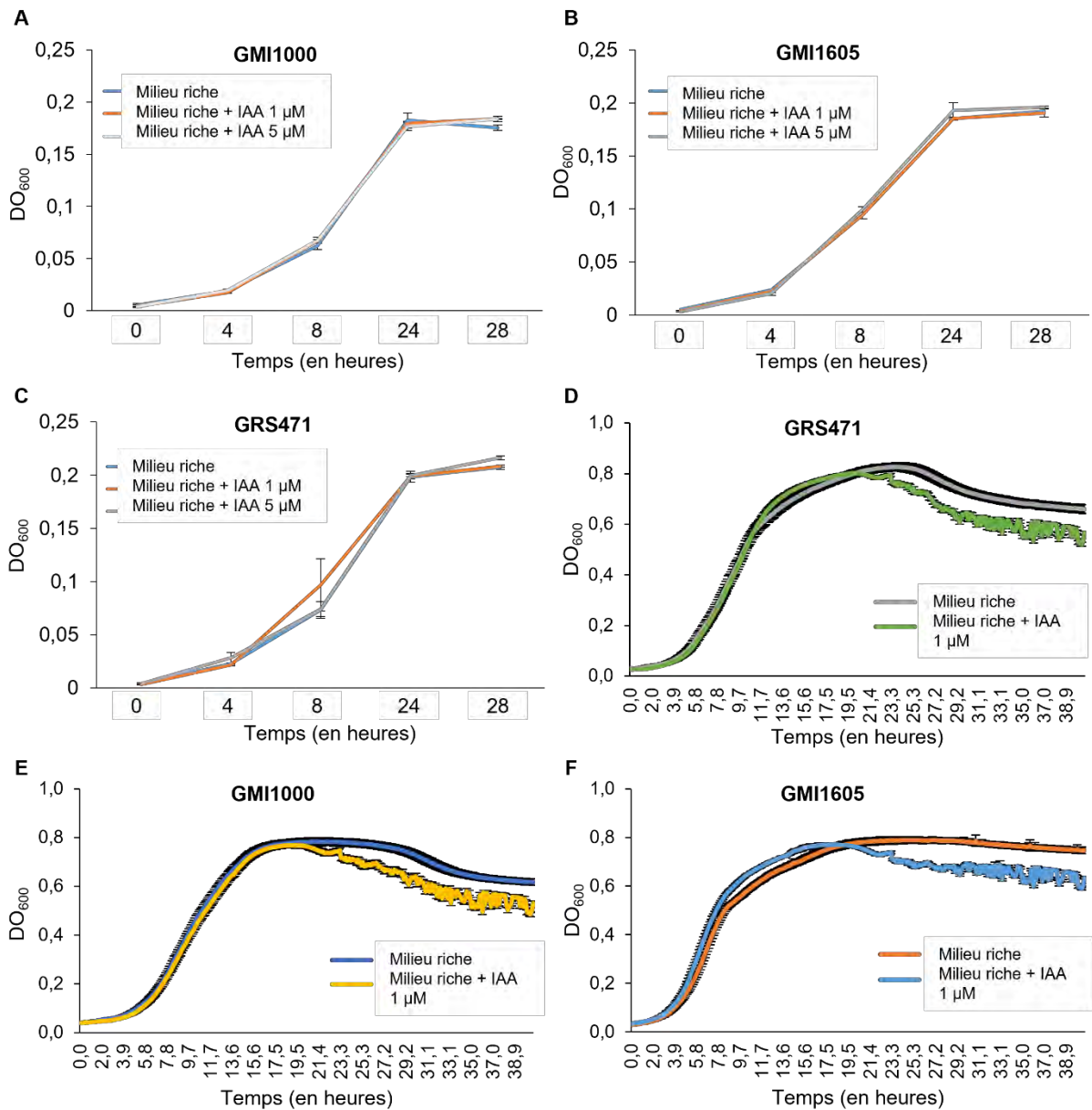


Figure 23. Effet d'un traitement auxinique sur la croissance bactérienne de *Rs*. Cinétique de croissance des souches GMI1000 (A), GMI1605 (B) et GRS471 (C) de *Rs* cultivées en milieu riche seul (courbe bleue) et en milieu riche additionné d'IAA 1 μM (courbe orange) et 5 μM (courbe grise) avec la méthode manuelle. La DO à 600 nm a été mesurée à 0, 4, 8, 24, 28 heures après le début de la culture. Les barres d'erreur correspondent à trois réplicas biologiques indépendants. Cinétique de croissance des souches GMI1000 (E), GMI1605 (F) et GRS471 (D) de *Rs* cultivées en milieu riche seul et en milieu riche additionné d'IAA 1 μM de manière automatisée. La DO à 600 nm a été mesurée toutes les 6 minutes pendant 48 heures après le début de la culture. Les barres d'erreur correspondent à cinq réplicas techniques.

bactéries en effectuant une mesure de la densité optique à 600 nm des cultures bactériennes toutes les six minutes pendant 48 heures afin d'obtenir une cinétique précise de croissance des bactéries. L'effet de plusieurs concentrations d'IAA sur différentes souches de *Rs* a ainsi été testé. Les souches utilisées étaient la souche sauvage GMI1000, et les souches mutantes GMI1605 et GRS471, qui sont mutées sur des gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'IAA. En effet, la souche GMI1605 est mutée pour le gène *phcA*, un régulateur global du métabolisme et de la virulence chez *Rs* (Genin *et al.*, 2005). PhcA contrôle les gènes responsables de la biosynthèse des exopolysaccharides. Des mutations dans *PhcA* induisent des changements phénotypiques majeurs, notamment la production de colonies non-muqueuses contrairement à la souche sauvage (Peyraud *et al.*, 2018). PhcA fait partie de la famille des régulateurs transcriptionnels LysR qui contrôle la conversion de phénotype (Brumbley *et al.*, 1993). L'autre souche testée était GRS471 qui est délétée dans un opéron de synthèse alternative de tryptophane, entre les gènes RSp0679 et RSp0685 : ces gènes codent notamment pour une diaminopimelate décarboxylase et une indole-3-glycérol phosphate synthase. RSp0681 est le gène d'une anthranilate phosphoribosyl transférase, une enzyme qui intervient dans la synthèse de tryptophane. Ils sont tous activés par HrpG (Peyraud *et al.*, 2018).

En absence d'IAA, les courbes de croissance bactérienne observées étaient classiques, c'est-à-dire qu'elles comprenaient une phase de latence, une phase de croissance exponentielle et une phase stationnaire pour les trois souches de *Rs* testées quelle que soit la méthode employée. Pour les courbes de croissance des bactéries mises en cultures avec 1 μ M et 5 μ M d'IAA obtenues avec la méthode manuelle, elles n'étaient pas statistiquement différentes des courbes obtenues en absence d'IAA (Figures 23A, 23B, 23C). Pour les courbes de croissance des bactéries mises en cultures avec 1 μ M d'IAA obtenues avec la méthode automatisée, elles étaient superposées aux courbes obtenues sans IAA au moment des phases de latence et des phases de croissance exponentielle avant de se différencier pendant les phases stationnaires et de décliner plus rapidement pour les trois souches de *Rs* testées. Le traitement à l'IAA semblerait donc induire une phase de

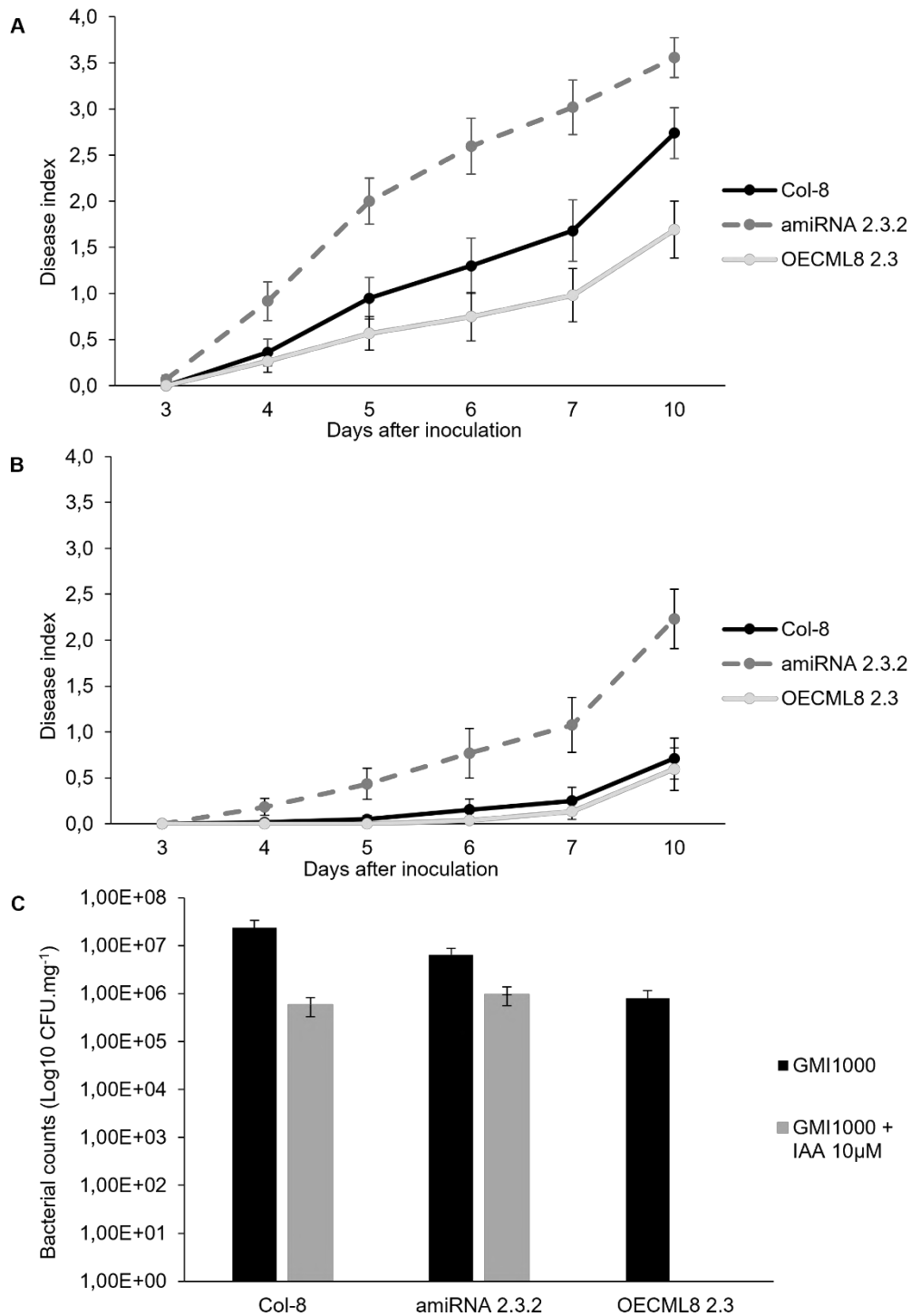


Figure 24. Analyse comparative des réponses des lignées transgéniques CML8 suite à l'inoculation de *Rs* avec ou sans traitement auxinique. Des plantes de quatre semaines des lignées transgéniques WT (Col-8), sous- (amiRNA 2.3.2) et sur-exprimant CML8 (OECML8 2.3) ont été inoculées avec la souche GMI1000 de *Rs* (1×10^7 bactérie.mL⁻¹) en absence (A) ou en présence d'IAA 10 µM (B). Le traitement auxinique a été réalisé par arrosage quotidien des plantes avec une solution d'IAA 10µM cinq jours avant l'inoculation. Le score de l'indice de maladie a été enregistré de 3 à 10 jours après inoculation. Un indice de maladie de « 0 » signifie aucun symptôme, alors qu'un indice de maladie de « 4 » signifie que toutes les feuilles des plantes présentent des symptômes de flétrissement. Barres d'erreurs = SEM. (C) Comptage *in planta* du nombre de bactéries de *Rs* souche GMI1000 inoculées sur des plantes Col-8, amiRNA 2.3.2 et OECML8 2.3 en présence ou en absence d'IAA 10µM. Le prélèvement des plantes pour l'IGC a été réalisé cinq jours après inoculation. Barres d'erreurs = SEM.

déclin plus rapide et plus forte (Figures 23D, 23E, 23F). Néanmoins, cette expérience aura besoin d'être répétée pour valider cette hypothèse, alors que l'IAA ne semblerait pas jouer de rôle positif ou négatif majeur dans la croissance bactérienne de *Rs*.

6) Analyse de la sensibilité des plantes transgéniques *CML8* à *Rs* après un traitement auxinique

Plusieurs études ont montré un rôle pour l'auxine dans les interactions plantes-microorganismes. Par exemple, des traitements à l'IAA ou des analogues de l'auxine tels que l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) ou l'acide 1-naphtalacétique (NAA), favorisent l'apparition et le développement des symptômes de maladie chez de nombreuses plantes, notamment *Arabidopsis* infectée par *Pst* (Navarro *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007), le riz infecté par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* et *Magnaporthe oryzae* (Fu *et al.*, 2011), ou encore le tabac infecté par *B. cinerea* (Ferrari *et al.*, 2008).

Afin d'élucider si l'IAA produite et sécrétée par *Rs* est un facteur de virulence pour la bactérie, la sensibilité des lignées transgéniques *CML8* d'*A. thaliana* face à la souche GMI1000 de *Rs* a été analysée après un traitement à l'IAA. Le traitement a consisté à arroser les plantes avec une solution contenant de l'IAA concentrée à 10 μ M pendant cinq jours avant l'inoculation des bactéries. Les résultats obtenus lors de l'inoculation des plantes non traités à l'IAA ont confirmé ceux observés précédemment, à savoir que les plantes Col-8 présentaient une sensibilité à la bactérie qui se manifeste par un flétrissement des feuilles, de même que les plantes sous-exprimant *CML8* qui présentaient plus de symptômes que les plantes sauvages, au contraire des plantes sur-exprimant *CML8* qui étaient plus résistantes à l'infection (Figure 24A). Les résultats de la quantification bactérienne *in planta* étaient également conformes à ceux attendus. En effet, une différence d'un log a été comptabilisée entre les plantes surexprimeurs de *CML8* et les sauvages, ces dernières comptant la plus grande quantité de bactérie dans leurs tissus (Figure 24C). En contradiction avec les résultats des autres études, après le traitement à

l'IAA, les symptômes de maladie étaient beaucoup moins développés sur l'ensemble des plantes inoculées, quel que soit leur génotype. En effet, les plantes les plus sensibles étaient les plantes sous-exprimant *CML8* et les plantes sur-exprimant *CML8* suivaient le même profil de symptômes que les sauvages (Figure 24B). La quantification bactérienne *in planta* a montré que le nombre de bactérie dans les tissus des plantes des trois génotypes était moins important lorsque les plantes étaient traitées à l'IAA. En effet, un log de différence a été comptabilisée entre les plantes sauvages traitées et non traitées. Une diminution plus faible a été observée pour les plantes sous-exprimant *CML8*. Pour les plantes sur-exprimant *CML8*, aucune bactérie n'a été comptabilisée après traitement à l'IAA. D'après ces observations, un traitement auxinique ne parait donc pas favoriser l'infection des plantes par *Rs* mais au contraire favoriser les défenses des plantes. Néanmoins, ces expériences doivent être répétées.

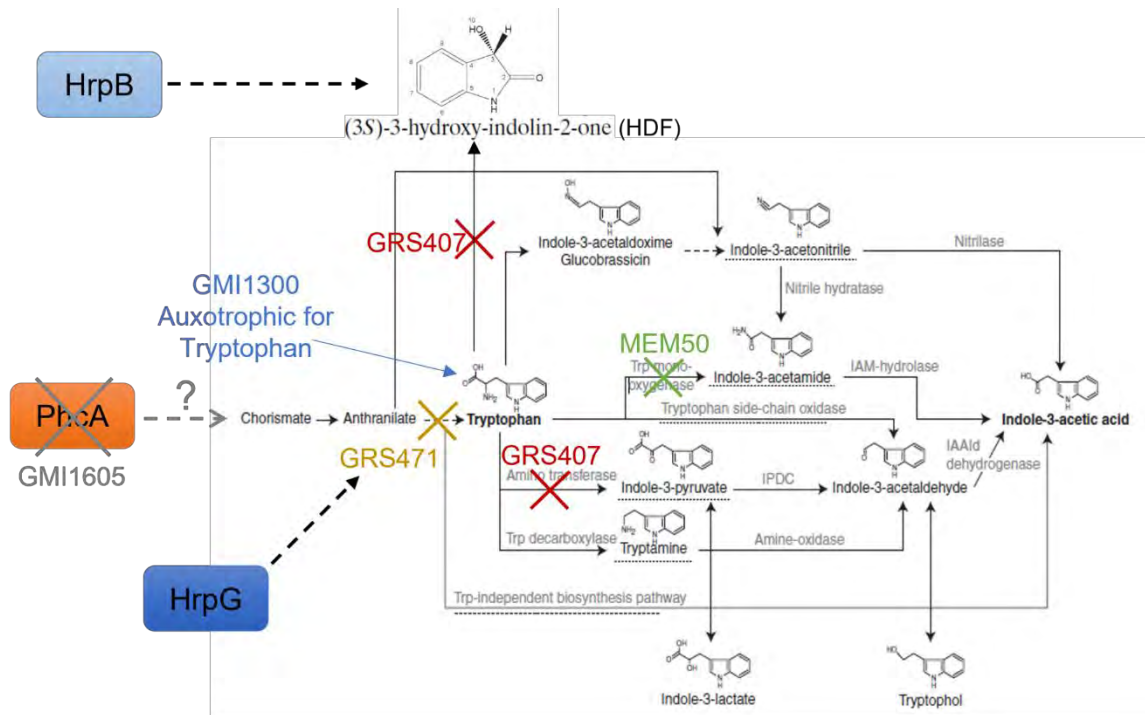


Figure 25. Représentation schématique des voies de biosynthèse de l'IAA hypothétiquement présentes chez *Rs*. Les trois voies de biosynthèse de l'IAA dépendantes du tryptophane et la voie indépendante du tryptophane identifiées chez les bactéries et hypothétisées chez *Rs* sont représentées (schéma adapté de Spaepen *et al.*, 2007) ainsi que les étapes des ces voies mutées chez les souches de *Rs* GMI1300, GMI1605, GRS407 et GRS471.

Partie II : Vers l'identification des voies de biosynthèse de l'auxine chez *Rs*

1) Analyse de la production d'IAA chez des souches mutantes de *Rs* disponibles

Dans le but de comprendre le rôle de l'auxine produite par *Rs* pour la bactérie mais également lors de l'infection de la plante hôte, ainsi que le potentiel effet sur les réponses immunitaires contrôlées par CML8, plusieurs méthodes ont été employées et présentées dans la partie I. Des outils particulièrement puissants pour comprendre le rôle que joue une molécule dans un processus biologique sont la génération de mutants pour des gènes de biosynthèse de cette molécule. Une partie de mon travail s'est donc concentrée sur l'obtention d'un mutant chez *Rs* qui ne serait plus capable de synthétiser l'IAA. Pour cela, plusieurs souches de *Rs* mutantes ont été analysées par LC-MS/MS pour leur capacité à produire de l'IAA, dont les souches GMI1605 et GRS471 décrites précédemment. Les autres souches testées sont également des souches mutées dans des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse d'auxine (Figure 25). La souche GMI1300 est un mutant auxotrophe pour le Trp obtenu à l'issue d'une mutagenèse aléatoire. La souche GRS407 porte une délétion dans l'opéron *hdf* (« HrpB-Dependent Factor ») qui code pour un composé indolique dérivé du tryptophane. L'opéron HDF comprend les gènes RSp0693 à RSp0698 (Delaspre *et al.*, 2007) et est activé par le régulateur de la virulence HrpB. Le gène RSp0694 code pour l'enzyme tryptophan-2,3-dioxygénase qui catalyse l'oxydation du L-tryptophane en N-formyl-L-kynurenine. Une déshydrogénase est aussi synthétisée à partir du gène RSp0695. Une aminotransférase pouvant participer à la synthèse d'IAA par la voie du pyruvate est codée par le gène RSp0698 (Delaspre *et al.*, 2007). En utilisant ce mutant, nous avons cherché à vérifier si cette molécule indolique pouvait servir de précurseur à l'IAA ou éventuellement jouer un rôle analogue. La dernière souche testée est la souche MEM50 qui est mutée dans le gène codant pour la tryptophane-2-monooxygénase (Figure 25).

Les analyses par LC-MS/MS ont montré que la souche sauvage GMI1000 de *Rs* était capable de produire de l'IAA lorsqu'elle était cultivée dans un milieu riche mais pas lorsqu'elle était cultivée dans un milieu minimum. Parmi les différences

| | | Milieux de cultures des bactéries | | |
|---|----------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|
| | | Milieu riche | Milieu minimum | Milieu minimum + Tryptophane 1 mM |
| Souches de <i>Rs</i> testées pour la production d'IAA | Contrôle | - | - | - |
| | GMI1000 | + | - | + |
| | GMI1605 | + | + | + |
| | GMI1300 | + | - | + |
| | GRS471 | + | + | + |
| | GRS407 | + | - | + |
| | MEM50 | + | - | + |

Tableau 1. Détection par LC-MS/MS de la présence ou non d'IAA dans les milieux de culture des souches de *Rs* GMI1000, GMI1300, GMI1605, GRS407 et GRS471. Les bactéries ont été mises en culture 24 heures dans du milieu Phi (milieu riche) ou 48 heures dans du milieu pauvre + glucose 20% additionné ou non de tryptophane 1mM. Les surnageants ont été filtrés, puis les composés indoliques ont été extraits à l'acétate d'éthyle et évaporés sous flux d'azote. Les échantillons ont été repris dans 100 µL d'acide méthanoïque (HCOOH) à 80% avant d'être analysés en LC-MS/MS. "+" correspond à la présence d'IAA et "-" à l'absence d'IAA.

entre ces deux milieux, l'absence de Trp dans le milieu minimum, le précurseur de l'IAA, pouvait expliquer l'incapacité de *Rs* à produire de l'IAA dans ce milieu, d'autant plus que lorsque ce milieu a été complété avec du Trp, la production d'IAA par les bactéries était restaurée, indiquant que la biosynthèse de l'IAA chez *Rs* serait Trp-dépendante (Tableau 1). Les autres souches mutantes ont été testées après culture dans les mêmes milieux que précédemment. En milieu riche et en milieu minimum complété avec du Trp, toutes les souches mutantes ont synthétisé l'IAA, ce qui signifierait qu'aucune des mutations testées n'a été suffisante pour abolir totalement la production d'IAA et ce qui semblerait confirmer que la biosynthèse de l'IAA serait Trp-dépendante. De manière inattendue, deux souches, les souches GMI1605 et GRS471, ont été capables de biosynthétiser l'IAA en milieu minimum seul (Tableau 1). Ces analyses étant uniquement qualitatives, l'information sur la quantité d'IAA produite par ces souches n'a pas pu être obtenue alors qu'il aurait été intéressant de savoir si ces différents mutants produisaient une quantité d'IAA identique ou non.

Le bilan de ces expériences est qu'aucun des mutants disponibles n'étaient altérés dans leur capacité à biosynthétiser l'IAA. Dans la mesure où le choix de ces mutants avait été guidé par les connaissances des voies de biosynthèse de l'IAA qui existent chez les bactéries, l'identification des voies de biosynthèse véritablement présentes chez *Rs* a été notre nouvel objectif. Pour cela, les molécules intermédiaires des quatre voies de biosynthèse de l'IAA connues chez les bactéries ont été recherchées à partir des échantillons obtenus avec les milieux de cultures dans lesquels GMI1000 a été cultivée. Bien que les standards de certaines de ces molécules n'étaient pas disponibles sur la plateforme Métatoul (Toulouse), leurs masses moléculaires et leurs temps de rétention étant connus, ces molécules ont tout de même pu être recherchées dans les échantillons. De ce fait, des molécules avec des caractéristiques correspondant à l'indole-3-acetamide et l'indole-3-acetaldoxime ont été repérées, contrairement à la tryptamine et l'indole-3-pyruvate qui n'ont pas été détectés, ce qui laisse supposer que ces voies de biosynthèse de l'IAA n'existent pas ou ne sont pas les voies principales de biosynthèse de l'IAA chez *Rs* mais d'autres analyses sont nécessaires pour le confirmer. Néanmoins, on peut

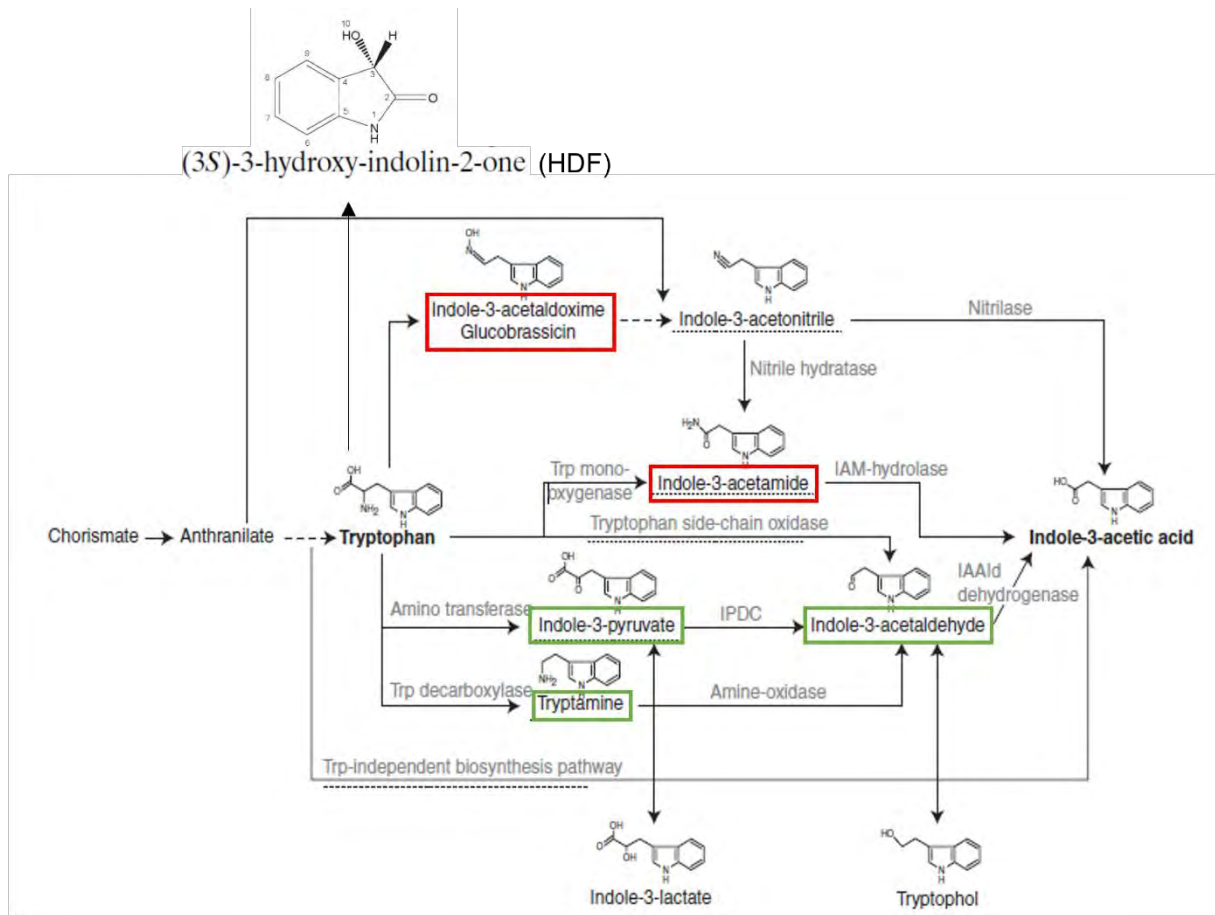


Figure 26. Détection des composés intermédiaires des voies de biosynthèse de l'IAA hypothétiquement présentes chez *Rs*. Les trois voies de biosynthèse de l'IAA dépendantes du tryptophane et la voie indépendante du tryptophane identifiées chez les bactéries et hypothétisées chez *Rs* sont représentées (schéma adapté de Spaepen & Vanderleyden, 2011) ainsi que les étapes de ces voies mutées chez les souches de *Rs* GMI1300, GMI1605, GRS407 et GRS471. Les molécules encadrées ont été recherchées dans les surnageants bactériens de la souche GMI1000. Les molécules encadrées en rouge ont été détectées, contrairement à celles encadrées en vert.

supposer que *Rs* utiliserait ces deux voies de biosynthèse pour produire de l'IAA à partir du Trp (Figure 26).

2) Reconstruction des voies de biosynthèse de l'auxine chez *Rs*

Afin d'identifier les gènes putatifs ainsi que les voies métaboliques associés à la biosynthèse de l'auxine chez *Rs*, l'entreprise iMEAN a été sollicitée. Cette entreprise de bio-informatique fondée en 2018 par Rémi Peyraud combine connaissances en biologie et modèles mathématiques complexes pour reconstruire *in silico* des organismes dont *Rs*. L'alliance du réseau métabolique virtuel de la bactérie avec son réseau de gènes est utilisée pour prédire de manière robuste ses phénotypes dans diverses conditions. Grâce à l'analyse de la bibliographie et des données métaboliques et génomiques, les voies de biosynthèse de l'auxine présentes et hypothétiques chez la souche GMI1000 de *Rs* ont été reconstituées et intégrées à l'échelle du génome. De plus, la robustesse de la biosynthèse de l'auxine a été calculée afin d'identifier les mutants KO simples et multiples essentiels et conditionnels pour le phénotype de production d'auxine et ainsi proposer des gènes candidats pour la validation expérimentale des voies de biosynthèse (Figure 27).

(a) Analyse de la littérature et des bases de données métaboliques

L'analyse de la bibliographie et des données disponibles pour *Rs* montre que la biosynthèse de l'auxine est un processus complexe. En effet, jusqu'à 10 voies différentes seraient possibles et la plupart des organismes semblent posséder de multiples voies. La base de données MetaCyc regroupant de nombreuses voies métaboliques et réactions enzymatiques fait référence à six voies de synthèse liées à l'auxine (« Classe des voies : biosynthèse de l'auxine ») (Figure 28) :

- Biosynthèse de l'IAA I (PI) : une voie linéaire allant du Trp à l'auxine par l'IPA. Également appelée voie IPA-YUCCA, cette voie est spécifique aux plantes.

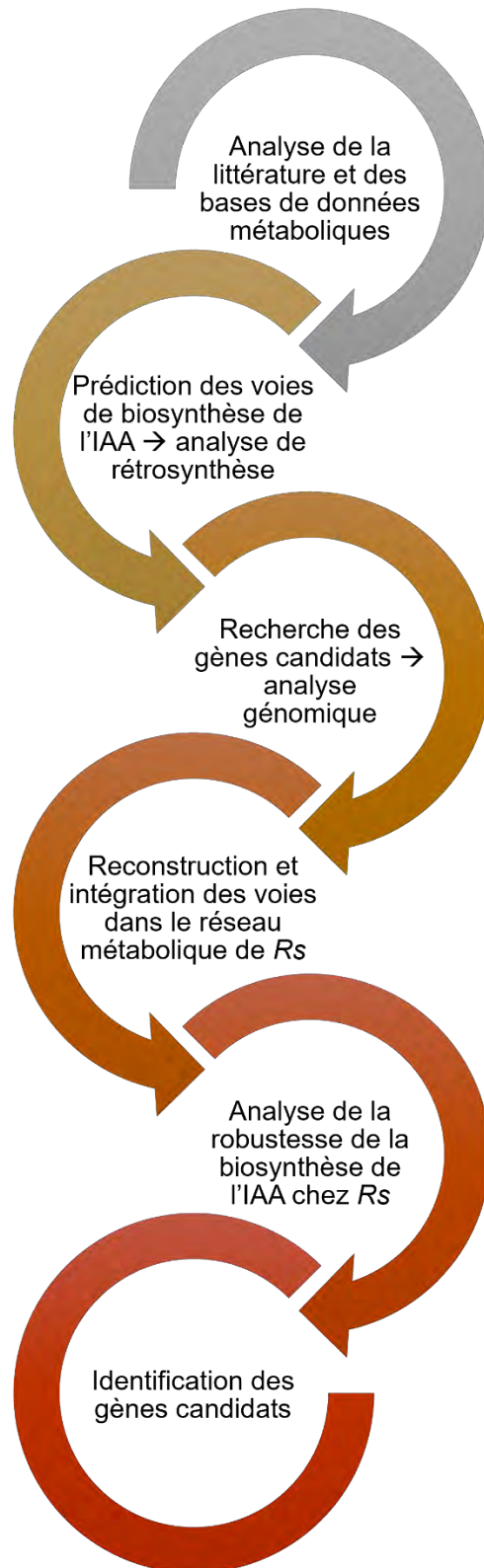


Figure 27. Enchaînement des étapes des différentes analyses réalisées par iMEAN pour identifier les gènes et les voies métaboliques putatifs impliqués dans la biosynthèse de l'auxine chez *Rs*.

- Biosynthèse de l'IAA II (PII) : cette voie correspond à un mélange des étapes des autres voies plus qu'à une nouvelle voie de synthèse de l'IAA.
- Biosynthèse de l'IAA III (PIII) : une voie linéaire du Trp à l'auxine par l'IAM. PIII est aussi appelée voie IAM et elle est la voie la mieux caractérisée chez les bactéries (Zhang *et al.*, 2019).
- Biosynthèse de l'IAA IV (PIV) : une voie allant du Trp à l'auxine par l'IAOx, l'indole-3-acétonitrile (IAN) et l'IAM. Cette voie est encore méconnue chez les bactéries.
- Biosynthèse de l'IAA V (PV) : cette voie partage les mêmes premières étapes que la voie PIV. Elle va linéairement de l'IAN à l'IAA et elle est encore peu étudiée chez les bactéries.
- Biosynthèse de l'IAA VI (PVI) : une voie allant du Trp à l'auxine par l'IPA et l'IAAld (Indole-3-acétaldéhyde), aussi appelée voie IPA. La deuxième enzyme, une indolepyruvate décarboxylase (*ipdC*), semble être l'enzyme clé de cette voie car l'expression hétérologue d'*ipdC* seul d'*Enterobacter cloacae* dans différents bactéries était suffisante pour les rendre capables de convertir le Trp en IAA (Koga *et al.*, 1991; Koga, 1995).

Deux voies, non présentes dans MetaCyc, ont été rapportées dans la littérature. Il s'agit de :

- La voie Tryptamine (PVII) qui utilise la tryptamine (TPM) comme intermédiaire. Dans cette voie, le Trp est principalement converti en TPM par une décarboxylase et la TPM est directement converti en IAAld par une amine oxydase. IAAld est finalement transformé en IAA par des déshydrogénases (Zhang *et al.*, 2019).
- La voie TSO (PVIII) a été décrite chez *Pseudomonas fluorescens*. Il a été démontré que l'enzyme TSO (« Tryptophan Side chain Oxidase ») est impliquée dans la conversion directe du Trp en IAAld et indole-3-glycolaldéhyde. L'IAAld est ensuite oxydé par l'indoleacétaldéhyde déshydrogénase de la voie PVI pour catalyser la formation d'IAA (Narumiya *et al.*, 1979). Malheureusement, aucune séquence n'a été identifiée pour le

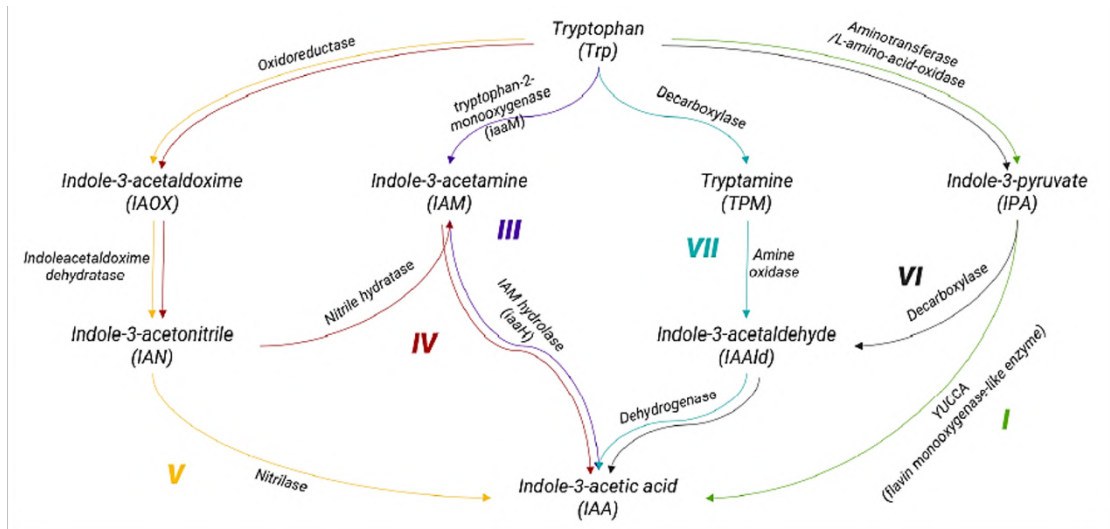


Figure 28. Principales voies dépendantes du Trp pour la synthèse d'IAA. Les voies sont numérotées selon MetaCyc (voir dans le texte). La voie VII n'est pas présente dans MetaCyc mais correspond à la voie Tryptamine. Les enzymes responsables des réactions sont indiquées à côté de chaque flèche (adaptée de Zhang et al., 2019).

gène codant pour la TSO. Pour cette raison, la présence de cette voie chez *Rs* n'a pas pu être testée.

(b) Prédiction des voies de biosynthèse de l'IAA présentes chez *Rs*

Dans le but de parcourir les bases de données et la littérature sans a priori sur la fonction potentielle des enzymes, une analyse de rétrosynthèse a été réalisée. La rétrosynthèse permet de révéler quelles enzymes peuvent être utilisées pour effectuer une réaction requise, même si ces enzymes n'ont pas été décrites pour effectuer cette réaction spécifique auparavant. Un logiciel dédié (MetaNetX v3.0) pour rechercher des voies potentiellement nouvelles entre l'auxine et le métabolisme central du dernier modèle à l'échelle du génome d'*E. coli* a été utilisé. Par cette analyse, aucune voie fondamentalement nouvelle n'a été révélée mais les voies PI, PIII, PIV, PV, PVI et PVII ont pu être prédites chez GMI1000.

(c) Recherche des gènes candidats

L'étape suivante a été la recherche de protéines homologues chez *Rs* des voies de biosynthèse de l'auxine. Les gènes de la souche GMI1000 dont la fonction était déjà annotée comme en relation avec les différentes voies de l'IAA ont été recherchés grâce à la nomenclature EC (« Enzyme Commission ») des enzymes. Puis, les protéines de GMI1000 présentant une homologie avec une enzyme de synthèse de l'IAA ont été recherchées par Blastp. Des protéines putativement impliquées dans chaque réaction ont été recherchées par similarité de séquence avec des protéines biochimiquement démontrées pour leur rôle dans les réactions de biosynthèse de l'auxine. Les comparaisons avec la nomenclature EC ont montré que la voie PIII semblerait être la seule voie complète chez *Rs*, de même que par recherche Blastp, la majorité des résultats correspondaient aux voies PIII et PVI, ce qui en ferait les deux seules voies potentiellement complètes chez *Rs*. Ainsi, 11 gènes candidats ont été identifiés (Figure 29) :

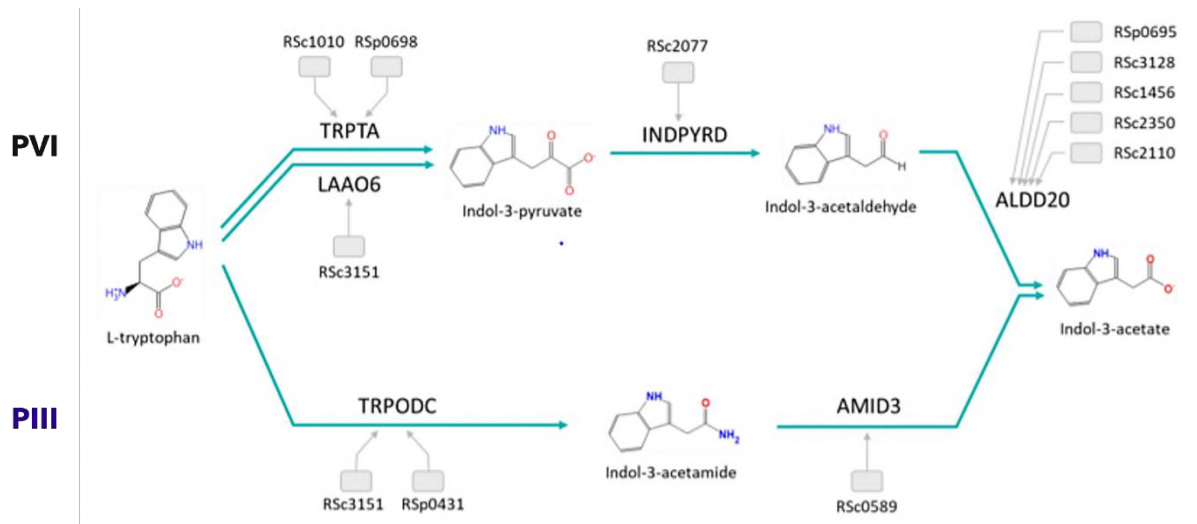


Figure 29. Caractéristiques des voies de biosynthèse de l'auxine reconstituées dans le modèle *in silico* iMEAN de *Rs* souche GMI1000. Les voies sont numérotées selon MetaCyc (voir dans le texte) et les gènes identifiés pour chaque étape enzymatique présentent la redondance fonctionnelle et génétique conférant potentiellement une robustesse à la fonction biologique.

- Etape 1 de la voie PIII : le meilleur candidat est RSc3151, le gène codant pour la tryptophane-2-monooxygénase altérée dans le mutant MEM50. Ses activités ont été démontrées biochimiquement et les domaines et sites de liaison attendus sont présents. C'est le principal candidat pour soutenir la biosynthèse de l'auxine. Cependant, le mutant MEM50 a déjà été testé et ne présente pas de phénotype car il produit toujours de l'auxine. Le gène Rsp0431, dont la fonction annotée est celle d'une protéine oxidoreductase, a aussi été identifié comme candidat alternatif à RSc3151 pour la catalyse de la première étape de la voie PIII.
- Etape 2 de la voie PIII : deux gènes candidats ont été identifiés. Il s'agit de RSc0589 et RSc0057, annotés respectivement comme une amidase et une sous-unité A de l'aspartyl/glutamyl tRNA amidotransférase. Tous deux ont le même niveau d'homologie avec des protéines connues et présentent les domaines et sites de liaison attendus. Cependant, RSc0589 est fortement exprimé dans le mutant *phcA* qui a été montré comme produisant de l'IAA, faisant de lui le meilleur candidat.
- Etape 1 de la voie PVI : le meilleur candidat est RSc1010, une tyrosine transaminase, qui présente une bonne homologie avec l'enzyme tyrB d'*E. coli* catalysant la conversion du Trp en IPA. Cependant, RSc1010 n'apparaît pas comme le meilleur candidat pour la mutagenèse car ce n'est pas l'enzyme clé de cette voie et la plupart des bactéries (68,5% pour les Protéobactéries dont *Rs* fait partie) ont une ou plusieurs enzymes pour catalyser cette réaction donc une redondance fonctionnelle avec d'autres candidats peut exister. Une alternative à RSc1010 pourrait être RSp0698, un gène de la voie de biosynthèse de l'hdf (dérivé du Trp). Avec RSc1010, ils pourraient catalyser l'étape 1 de la voie PVI au lieu de RSc3151.
- Etape 2 de la voie PVI : le meilleur candidat est RSc2077. Il présente une forte homologie avec l'enzyme ipdC de *Paenibacillus polymyxa*. Les domaines attendus pour la catalyse de l'IPA en IAAlD sont présents et RSc2077 possède un site de liaison au thiamine pyrophosphate conservé chez toutes les protéines ipdC confirmées (Schütz *et al.*, 2003) (mais a un glutamate au lieu d'un aspartate au niveau d'un des deux sites de liaison au Mg²⁺, ce qui

pourrait ne pas être significatif car ces deux acides aminés sont chargés négativement et peuvent fonctionner pour se lier avec le Mg^{2+} chargé positivement). Par conséquent, RSc2077 est un bon candidat pour la mutagenèse car ipdC serait l'enzyme clé de la voie.

- Etape 3 de la voie PVI : les meilleurs candidats pour la catalyse de l'IAAld en IAA sont RSc2110 et RSc3128. Ils présentent une forte homologie avec l'IAAld déshydrogénase AldA de *Pseudomonas syringae* et de *Xanthobacter autotrophicus*, 47% et 70% d'identité respectivement. Les deux ont les résidus catalytiques ALDH attendus pour réaliser la réaction, notamment une cystéine en position 343 et un glutamate en position 303. Comme il y a souvent une redondance chez les bactéries pour cette enzyme, trois autres gènes candidats (RSc2350, RSc1456 et RSp0695) ont été proposés pour la catalyse de la dernière étape de la voie PVI.

(d) Reconstruction et intégration des voies dans le réseau métabolique de Rs

L'identification de ces nouveaux gènes a permis la reconstruction des voies hypothétiques de biosynthèse de l'auxine chez la souche GMI1000 de *Rs* et a conduit à l'ajout d'une voie complète au modèle initial in silico de *Rs*. Il s'agit de la voie VI qui synthétise l'IAA via l'IPA. Ainsi, sept nouveaux gènes ont pu être ajoutés à la voie, notamment RSc2077 qui est le principal gène candidat soutenant l'existence de la voie VI. Le modèle mis à jour a pu simuler la production d'auxine chez le mutant RSc3151 (mutant MEM50) en accord avec les données expérimentales. Il a ainsi légèrement surpassé le modèle initial.

(e) Analyse de la robustesse de la biosynthèse de l'IAA chez Rs

Enfin, la robustesse des voies de biosynthèse de l'auxine face à une perturbation génétique, c'est-à-dire une mutation perte de fonction dans les gènes des voies de biosynthèse a été prédite. En effet, les voies de biosynthèse de l'auxine reconstruites ont montré un niveau important de redondance fonctionnelle et

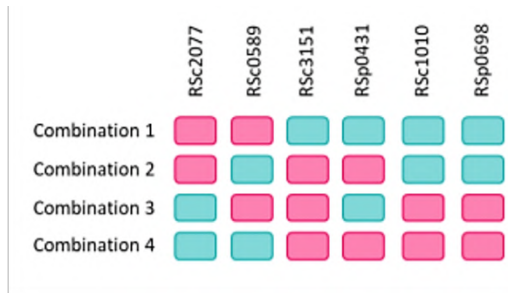


Figure 30. Combinaisons des mutants KO à générer dans la souche GMI1000 de *Rs* pour abolir la capacité de production d'auxine. Les carrés roses représentent les mutants KO entraînant l'arrêt de la capacité de production d'auxine par *Rs*. Les carrés verts représentent les gènes fonctionnels.

génétique. Les simulations des phénotypes des combinaisons de mutants pour les 11 gènes des voies PIII et PVI, soit 2048 combinaisons de mutations, ont été prédits. Les résultats ont montré qu'aucun des mutants uniques ne conduirait à une perte du phénotype de production d'auxine (robustesse de 1). Ceci est cohérent avec les phénotypes observés, en particulier avec le mutant RSc3151 (mutant MEM50). De plus, au moins une étude sur la biosynthèse de l'auxine a montré qu'une voie alternative continue à produire de l'auxine lorsque la voie principale est supprimée, comme chez le mutant *ipdC* (Estenson *et al.*, 2018). Les simulations ont montré qu'un seul double mutant a conduit à une perte de production d'auxine sur les 55 doubles mutants simulés (robustesse de 0,98). Il s'agit du double mutant perte de fonction pour les gènes RSc0589 et RSc2077, chacun chargé de bloquer la voie qui lui est propre, PIII et PVI respectivement. Ensuite, 10 triples mutants sur les 165 combinaisons de triples mutants conduisent à une perte de production d'auxine (robustesse de 0,94). Ainsi, les meilleures combinaisons de mutants KO nécessaires pour arrêter la biosynthèse de l'auxine et minimiser le nombre de KO à générer ont été étudiées et quatre combinaisons avec un maximum de quatre KO ont été générées (Figure 30).

Sur la base de ces résultats, il a été décidé de générer les mutants KO simples pour les gènes RSc2077 et RSc0589 pour interrompre les voies de biosynthèse de l'auxine PVI et PIII respectivement, ainsi que le mutant double.

3) Génération des souches mutantes de *Rs*

La stratégie sélectionnée pour générer les mutants KO simples des gènes RSc2077 et RSc0589 a été celle de la délétion de gène par « splice overlap PCR » (Castañeda *et al.*, 2005). Brièvement, les régions en amont et en aval du gène d'intérêt ont été fusionnées après amplification par PCR. Ce produit PCR a été cloné dans un vecteur contenant le gène de sélection *sacB* et a été introduit dans la souche sauvage GMI1000 par recombinaison homologue. Les transformants ont ensuite été sélectionnés avec les antibiotiques présents sur le plasmide. Après un deuxième événement de recombinaison, une seconde sélection sur saccharose a permis

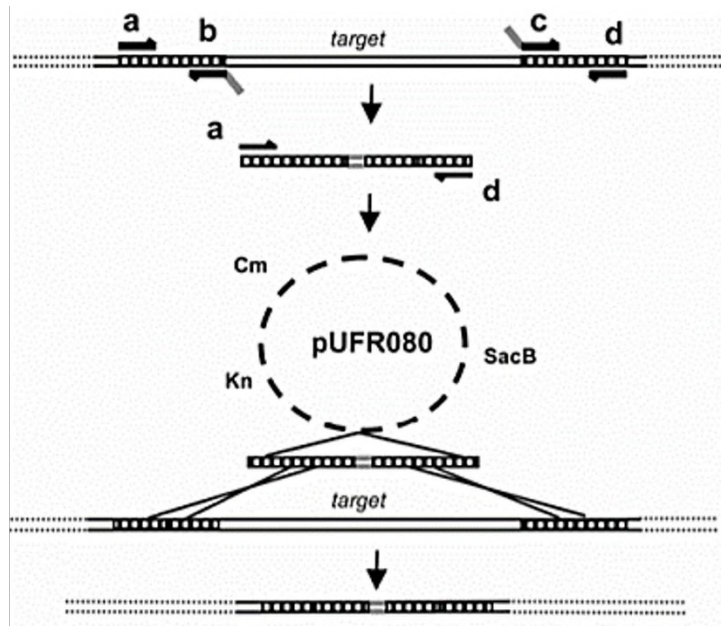


Figure 31. Transformation de *Rs* par recombinaison homologue. Une région en amont et une région en aval de l'ORF cible ont été amplifiées par PCR et ensuite fusionnées pour former un produit PCR qui porte les deux extrémités de l'ORF cible mais pas la région cible. Le produit PCR a ensuite été cloné dans un vecteur suicide contenant le gène *sacB* et a été introduit dans la souche cible. Après une recombinaison homologue sur l'un des sites cibles, un second événement de recombinaison homologue a été sélectionné sur un milieu contenant du saccharose. Puisque seules les souches qui ont perdu *sacB* survivent sur le saccharose, la double recombinaison a été sélectionnée et, par conséquent, une délétion dans le gène cible a été obtenue. Les flèches représentent les amorces. Les régions d'homologie sont représentées dans des boîtes avec des lignes verticales (adaptée de Castañeda *et al.*, 2005).

de discriminer les transformants pour la perte du plasmide (Figure 31). De manière inattendue, l'amplification du gène RSc0589 a été très compliquée, probablement parce que la région génomique du gène est riche en GC, et le clonage a été impossible. Par conséquent, en absence du mutant simple RSc0589, le mutant double RSc2077-RSc0589 ne peut pas être généré. En revanche, cette stratégie a fonctionné pour le gène RSc2077 et le mutant est disponible. La prochaine étape est donc de le caractériser pour sa capacité à biosynthétiser l'IAA.

Partie III : Discussion

L'objectif dans ce chapitre était de comprendre la contribution de *CML8* et de l'auxine produite par la bactérie dans l'interaction entre *Rs* et *Arabidopsis*. Pour cela, une méthode biochimique a été employée pour détecter que *Rs* était bien capable de produire et de sécréter de l'IAA et que cette auxine bactérienne était fonctionnelle et induisait des phénotypes racinaires sur des plantules d'*A. thaliana*. Puis l'influence de l'auxine sur l'induction de gènes de virulence bactériens, la croissance bactérienne et la sensibilité des plantes transgéniques *CML8* à *Rs* a été évaluée. Enfin, la production d'IAA chez des bactéries mutées pour des gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'auxine a été analysée et les voies de biosynthèse de l'auxine ont été reconstruites *in silico* par l'entreprise iMEAN afin d'identifier des mutants de *Rs* incapables de produire l'hormone.

1) Est-ce que la souche GMI1000 de *Rs* produit de l'IAA ?

La capacité de biosynthèse et de sécrétion dans son milieu d'IAA par *Rs* a été démontrée formellement par LC-MS/MS et complète de manière plus précise les résultats antérieurs obtenus par Valls *et al.* (2006). Pour la souche sauvage GMI1000, l'absence de Trp dans le milieu minimum résulte en une absence de biosynthèse d'IAA mais la complémentation de ce milieu avec du Trp rétablit la capacité de la bactérie à produire de l'auxine, indiquant que l'IAA produite par *Rs* serait Trp-dépendante. L'ajout de Trp supplémentaire dans le milieu étant nécessaire pour la production d'auxine, cela suggère que la synthèse *de novo* du Trp n'est pas suffisante pour les voies de biosynthèse de l'auxine et la multiplication bactérienne. Ce Trp doit donc être apporté dans le milieu pour induire l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de l'auxine.

L'IAA a bien été détectée dans les extraits des milieux de culture des bactéries et ces extraits ont été efficaces pour déclencher l'émergence des racines latérales sur des plantules d'*Arabidopsis*. Néanmoins, la méthode employée pour obtenir ces extraits n'était pas une purification spécifique de l'IAA mais une concentration des composés indoliques présents dans le milieu dans une fraction. Ainsi d'autres

molécules sont présentes dans les extraits, ce qui ne permet pas d'affirmer qu'il s'agit uniquement de l'IAA qui affecterait l'architecture racinaire. Pour ce faire, il faudrait purifier l'IAA des extraits des milieux de culture des bactéries et tester à nouveau son efficacité.

2) Comment la souche GMI1000 de *Rs* produit-elle de l'IAA ?

Les voies de biosynthèse de l'auxine chez *Rs* ne sont pas formellement identifiées à ce jour. La présence des précurseurs des différentes voies déjà confirmées chez d'autres bactéries a été recherchée afin de savoir quelles voies seraient présentes chez *Rs*. Ainsi, la tryptamine et l'IPA n'ont pas été détectées suggérant que ces deux voies de biosynthèse ne sont pas présentes chez *Rs*. Concernant les deux autres voies Trp-dépendantes, l'IAM et l'IAOx, ont été détectés mais une vérification par comparaison avec les standards est nécessaire pour affirmer la présence de ces voies chez *Rs*. Également, il serait intéressant de tester si la bactérie est capable de synthétiser de l'IAA par une voie indépendante du Trp. Pour cela, une expérience avec ajout de Trp deutéré dans le milieu de culture minimum qui ne contient pas de Trp pourrait être réalisée. Il serait alors possible en LC-MS de regarder si de l'IAA deutéré ou non est détecté.

Le travail expérimental présenté dans la partie I a permis d'amorcer le travail d'identification et de prédiction des voies de biosynthèse chez *Rs* par iMEAN qui devra être validé expérimentalement. Des analyses de comparaison des numéros EC et des Blastp ont permis de montrer que vraisemblablement seules les voies PIII et PVI seraient complètes chez *Rs*. Également, l'analyse de rétrosynthèse a mis en évidence peu de schémas réactionnels nouveaux, suggérant ainsi que les schémas réactionnels les plus probables sont couverts par les voies déjà connues. Cependant, plusieurs solutions peuvent être envisagées si l'identification des voies canoniques échoue car une redondance fonctionnelle avec d'autres gènes candidats pour les différentes étapes de ces voies pourrait être possible. En effet, il est possible que des candidats écartés de l'analyse car présentant une faible similitude avec l'enzyme catalysant une étape donnée de la voie puissent se révéler

fonctionnels. Cela a par exemple été le cas pour un gène de *Pantoea sp.* YR343, montré comme responsable de la majorité de la production d'IAA via la voie VI chez cette bactérie, mais qui encode une protéine avec seulement 26% d'identité avec la protéine IpdC d'*A. brasilense* (Estenson *et al.*, 2018).

Parmi les mutants déjà existants, aucun n'était aboli dans sa capacité de production d'IAA. Cependant, des résultats préliminaires sembleraient indiquer que la quantité d'IAA produite par ces souches mutantes ne serait pas identique. Ainsi, une analyse semi-quantitative prenant en compte la DO des cultures bactérienne a été effectuée pour ramener l'aire du pic correspondant à l'IAA des chromatogrammes à une quantité connue de bactérie, ce qui a permis d'estimer que la souche produisant le moins d'IAA était la souche sauvage GMI1000 et la souche en produisant le plus était le mutant *phcA* (GMI1605). Ces résultats devront être confirmés en quantifiant de façon plus précise l'auxine synthétisée par les bactéries, notamment en ajoutant une concentration connue d'IAA deutérée dans les milieux de culture des bactéries. Néanmoins, la plus grande production d'IAA par la souche GMI1605 comparée à la souche sauvage pourrait s'expliquer par le fait que *phcA* est un gène qui régule de manière globale le métabolisme et la virulence de la bactérie (Genin *et al.*, 2005). Ce gène réprime l'expression de nombreux gènes dont potentiellement les gènes des voies de biosynthèse de l'auxine chez *Rs*. Ainsi, l'identification, grâce à l'analyse réalisée par iMEAN, des 11 gènes des voies de biosynthèse potentielles de l'IAA chez GMI1000 a pris en compte des données transcriptomiques disponibles pour le mutant *phcA*. Parmi les 11 gènes candidats, RSc3128, RSc2350, RSc2077 et RSc3151 ont été trouvés réprimés, ce qui est intrigant compte tenu que le mutant *phcA* était celui le plus producteur. De façon plus cohérente avec ce phénotype, RSc1010, RSc1456, RSc2110, RSp0698, RSp0695 et RSp0431 ont tous été trouvés induits dans le mutant *phcA*, dont RSc0589 qui était le plus fortement induit (16 fois) chez cette souche.

Toutefois, cette analyse reste prédictive et doit donc être prise avec prudence quant à la possibilité que la perte de fonction du gène entraîne la perte de la capacité de production complète d'auxine par *Rs*. En effet, de nombreux gènes n'ont pas été démontrés expérimentalement pour catalyser les réactions qui leur

ont été attribuées et de nombreux autres candidats ont été trouvés dans l'analyse. Seuls les gènes les plus susceptibles d'effectuer les réactions enzymatiques des voies de biosynthèse de l'IAA ont été retenus.

Par ailleurs, l'analyse menée est qualitative, c'est-à-dire que la production d'auxine est faisable ou non, et ne prend pas en compte l'aspect quantitatif des voies. Par conséquent, la délétion d'un seul des gènes, comme RSc2077, peut être déjà suffisante pour observer quantitativement une réduction de la biosynthèse de l'auxine et une perte presque totale de la capacité de production d'auxine. On ne peut pas non plus exclure que peut-être plus de quatre KO (qui est le nombre de KO maximum qui a été choisie lors des analyses prédictives par iMEAN) seront nécessaires pour observer la perte de production d'auxine par la bactérie. En effet, des candidats non retenus dans l'analyse car considérés moins probables de catalyser les réactions étudiées ou des enzymes encore inconnues peuvent être impliqués dans les voies de biosynthèse de l'IAA chez GMI1000. Un nombre important (45,3 %) de bactéries possèdent probablement plusieurs voies co-existantes de biosynthèse de l'IAA dépendantes du Trp. Chez les protéobactéries, 9,7% pourraient posséder la voie PIII, 6,6% la voie PVI et 5,9 % la voie PVII. De plus, la plupart des bactéries pourraient potentiellement synthétiser l'IAA en présence de métabolites intermédiaires clés (83,6% pour les protéobactéries), ce qui signifie qu'elles possèderaient des voies incomplètes. Ainsi, il n'est pas à exclure que *Rs* ait plusieurs voies de biosynthèse Trp-dépendantes de l'auxine qui soient complètes ou incomplètes (Zhang *et al.*, 2019).

Il existe également des voies de biosynthèse de l'auxine indépendantes du Trp. Cependant, même si ces voies sont prédites, elles ne sont même pas considérées comme majoritaires chez les angiospermes (Nonhebel, 2015) et très peu d'enzymes impliquées dans ces voies sont connues, notamment mises en évidence avec du Trp marqué chez *Saccharomyces cerevisiae* (Rao *et al.*, 2010). Parmi elles, on retrouverait une indole synthase, homologue à la Trp synthase TSA1 d'*Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2008). D'autres composés produits à partir des intermédiaires des voies de biosynthèse de l'IAA, tel le tryptophol synthétisé à partir de l'IAAld, peuvent également servir à la synthèse de l'auxine (Álvarez-Fernández et

al., 2019). Enfin, il est possible que de l'IAA soit formé par dégradation spontanée de l'IPA (Oberhansli *et al.*, 1991). De ce fait, il peut être très compliqué d'arriver à générer un mutant chez *Rs* qui ne synthétise plus d'IAA.

L'analyse réalisée par l'entreprise iMEAN a permis d'identifier deux voies connues chez les bactéries pour la biosynthèse de l'auxine qui seraient complètes chez *Rs* : les voies PIII et PVI et l'activation et la répression de ces voies ont été prédites dans différents milieux afin de mieux comprendre le fonctionnement des voies et de trouver les conditions environnementales qui pourraient permettre de mieux visualiser les phénotypes des mutants. La prédiction a montré que la voie PIII ne devrait être activée qu'à faible densité cellulaire et dans des milieux avec des sources variées de carbone mais pas dans un milieu minimal avec seulement du glucose, en accord avec les données expérimentales. Comme RSp0431 et RSc0589 qui composent la voie PIII avec RSc3151 sont fortement induits dans le mutant *phcA*, cela pourrait expliquer pourquoi l'auxine est plus concentrée dans les milieux de cultures de la souche mutante *phcA*. En effet, dans de telles conditions, les cellules continuent à produire de l'IAA même lorsque les signaux du quorum dans la population bactérienne sont atteints. Concernant la voie PVI, elle est prédite pour être activée dans toutes les conditions et cette voie pourrait donc représenter une production basale d'auxine si du Trp est présent dans le milieu. Ensuite, une forte activation de la voie PIII peut représenter une quantité supplémentaire d'auxine à faible densité cellulaire, par exemple au cours de la première étape de l'infection. Ainsi, tester les mutants de la voie PVI dans un milieu minimum et à haute densité cellulaire pourrait permettre d'améliorer les phénotypes et un mutant simple pour RSc2077 pourrait présenter un phénotype.

3) Pourquoi la souche GMI1000 de *Rs* produit-elle de l'IAA ?

L'hypothèse de départ était que l'IAA produite par *Rs* pouvait être un facteur de virulence. Pour tester cette hypothèse, des plantes sauvages, sous- et sur-exprimant *CML8* ont été inoculées avec la souche GMI1000 de *Rs* après un traitement avec 10 μ M d'IAA. Les résultats de l'inoculation ont montré que les trois

génotypes sont plus résistants à la bactérie après le traitement à l'auxine qu'en condition contrôle. Ces résultats laissent penser que l'auxine n'est pas un facteur qui favorise la virulence, tout comme ceux indiquant que l'IAA n'a pas d'effet sur la croissance de *Rs* et sur l'induction des gènes de virulence. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus lors d'une expérience similaire qui démontraient clairement que les symptômes chlorotiques d'une infection par *Pst* étaient accentués avec ajout d'IAA exogène lors de l'inoculation (Chen *et al.*, 2007) et peuvent refléter des mécanismes de pathogénie distincts entre *Pst* et *Rs*. Cependant, contrairement à Chen *et al.* (2007), dans notre expérience, l'ajout d'IAA exogène a eu lieu avant l'inoculation induisant potentiellement une modification de la croissance de la plante, notamment au niveau racinaire, et une reprogrammation transcriptionnelle de l'expression de nombreux gènes dont des gènes de défenses chez la plante, ce qui pourrait expliquer nos résultats. Cette expérience doit donc être reproduite avant de pouvoir conclure définitivement sur la contribution de l'auxine au cours de l'infection par *Rs*.

Les résultats obtenus n'ont pas permis de montrer de manière formelle que l'auxine produite par la bactérie serait un facteur de virulence pour *Rs*. Si cette auxine n'est pas un facteur de virulence, il est possible que ce soit une molécule signal entre bactéries (Spaepen *et al.*, 2007). En effet, il a été montré que l'IAA induit l'expression des gènes de la biosynthèse de la membrane bactérienne et la production de biofilm permettant une meilleure adaptation aux stress chez *E. coli* et *Bradyrhizobium japonicum*, mais également l'induction des gènes impliqués dans les réactions générales au stress qui résultaient en une viabilité cellulaire accrue lorsque les bactéries étaient cultivées dans des conditions de stress, y compris de choc thermique, osmotique et de stress oxydatif (Bianco *et al.*, 2006; Donati *et al.*, 2013). Chez *Streptomyces*, l'IAA favorise la production d'antibiotiques (Matsukawa *et al.*, 2007), ce qui permettrait aux bactéries produisant ces antibiotiques de protéger leur niche écologique contre d'autres microorganismes pathogènes. De plus, l'IAA induit l'expression de gènes prédits comme étant impliqués dans le système de sécrétion de type VI (T6SS), un appareil de sécrétion qui peut injecter des effecteurs protéiques dans les cellules d'autres organismes (Ryu, 2015). Le rôle

de T6SS est méconnu mais il pourrait permettre aux bactéries d'obtenir un avantage concurrentiel dans la rhizosphère ou ailleurs dans l'environnement végétal en injectant des toxines dans d'autres microbes à proximité (Kunkel & Harper, 2018). Des expériences complémentaires pour comprendre le rôle de l'auxine produite par *Rs* seront nécessaires. Par exemple, il serait intéressant de mettre d'autres microorganismes en culture avec *Rs* et d'analyser ensuite la viabilité de ces microorganismes ou encore d'étudier par qPCR l'expression des 11 gènes identifiés dans les voies PIII et PVI comme potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'IAA pour rechercher dans quels milieux ils sont exprimés. En effet, une expression limitée aux tissus végétaux peut indiquer un rôle dans la virulence mais une expression ubiquitaire à plusieurs environnements dont le sol peut indiquer un rôle de molécule antimicrobienne contre les autres microbes du sol ou contre le microbiome protecteur de l'hôte. Par exemple, l'effecteur *ave1* du pathogène du sol *Verticillium dahliae* qui infecte les tomates est exprimé à la fois dans la plante et le sol et a une activité antimicrobienne efficace contre les PGPRs *Sphingomonas* spp. dans les racines et le sol. Ainsi, *Verticillium dahliae* manipule le microbiote de la plante pour favoriser son infection (Snelders *et al.*, 2020).

CHAPITRE 4

DISCUSSION GÉNÉRALE &

PERSPECTIVES

Le travail réalisé au cours de mon projet de thèse avait pour objectif de comprendre comment les plantes sont capables de s'acclimater à leur environnement, en se concentrant sur la fonction de la protéine senseur de Ca^{2+} CML8 dans l'interaction entre la plante *A. thaliana* et la bactérie pathogène du sol *Rs*. En effet, comme tous les organismes vivants, les plantes sont continuellement exposées aux variations de l'environnement (stress abiotiques, pathogènes) vis-à-vis desquels elles doivent mettre en place des processus d'acclimatation leur permettant de mener à terme leur cycle de développement et de reproduction. La mise en place de ces réponses repose sur la capacité des plantes à intégrer et à décoder ces variations de l'environnement et il est à présent bien établi que la plupart de ces variations sont à l'origine de fluctuations rapides et transitoires du taux de Ca^{2+} dans la cellule végétale. Parmi les protéines pouvant prendre en charge et décoder ces signaux calciques, on trouve la CaM qui est capable d'interagir et de moduler l'activité de diverses protéines cibles (Bouché *et al.*, 2005). A côté de la forme typique de la CaM, les plantes possèdent un répertoire particulier composé de nombreuses protéines apparentées à la CaM, appelées CMLs, dont les rôles physiologiques restent pour la majorité d'entre elles méconnus (Ranty *et al.*, 2006; Aldon *et al.*, 2018).

1) CML8 : un régulateur positif des défenses face à de multiples pathogènes ?

Par une approche génétique de type perte et gain de fonction, CML8 a été montré comme un régulateur positif des réponses de défenses de la plante à une infection par *Pst* (Zhu *et al.*, 2017) et du développement des racines latérales et ce, de manière auxine-dépendante (Zhu, 2016). Compte tenu du profil d'expression particulier de CML8 au niveau de l'émergence des racines latérales, nous avons décidé d'évaluer la contribution de CML8 dans les réponses à l'infection par un pathogène bactérien du sol, *Rs*. Les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse ont montré que CML8 était également impliqué dans la résistance de la plante à *Rs*, mais également à *Xcc* et *Pc*. De manière intéressante, CML8 présente une forte identité protéique avec la CaM4 de soja (81%) (Park *et al.*, 2010). Comme décrit dans le chapitre 1, SCaM4 est impliquée dans la résistance aux pathogènes à large

spectre et dans la tolérance au stress salin du fait de son interaction avec le facteur de transcription MYB2 via son domaine de liaison à la CaM. Cette interaction stabilise la liaison à l'ADN de MYB2, contrairement à SCaM1, permettant une surexpression des gènes cibles de MYB2, notamment P5CS1 une enzyme impliquée dans la réponse au stress salin. En effet, la surexpression de SCaM4 chez *Arabidopsis* permet une meilleure tolérance à de forte concentration en NaCl (Yoo *et al.*, 2005). De plus, il a été reporté que CML8 peut activer une phosphodiesterase dépendante de la CaM et de la perception d'un signal calcique, mais pas une NAD kinase, de manière identique à SCaM4 (Park *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que CML8 chez *Arabidopsis* présente des caractéristiques biochimiques similaires à SCaM4 et pourrait avoir des rôles similaires dans l'adaptation à différents stress abiotiques et biotiques que SCaM4.

MYB2 a été recherché parmi les DEGs identifiés dans notre analyse du transcriptome des lignées transgéniques *CML8* inoculées par *Rs*. De manière étonnante, il n'y a pas été détecté. *MYB2* n'est pas non plus ressorti du crible double-hybride systématique réalisée dans le cadre du projet ANR CaPPTure développé dans l'équipe. Plusieurs raisons pourraient expliquer cela, telles que les difficultés d'auto-activation rencontrées lors de ce crible, le système biologique employé ou encore la possibilité que l'interaction soit labile et transitoire. Il pourrait donc être pertinent de tester plus spécifiquement l'interaction entre *MYB2* et *CML8*, par exemple par co-immunoprécipitation après réticulation (plus généralement connu sous le terme « cross-linking ») des protéines pour essayer de pallier à une interaction protéique faible ou d'utiliser une méthode de marquage pour étudier les interactions protéine-protéine en marquant les protéines qui interagissent avec une protéine d'intérêt. L'utilisation de plusieurs méthodes différentes serait essentielle pour confirmer l'interaction de deux protéines ainsi que son rôle biologique.

Chez le soja, les CaM4 et CaM5 activent l'expression des gènes PR et améliorent la résistance à plusieurs pathogènes, contrairement aux CaM1 et CaM2 (Ranty *et al.*, 2006). En accord avec les résultats obtenus pour SCaM4, les lignées sous- et sur-exprimant *CML8* ont été phénotypées avec d'autres microorganismes

présents dans l'environnement et ayant des modes d'infection différents de *Rs* et *Pst*. La réponse immunitaire dépendante de *CML8* semble ainsi également efficace contre l'oomycète hémibiotrophe *Pc* et la bactérie biotrophe *Xcc* mais pas contre les champignons nécrotrophes *S. sclerotiorum* et *B. cinerea*, suggérant que *CML8* participe bien à une réponse de défense à large spectre qui semble cependant spécifique du cycle de vie des pathogènes.

2) CML8 : un régulateur majeur chez les plantes ?

Dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires dépendants de *CML8* contrôlant la réponse de défense de la plante à *Rs*, des données de transcriptome de racines de plantes sauvages, sous- et sur-exprimant *CML8*, inoculées ou non avec la bactérie et sur plusieurs temps cinétiques précoces (6 h, 12 h et 24 h après l'inoculation) ont été générées et analysées. Une liste de 151 gènes différentiellement exprimés a été obtenue appartenant aux catégories fonctionnelles fortement concordantes avec d'autres études réalisées sur une variété de phytopathogènes renforçant nos observations que la résistance liée à *CML8* implique des acteurs dont l'expression est régulée en réponse à une multitude de pathogènes. En effet, dans notre liste, de nombreux gènes connus pour être impliqués dans la biosynthèse du SA ainsi que la défense basale ont été trouvés significativement induits dans les plantes sur-exprimant *CML8* après inoculation avec *Rs* dont *CML41* qui régule la fermeture du plasmodesme par dépôt de callose après la perception de flg22 (Xu *et al.*, 2017). Après analyses des profils d'expression des gènes exprimés dans les racines, induits par divers phytopathogènes et formant des réseaux de co-expression et d'interaction, sept gènes candidats ont été sélectionnés pour valider fonctionnellement nos analyses de transcriptome. Après analyses des données de transcriptomes des études sur les stress biotiques disponibles dans Genevestigator, il apparaît que *RLP41*, *NUDT6*, *LTP4.4*, *XBAT34*, *PNP-A* sont fortement surexprimés ensemble dans ces études. *PDC1* est à l'inverse non-induit ou réprimé dans ces études. Il est en revanche surexprimé dans certaines études où *CML8* est réprimé. De manière intéressante, ces gènes ne sont pas régulés de façon similaire lors d'infection par *Rs*, *Xcc* et *Pc*,

indiquant que CML8 agirait comme un régulateur de multiples agents pathogènes en contrôlant probablement des processus immunitaires communs et spécifiques à divers agents pathogènes.

Des premières expériences de phénotypage de mutants pour ces sept gènes candidats en réponse à *Rs* suggèrent, de manière préliminaire car l'effet de la mutation doit encore être vérifié, que trois d'entre eux (*PDC1*, *XBAT34* et *RLP41*) pourraient potentiellement être des gènes de susceptibilité. Cette méthode de génétique inverse a cependant une limitation. En effet, elle ne permet pas l'identification de gène de résistance dans la mesure où le fond génétique Col-0 des mutants est déjà sensible à *Rs*. De plus, ce fond génétique Col-0 ne présente qu'une seule forme allélique pour les gènes étudiés. A l'avenir, il sera intéressant d'utiliser la variabilité naturelle d'*Arabidopsis* et de rechercher si des variations dans la séquence du gène de *CML8* et des gènes candidats sont corrélés à des écotypes plus résistants ou plus sensibles à *Rs*.

Une étude a montré que la CaM et les CMLs sont présentes chez 15 espèces de plantes représentative de la lignée verte (Zhu *et al.*, 2015). Meng *et al.* (2021) ont rapporté que dans le cultivar de tabac résistant à *Phytophthora nicotianae*, le gène *Loc107773369*, l'orthologue le plus proche d'*AtCML8*, était réprimé. Il serait donc intéressant de rechercher des orthologues de *CML8* avec un profil d'expression similaire chez d'autres espèces végétales dans le but d'utiliser les informations obtenues avec *Arabidopsis* pour savoir si *CML8* fonctionne de la même façon chez une espèce végétale d'intérêt agronomique en vue d'améliorer à long terme la protection des cultures. Parmi les plantes d'intérêt, l'équipe a choisi de travailler sur la tomate. En effet, la tomate cultivée *Solanum lycopersicum* (*S. lycopersicum*) est l'un des légumes les plus consommés au monde (Piquerez *et al.*, 2014) classée septième parmi les espèces végétales cultivées (Bergougnoux, 2014). Près de 186,2 millions de tonnes ont été produites dans le monde en 2020 (FAOSTAT, 2020) et la tomate est désormais un modèle reconnu pour la recherche sur les stress biotiques (Rothan *et al.*, 2019). Dans le cadre du projet ANR CaPPTure, dans lequel s'est aussi inscrit mon travail de thèse, l'orthologue de *CML8* chez *S. lycopersicum* a été identifié *in silico* (*SlCML1*) sur la base de l'identité avec la séquence protéique

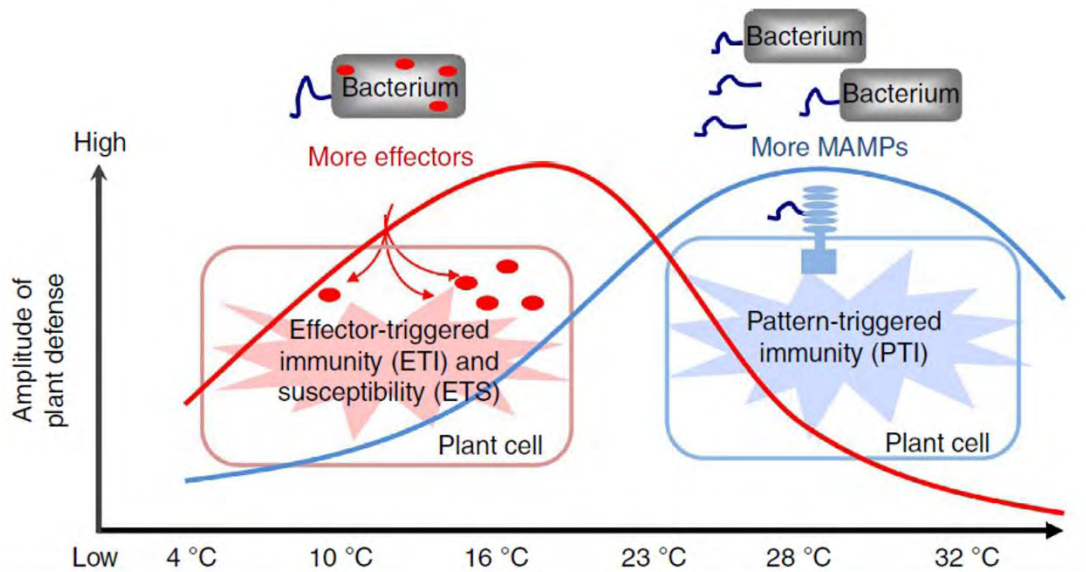


Figure 32. Modèle de fonctionnement des réponses immunitaires PTI et ETI des plantes en fonction de la température. À basse température, les bactéries sécrètent un large répertoire d'effecteurs de virulence pour promouvoir la pathogénicité (ETS), ce qui stimule les plantes à co-évoluer et à activer préférentiellement les réponses de défense liées à l'ETI. A température élevée, les bactéries se multiplient vigoureusement et produisent une quantité accrue de PAMPs, ce qui stimule les plantes à passer aux réponses liées à la PTI. La fluctuation de la température ambiante entraîne probablement la coévolution dynamique de la pathogénèse bactérienne et de l'immunité de l'hôte (Cheng *et al.*, 2013).

d'Arabidopsis et du profil d'expression très caractéristique au niveau de l'émergence des LR. Deux lignées mutantes indépendantes chez deux écotypes différents (Hawaii et M82) ont été générés par CRISPR-Cas9 ainsi qu'une lignée KO obtenue par TILLING. Ces lignées feront l'objet d'un phénotypage avec *Rs* mais également avec d'autres pathogènes pour lesquels la tomate est un hôte naturel afin d'évaluer si la résistance liée à CML8 identifiée chez Arabidopsis est efficace chez cette espèce végétale. Dans la mesure où il s'agit de la surexpression de *CML8* qui a révélé une meilleure résistance des plantes aux pathogènes testés, il pourrait être intéressant de générer également des lignées OE *CML8* chez *S. lycopersicum* ou d'identifier des accessions sauvages qui sur-expriment *CML8* naturellement.

Comme présenté dans la partie II du chapitre 2, la résistance à *Rs* liée à CML8 est cependant supprimée à température élevée, suggérant que cette réponse de défense est influencée par une élévation de la température, comme cela est le cas pour la majorité des résistances des plantes aux pathogènes. Quel que soit l'espèce végétale et le pathogène étudié ainsi que son mode de vie et d'infection, ces études ont démontré une plus grande sensibilité des plantes et/ou une inhibition des réponses de défense, et cela qu'il s'agisse de la PTI, de l'ETI ou de QDR. Cette inhibition a été principalement reporté pour les réponses immunitaires liées à l'ETI (Desaint *et al.*, 2021). Sans que cela puisse être généralisé, un modèle a été proposé dans lequel l'ETI serait compromise lors d'une élévation de la température, alors que la PTI deviendrait plus active (Cheng *et al.*, 2013), suggérant une adaptation de la réponse de défense de la plante en fonction de son optimum de croissance, de celui du pathogène et de ses mécanismes de virulence induits, fluctuant potentiellement selon la température. Cette différence permet d'expliquer l'observation contre-intuitive qu'alors que la sécrétion de leurs effecteurs serait inhibée, les pathogènes bactériens prolifèrent mieux dans les plantes à température élevée (Smirnova *et al.*, 2001) (Figure 32). Ce modèle, intéressant, reste à être étayé par des travaux permettant de comprendre les mécanismes impliqués. Cependant ils sont, encore et de façon surprenante, rares, essentiellement mené sur un pathosystème et du côté de la plante (Desaint *et al.*, 2021).

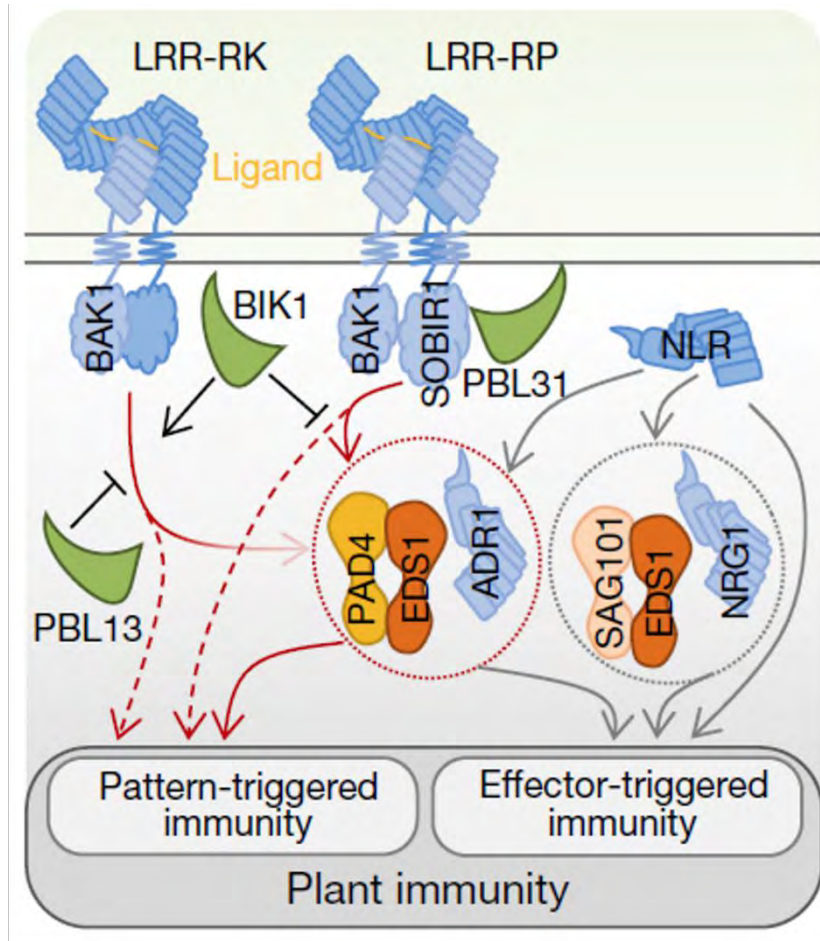


Figure 33. Le nœud EDS1-PAD4-ADR1 médie à la fois la PTI et l'ETI. Lors de la perception du ligand, les récepteurs LRR-RK (« Leucine Rich Repeat-Receptor Kinase ») et LRR-RP (« Leucine Rich Repeat-Receptor Protein ») se dimérisent avec BAK1 pour activer la PTI. Le nœud EDS1-PAD4-ADR1 joue un rôle clé dans la signalisation LRR-RP (flèches rouges) et un rôle moins important dans la signalisation LRR-RK (flèche grise). Certaines voies de signalisation de la PTI ne nécessitent pas EDS1-PAD4-ADR1 (lignes pointillées). L'ETI médiée par les NLRs dépend des nœuds EDS1-PAD4-ADR1 et/ou SAG101-EDS1-NRG1 ou est indépendante de l'un ou l'autre des nœuds de signalisation (flèches grises). Les kinases BIK1, PBL31 et PBL13 régulent la signalisation LRR-RP et LRR-RK (Pruitt *et al.*, 2021).

Comme mentionné dans le chapitre 1, la PTI et l'ETI sont depuis longtemps considérées comme deux composantes d'un modèle simple décrivant l'immunité végétale introduit par Jones & Dangl (2006) : le modèle en zigzag. Ce modèle, en plus des caractéristiques de chaque étape présentées précédemment, associe les PAMPs à des molécules conservées chez tous les microbes contribuant à leur fitness générale et les effecteurs à des molécules spécifiques à chaque espèce ou souche de pathogènes contribuant à leur virulence (Thomma *et al.*, 2011). Or de nombreuses données expérimentales remettent en cause ce modèle en suggérant qu'il n'y a peut-être pas une distinction aussi claire entre la PTI et l'ETI ou les PAMPs et les effecteurs (Kanyuka & Rudd, 2019). Par exemple, des effecteurs montrent, à l'instar des PAMPs, un niveau élevé de conservation au sein et entre différentes espèces de pathogènes. Les PAMPs présentent quant à eux, à l'instar des effecteurs, une certaine diversité de séquences et une faible distribution à travers l'espèce du pathogène. Également, l'ETI a pu être considérée comme une réponse de défenses plus fortes que la PTI alors qu'elles peuvent toutes deux être fortes ou faibles selon l'interaction plante-pathogène (Thomma *et al.*, 2011). En outre, l'activation de la HR peut aussi dépendre de la PTI et pas seulement de l'ETI (Ngou *et al.*, 2020). De plus, la PTI et l'ETI peuvent se potentialiser mutuellement. En effet, l'ETI peut accroître les réponses de défense liées à la PTI et l'activation des voies de signalisation de la PTI. L'ETI peut surmonter l'ETS en restaurant les composants de signalisation de la PTI et la PTI peut améliorer la réponse de HR induite par l'ETI (Ngou *et al.*, 2021). Enfin, les voies de signalisation de la PTI et l'ETI peuvent être similaires (Pruitt *et al.*, 2021) (Figure 33).

Ainsi, de nouveaux modèles apparaissent pour décrire la complexité de la réponse immunitaire chez les plantes et ces modèles sont probablement plus justes que celui initialement décrit par Jones & Dangl (2006). Par exemple, le modèle d'invasion décrit que les récepteurs de l'hôte (appelés « Invasion Pattern Receptors » ou IPR) détectent des ligands codés par des microbes ou dérivés de l'hôte qui indiquent une invasion (appelés « Invasion Patterns » ou IPs). Toute molécule pourrait servir d'IP et être potentiellement détectée par un récepteur immunitaire. Toutes les classes de récepteurs immunitaires pourraient alors induire une réponse immunitaire faible ou forte, être phylogénétiquement conservées ou variables,

conférer une immunité à une gamme étroite ou large d'envahisseurs et engager des voies de signalisation et des composants spécifiques ou plus courants. Le but de ce modèle est de fournir un cadre général pour discuter de la diversité des interactions plante-pathogène (Cook *et al.*, 2015; Kanyuka & Rudd, 2019). Un autre modèle proposé est le modèle de partition spatiale qui stipule que la classification des réponses immunitaires passe par la localisation spatiale de la reconnaissance du signal de danger. Ce signal peut être soit extracellulaire détecté par les récepteurs de surface cellulaire présents à la membrane plasmique, soit être intracellulaire et détecté par les récepteurs cytoplasmiques (van der Burgh & Joosten, 2019). La dichotomie floue entre la PTI et l'ETI s'est aussi illustrée dans notre étude transcriptomique où des DEGs détectés dans la réponse de défense à *Rs* liée à CML8 peuvent être assimilés à la fois aux réponses de la PTI et de l'ETI, notamment la voie de signalisation d'EDS1. Enfin, ce type de résistance interconnectée fait probablement partie d'une réponse plus complexe et polygénique telle la QDR, principalement observée en condition naturelle au sein de populations et caractérisée par une réponse de défense continue.

3) CML8 : une CML au carrefour entre l'immunité et le développement ?

La méthode choisie pour identifier les mécanismes moléculaires dépendants de CML8 et permettant la résistance à *Rs* a été l'étude des modifications du transcriptome chez des plantes KD et OE CML8 lors d'une inoculation avec *Rs* par RNA-sequencing. Cette méthode est intéressante car elle a permis l'identification d'acteurs précoces influencés de manière directe et/ou indirecte par CML8 lors de l'infection. Mais la compréhension des mécanismes moléculaires dépendants de CML8 passera aussi par l'identification des cibles protéiques de CML8. Pour cela, un crible double-hybride a été développée malheureusement sans succès dans le cadre du projet ANR CaPPTure. Une approche alternative pour étudier les interactions protéine-protéine qui est développée dans l'équipe au cours de la thèse d'Amandine Lucchin (2019-2022), dont le travail se focalise sur le rôle de CML8 au cours du développement racinaire, est celle de la co-immunoprécipitation. Cette approche a permis l'identification de 43 interactants putatifs de CML8 au

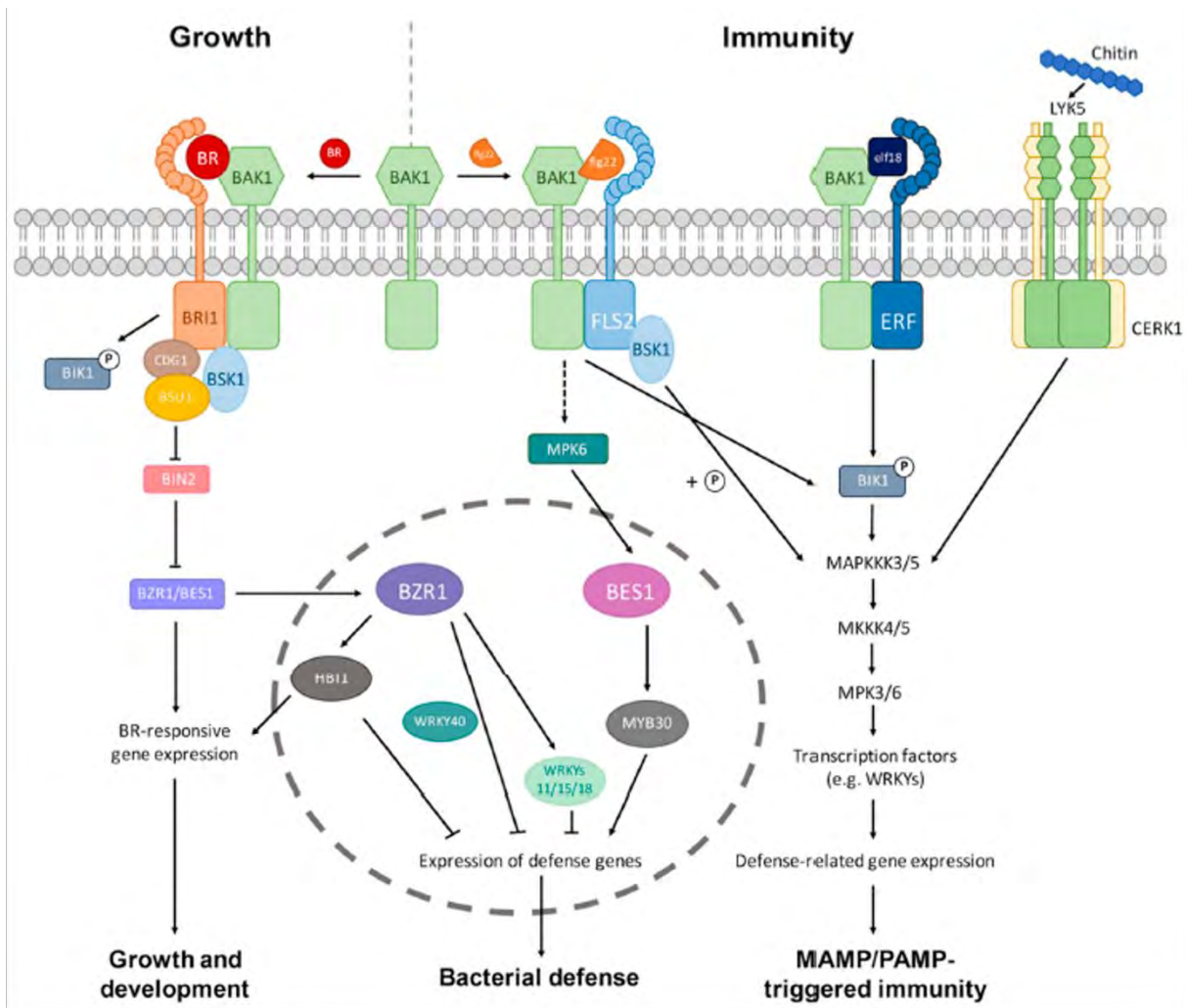


Figure 34. Modèle simplifié pour l'interaction des BRs avec les voies de l'immunité chez les plantes. La voie de signalisation des BRs entre en interaction avec différentes voies de l'immunité innée à plusieurs niveaux (récepteur, cytoplasme ou transcriptionnel). Cette interconnexion est soit dépendante de BAK1 (immunité déclenchée par flg22 ou elf18), soit indépendante (immunité déclenchée par la chitine), et la PTI déclenché par différents PAMPs converge vers des événements de signalisation en aval similaires, y compris l'activation des cascades des MAPK, l'activation de facteurs de transcription et l'expression des gènes liés à la défense. Les deux RLK, BIK1 et BSK1, relie directement le complexe récepteur FLS2-BAK1 et/ou ERF-BAK1 aux composants MAPKs en aval. Les deux facteurs de transcription BZR1 et BES1 jouent quant à eux des rôles distincts dans la défense déclenchée par flg22. BZR1 inhibe l'immunité des plantes en supprimant l'expression des gènes liés à la défense, tandis que BES1 renforce l'immunité des plantes en favorisant les voies de signalisation médiées par MYB30 (Yu *et al.*, 2018).

niveau des racines dont 9 spécifiques d'un traitement auxinique (Thèse Amandine Lucchin 2019-2022).

Comme d'autres CMLs, CML8 est également un acteur important dans le développement de la plante, notamment le développement racinaire. En effet, l'expression de *CML8* est induite par des traitements exogènes d'auxine et de BRs (Zhu, 2016; Thèse Amandine Lucchin 2019-2022). Les voies de signalisation de ces deux phytohormones sont interconnectées. En effet, les facteurs de transcription de la voie des BRs, BES1 et BZR1, interagissent avec les ARFs de la voie auxinique. De plus, les BRs coordonnent les réponses tropiques des organes végétaux en régulant le transport polaire de l'auxine. La modulation du transport de l'auxine par les BRs se traduit par la promotion de l'initiation des primordia des LR (Nolan *et al.*, 2020). Via la voie de signalisation de l'auxine, CML8 régule de manière positive la densité des racines secondaires et la surexpression de *CML8* induit une plus grande sensibilité au traitement BRs, (Thèse Amandine Lucchin 2019-2022). De plus, CML8 a été montré comme interagissant avec le récepteur aux BRs (BRI1) et cette interaction inhibe l'activité de trans-phosphorylation de BRI1 dans *E. coli* (Oh *et al.*, 2012). Il est maintenant bien connu que les BRs, originellement identifiés comme contrôlant des processus développementaux, sont importants dans la régulation des réponses immunitaires et le « trade-off » entre développement et immunité (Lozano-Durán & Zipfel, 2015). En effet, plusieurs acteurs de la voie de signalisation des BRs sont communs aux voies de signalisation des réponses immunitaires. L'un des plus importants est le co-récepteur BAK1 nécessaire à l'activation des voies en aval avec BRI1 mais également avec les récepteurs des PAMPs flg22 et elf18 FLS2 et EFR (Yu *et al.*, 2018) (Figure 34).

Dans la mesure où BAK1 est potentiellement considéré comme l'acteur limitant qui déciderait entre les voies des BRs et de l'immunité (Kong *et al.*, 2012), il serait intéressant d'évaluer si l'interaction entre CML8 et BRI1 a un effet sur BAK1.

Un autre aspect peu étudié jusqu'à présent mais qui pourrait avoir un fort impact sur la fonction de CML8 *in vivo* est les modifications post-traductionnelles de CML8. En effet, comme indiqué précédemment, des sites potentiels de phosphorylation et de myristoylation ont été prédits chez les CMLs (McCormack &

Braam, 2003; Boonburapong & Buaboocha, 2007; Zhu *et al.*, 2015; Munir *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2017). Également, la CML du riz OsCaM61 peut être prénylée, ce qui détermine sa localisation subcellulaire dans le noyau ou à la membrane plasmique (Dong *et al.*, 2002). Chez la CaM typique, la tri-méthylation sur le résidu lysine 115 affecte l'affinité de la CaM pour certaines de ces cibles, sa conformation après liaison au Ca^{2+} et son activité biologique car une forme de la CaM constitutivement exprimée chez le tabac où la lysine 115 a été remplacée par une arginine non-méthylable induit des problèmes développementaux chez ces plantes (Banerjee *et al.*, 2013). Ainsi, l'étude des modifications post-traductionnelles de CML8 permettrait de mieux comprendre sa fonction et ses interactions *in vivo*. Amandine Lucchin, doctorante dans l'équipe, a initié ce travail et cherche à identifier la présence et la localisation de certaines modifications post-traductionnelles chez CML8 (acétylation, tri-méthylation et phosphorylation) dans les racines d'*Arabidopsis* par des approches de spectrométrie de masse, afin d'évaluer si ces modifications ont un effet sur la localisation de CML8 et son interaction avec des protéines cibles dans les processus de développement racinaire.

Il serait évidemment intéressant de tester ces mêmes modifications dans le contexte des interactions plantes-microorganismes et si elles peuvent changer et être différentes en condition de stress combinés.

4) CML8 : cible de manipulation pour l'auxine de *Rs* ?

CML8 est induit par l'auxine et sa répression ou sa surexpression affecte le développement de l'architecture racinaire (Zhu, 2016). *CML8* est également exprimé de manière localisée à l'émergence des racines latérales (Zhu *et al.*, 2017) qui constituent un point d'entrée de *Rs* dans la plante (Péret *et al.*, 2009). La question s'est donc posée d'étudier le rôle de l'auxine dans l'interaction entre la plante et la bactérie afin de mieux comprendre les relations croisées entre *CML8* et l'auxine dans le pouvoir pathogène de *Rs*. Mon travail a ainsi été axé sur le partenaire bactérien de cette interaction. J'ai cherché à savoir si la souche GMI1000 de *Rs* était capable de biosynthétiser de l'auxine en faisant l'hypothèse que l'auxine synthétisée

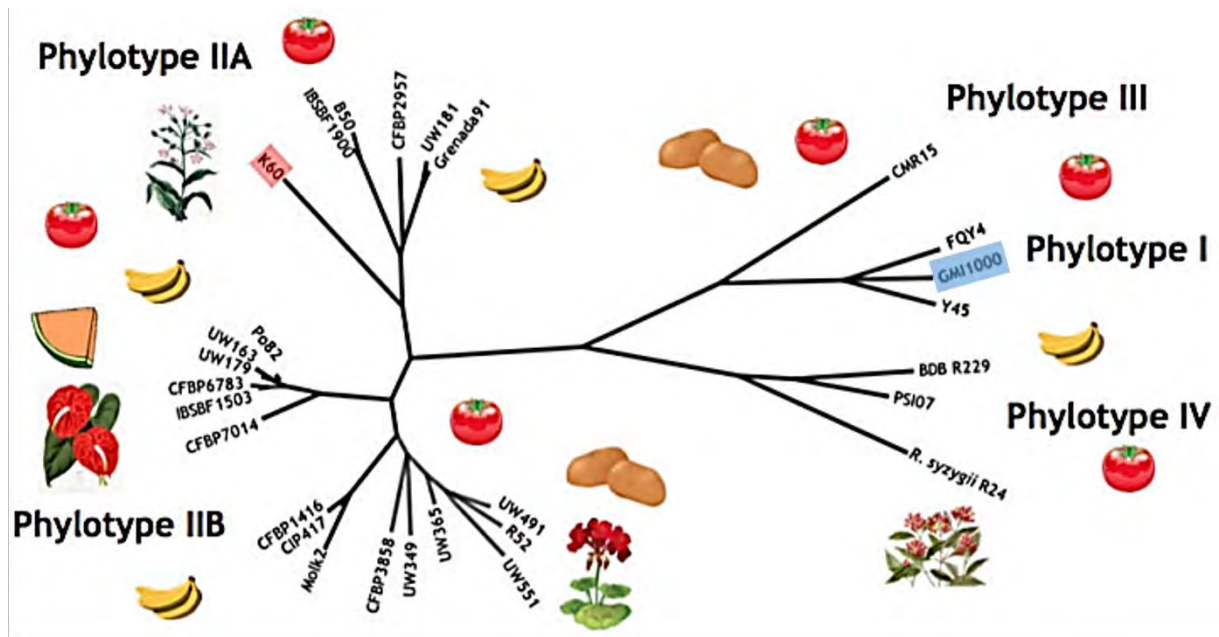


Figure 35. Classification par phylotype et diversité de spectre d'hôte des souches de *Rs*. L'arbre phylogénétique a été créé en fonction des distances génomiques calculées à partir de génomes complets. La souche K60 est encadrée en rouge et la souche GMI1000 est encadrée en bleu. Hôtes illustrés : banane, tomate, pomme de terre, melon, anthurium, tabac, géranium, giroflier (adaptée de Ailloud, 2015).

par *Rs* pourrait jouer un rôle dans la virulence de la bactérie, permettre la manipulation des voies dépendantes de CML8 et favoriser son infection. En effet, il est connu que de nombreux agents pathogènes produisent des phytohormones pour perturber les voies de signalisation végétale tels que l'oomycète *Pythium oligandrum* (Le Floch *et al.*, 2003) ou la bactérie *Pst* (McClerklin *et al.*, 2018).

À la suite du séquençage du génome de *Rs* (Salanoubat *et al.*, 2002), il a été établi que la bactérie possédait un ensemble de gènes suffisants pour synthétiser l'auxine. Cependant, ni la production d'auxine ni son rôle dans la virulence de *Rs* n'ont été démontrés à ce jour. Ainsi, nous avons exploré la capacité à produire de l'auxine de la souche sauvage GMI1000 de *Rs*. Par spectrométrie de masse, nous avons détecté pour la première fois que cette souche était effectivement capable de synthétiser de l'auxine et que cette auxine bactérienne était capable de déclencher des réponses développementales auxiniques classiques au niveau des racines des plantes. Après la souche K60, appartenant au phylotype IIA, GMI1000 est donc la deuxième souche de *Rs* montrée comme synthétisant de l'IAA (Phelps & Sequeira, 1967). La souche GMI1000 appartient au phylotype I qui est cependant génétiquement très éloigné de la souche K60 (Hayward, 1991) (Figure 35). L'auxine serait donc un facteur important pour *Rs* et il serait donc pertinent de rechercher si toutes les souches de *Rs* sont capables de produire de l'auxine, quel que soit leur phylotype. Si certaines souches naturelles n'en produisent pas, dans quels écosystèmes elles évoluent et quels sont leurs spectres d'hôtes pourront apporter des informations pour comprendre le rôle de l'auxine pour la bactérie.

Afin d'évaluer si l'auxine bactérienne est impliquée dans les mécanismes de virulence de *Rs*, nous avons cherché à obtenir une souche de *Rs* mutée dans sa capacité à produire de l'auxine afin d'évaluer si cette souche serait toujours aussi virulente sur des plantes que la souche sauvage ainsi que la contribution de CML8 lors de l'infection. Plusieurs souches mutantes des gènes de régulateurs majeurs du métabolisme et de la virulence de la bactérie ont été testées et les résultats ont montré que toutes ces souches sont toujours capables de produire de l'auxine. Les voies de biosynthèse de l'IAA chez *Rs* n'étant pas connues à ce jour, nous avons tenté d'identifier les précurseurs des différentes voies déjà confirmées chez d'autres

bactéries (Spaepen & Vanderleyden, 2011) afin d'identifier celles utilisées par *Rs*. Deux molécules (la tryptamine et l'IPA) n'ont pas été détectées ce qui pourrait suggérer que les voies de biosynthèse associées ne sont pas présentes ou pas majoritaires chez GMI1000, contrairement aux deux autres voies Trp-dépendantes, la voie de l'IAM et la voie de l'IAOx mais ces résultats seront à confirmer.

Nous avons également montré, qu'en culture seule, un traitement à l'auxine n'aurait pas d'effet ni sur la croissance de *Rs*, ni sur l'expression des gènes régulateurs majeurs de la virulence *hrpB* et *hrpG*. Il est possible que les concentrations d'IAA utilisées lors de ces expériences ait été trop faibles pour détecter un effet sur la bactérie. En effet, l'analyse du transcriptome de la bactérie de la rhizosphère *Azospirillum brasilense*, qui synthétise de l'IAA par la voie de l'IPA, a révélé une réponse transcriptionnelle importante de la bactérie à l'auxine mais seulement à une concentration (1 mM) plus élevée que celle qui modifie la physiologie de la plante (van Puyvelde *et al.*, 2011). Aussi, dans la mesure où nos expériences ont été réalisées avec de l'auxine synthétique, il pourrait être intéressant de les répéter en co-cultivant *Rs* et son hôte pour peut-être observer un potentiel rôle de l'auxine synthétisé par la bactérie sur la plante et sur sa virulence. En effet, une étude récente a montré que la colonisation d'*A. thaliana* par la bactérie du sol productrice d'IAA et bénéfique *Bacillus valesensis* FZB42 déclenche une réaction immunitaire de la part de l'hôte ainsi que la production de ROS, qui, à leur tour, stimulent la production d'auxine par les bactéries. Cette auxine sécrétée est nécessaire à la survie des bactéries dans des milieux contenant des niveaux élevés de ROS et à la formation de colonies sur les racines. La formation efficace de colonies permet aux bactéries de combattre les champignons pathogènes et d'améliorer la santé des plantes. Cela pourrait suggérer que l'IAA seule n'est peut-être pas suffisante pour induire une réponse chez les bactéries, similaire à son effet sur les plantes, mais qu'elle aurait besoin d'autres facteurs, comme les ROS, qui sont induits dans une situation de stress pour produire son effet (Tzipilevich & Benfey, 2021). Des expériences complémentaires seront donc nécessaires pour pouvoir statuer sur les rôles de l'IAA chez *Rs* de façon précise, et notamment l'obtention d'un mutant incapable de produire de l'auxine.

Pour cela, et grâce aux précédents résultats obtenus, nous avons fait appel à l'entreprise iMEAN qui a mis au point un outil d'analyse bio-informatique des gènes et du métabolisme de *Rs*. L'objectif de cette prestation était d'identifier les voies de biosynthèse de l'auxine présentes chez la souche GMI1000 de *Rs* par analyse de génomique comparative, de bibliographie, d'investigation des bases de données métaboliques, en vue de sélectionner les gènes les plus pertinents et d'étudier l'effet de leur mutation (création de mutants simples et multiples) sur la production d'auxine par la bactérie. Onze gènes candidats ont ainsi été identifiés, dont deux particulièrement intéressants pour la création de mutants simples et d'un mutant double qui se sont malheureusement avérés difficiles à générer. Néanmoins, le mutant simple RSc2077 a été généré récemment et sa capacité de production d'auxine pourra être caractérisée prochainement. S'il s'avère que ce mutant ne synthétise plus d'IAA, sa capacité à être virulent pourra être analysée sans oublier de comparer les taux de croissance de la souche mutante et de la souche sauvage *in vitro* mais également *in planta* si une différence de pathogénicité est détectée chez le mutant. Il sera important de garder en mémoire que si aucune différence de pathogénicité n'est décelée par ces tests, cela pourrait être parce que ceux-ci ne permettent qu'une fenêtre d'observation étroite et qu'ils ne sont pas assez sensibles et que d'autres méthodes telles que des tests de compétition dans des inoculations mixtes (Macho *et al.*, 2010) pourraient permettre de révéler un rôle possible de ces gènes dans la fitness bactérienne *in planta*.

Il faudrait également tenir compte d'une limitation de notre étude, à savoir qu'il s'agit d'une étude qualitative et non quantitative de la synthèse d'auxine par les souches de *Rs* testées. En effet, on ne peut pas exclure qu'une diminution de la quantité d'auxine produite par la bactérie, et non une abolition totale, puisse avoir un effet sur sa fitness ou sa virulence.

Pour obtenir plus d'informations sur les gènes candidats et sur leurs régulateurs, il serait intéressant d'établir une carte physique de leurs positionnements dans le génome de *Rs*. En effet, ce dernier est organisé en deux réplicons circulaires de 3,7 et 2,1 mégabases appelés respectivement chromosome et mégaplasmide (Genin & Boucher, 2004). Le chromosome porte la grande

majorité des gènes essentiels dit gènes de ménage alors que les gènes portés par le mégaplasmide correspondent aux fonctions liées à la virulence et l'adaptation à l'environnement tels que les gènes codant pour les systèmes de sécrétion de type III et VI, la biosynthèse des exopolysaccharides et la mobilité flagellaire (Genin & Denny, 2012). Ainsi, la présence des gènes liés à la biosynthèse de l'auxine sur le mégaplasmide pourrait potentiellement indiquer une fonction dans la virulence de *Rs*.

Cependant, l'IAA produite par *Rs* pourrait également être une molécule signal ayant probablement des rôles multiples (modulation des réponses des plantes, production d'antibiotiques, quorum-sensing) sans jouer de rôle direct dans l'infection (Bianco *et al.*, 2006; Matsukawa *et al.*, 2007; Spaepen *et al.*, 2007). En effet, d'autres molécules végétales associées à la défense des plantes sont également produites par des microorganismes. Par exemple, des coumarines ont été identifiées chez des bactéries et des champignons, telles que la novobiocine et la coumermycine isolées de *Streptomyces* (Eustaquio *et al.*, 2003), et les aflatoxines isolées de différentes espèces d'*Aspergillus* (Kumar *et al.*, 2017; Reen *et al.*, 2018), ainsi que des flavonoïdes découverts à partir de champignons et d'actinomycètes. Tous ces composés démontrent principalement des activités antimicrobiennes (Wang *et al.*, 2020).

En conclusion, au cours de ce travail, j'ai essayé d'approfondir nos connaissances sur le rôle de CML8 dans la réponse des plantes aux stress biotiques. J'ai apporté des éléments nouveaux sur le rôle de CML8 dans la résistance à plusieurs pathogènes et j'ai concentré mes travaux sur l'interaction avec *Rs*. Les résultats obtenus suggèrent que la protéine CML8 d'*A. thaliana* pourrait être au carrefour des réponses de défenses à plusieurs pathogènes mais également du développement racinaire. Ainsi, CML8 comme de nombreuses autres CMLs (par exemples, CML9 (Magnan *et al.*, 2008; Leba *et al.*, 2012), CML24 (Tsai *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011) ou encore CML42 (Dobney *et al.*, 2009; Scholz *et al.*, 2014) semble être une protéine multifonctionnelle impliquée dans de nombreux processus : le développement de la plante, l'immunité mais également

potentiellement la réponse aux stress abiotiques. Toutes ces protéines sont des « Ca²⁺ sensors » mais leur affinité pour le Ca²⁺ peut être différente. En conséquence, elles auront des modes d'activation différents en fonction de l'intensité de la variation de Ca²⁺. En effet, une CML ayant une forte affinité pour le Ca²⁺ captera de faibles variations de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ alors qu'une CML ayant une faible affinité pour le Ca²⁺ ne deviendra active que lorsqu'une forte variation de la concentration de Ca²⁺ sera détectée (Webb *et al.*, 2017). Ainsi, la signalisation calcique dépendante des CMLs reste complexe et on ne peut pas exclure qu'un certain niveau de redondance fonctionnelle ou qu'un effet additif entre CML8 et d'autres CMLs, parmi les 50 présentes chez *Arabidopsis*, existe. Pour aller plus loin, l'identification des cibles de CML8 *in planta* devra être élucidée dans les processus au cours desquels CML8 est impliqué, notamment en réponse à des phytopathogènes, ainsi que le rôle de l'auxine dans ces interactions.

CHAPITRE 5

MATÉRIELS & MÉTHODES

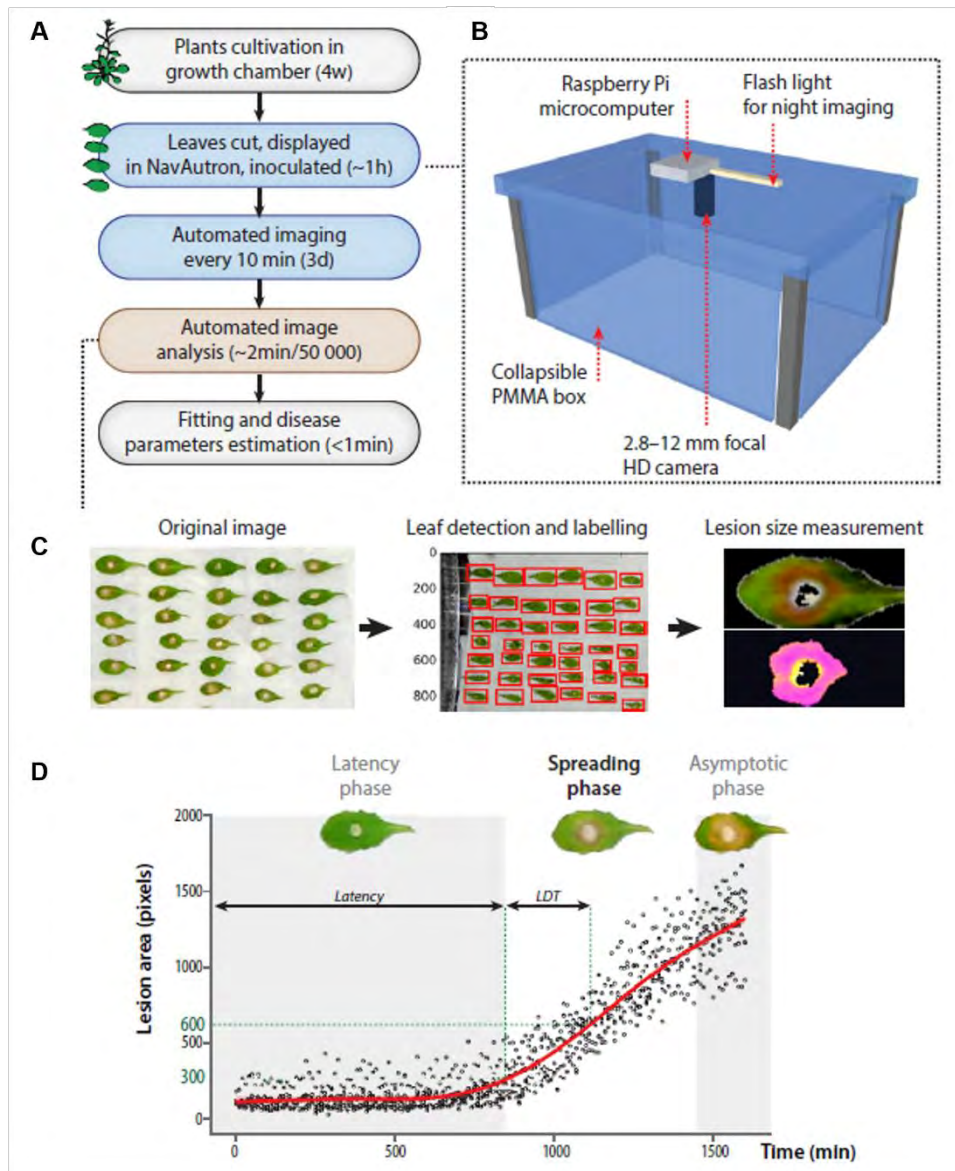


Figure 36. Présentation du système d'analyse Navatron pour les inoculations avec *S. sclerotiorum*. (A) Pipeline des expériences. Les feuilles détachées ont été analysées avec le Navatron par imagerie automatisée. La durée approximative de chaque étape du pipeline est indiquée (h, heures ; d, jours ; w, semaines). (B) La configuration du Navatron : chaque Navatron est constitué d'une boîte en plastique transparent (poly(méthyl-méthacrylate PMMA) équipée d'un micro-ordinateur Raspberry Pi, d'une caméra haute définition (HD) et d'un flash à LED. (C) Les trois principales étapes de l'analyse automatisée des images. (D) Cinétique typique du développement des lésions de *S. sclerotiorum* sur *A. thaliana*, illustrant la phase de latence, la phase de propagation et la phase asymptotique. Les valeurs caractéristiques sont la durée de la phase de latence et le temps de doublement des lésions (LDT). Les données présentées correspondent aux valeurs recueillies sur cinq feuilles de *A. thaliana* Col-0, la courbe rouge montre la moyenne ajustée (Barbacci *et al.*, 2020).

1) Avant-propos

Les matériels et méthodes présentés dans ce chapitre correspondent à ceux non présentés dans l'article Zhu, Mazard *et al.*, 2021 « The same against many: AtCML8, a Ca²⁺ sensor acting as a positive regulator of defense responses against several plant pathogens » (Chapitre 2 - Résultats, Partie I).

2) Phénotypage des lignées transgéniques CML8 lors d'inoculations avec *S. sclerotiorum* et *B. cinerea*

Des plantes sauvages Col-8 et des lignées transgéniques sous- (amiRNA 2.3.2) et sur-exprimant CML8 (OECML8 2.3 et OECML8 3.2) de 4 à 5 semaines ont été cultivées comme indiqué dans Zhu, Mazard *et al.*, 2021.

Pour les inoculations avec *S. sclerotiorum*, la souche 1980 (Derbyshire *et al.*, 2017) a été utilisée (cultivée sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Fluka) à 23°C et à l'obscurité) et les inoculations ont été réalisées comme décrite par Barbacci *et al.* (2020). Brièvement, les feuilles de plantes de 4 à 5 semaines ont été inoculées avec des bouchons de gélose de 5 mm de large contenant du PDA colonisé par le champignon. Ces bouchons de gélose contenant le pathogène fongique ont été placés sur la surface adaxiale des feuilles, et les plantes ont été incubés dans des plateaux fermés avec une pellicule de plastique pour maintenir une humidité relative de 80%. Des photos du développement de la maladie ont été prises automatiquement toutes les 10 minutes pendant 48 à 72 heures (Figure 36).

Pour les inoculations avec *B. cinerea*, la souche BD90 a été utilisée (cultivée sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar 39 g/L, Sigma Aldrich) à 22°C et à l'obscurité). Des spores du champignon à la concentration 10⁵ spores/mL ou une solution Mock ont été déposées par gouttes de 10 µL sur 4 feuilles par plante. Les bacs ont été fermés avec une pellicule de plastique pour maintenir une humidité relative élevée. L'infection a été suivie pendant 14 jours après inoculation et des photos du développement des symptômes ont été prises tous les jours.

| Gène | T-DNA insertion line | Nouveau nom | NASC ID | Localisation de l'insertion |
|-----------|----------------------|----------------|---------|-----------------------------|
| AT4G33070 | SALK_090204.47.20.x | AT4G33070_mut1 | N590204 | Exon |
| | SALK_018831.56.00.x | AT4G33070_mut3 | N518831 | Exon |
| AT4G14365 | SALK_056294.55.50.x | AT4G14365_mut1 | N556294 | Promotor |
| | SAIL_395_E02 | AT4G14365_mut2 | N873757 | Intron |
| AT3G25010 | SALK_024020.16.35.x | rlp41-1 | N524020 | Exon |
| | atrlp41-2 | rlp41-2 | N65483 | N/A |
| AT2G04450 | SALK_084842.53.05.x | AT2G04450_mut1 | N584842 | 5'UTR |
| | SALK_207859 | AT5G55450_mut1 | N697854 | 3'UTR |
| AT5G55450 | SALK_074488.48.40.x | AT5G55450_mut2 | N574488 | 3'UTR |
| | SALK_114673.37.70.x | AT2G39330_mut1 | N869518 | 5'UTR |
| AT2G39330 | SALK_109217.17.20.x | AT2G39330_mut2 | N609217 | Exon |
| | SALK_000951.56.00.x | AT2G18660_mut1 | N500951 | Intron |

Tableau S1. Récapitulatif des lignées mutantes homozygotes pour les phénotypages avec *Rs*. Pour chaque gène, les noms des lignées commandées aux NASC sont indiqués en face de leur nouveau nom utilisé dans le manuscrit. La localisation de l'insertion du T-DNA est indiquée.

3) Sélection, génotypage et phénotypage avec *Rs* des lignées mutantes pour les sept gènes candidats

Les lignées mutantes pour les sept gènes candidats du RNA-sequencing ont été sélectionnées avec l'outil Signal T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) recensant les insertions de T-DNA dans les gènes d'*A. thaliana* disponibles dans les banques de mutants. Les insertions préférentiellement choisies étaient celles localisées dans les séquences codantes des gènes et entre deux et trois lignées mutantes indépendantes ont été choisies pour chaque gène. Les mutants sélectionnés ont ensuite été commandés au NASC (récapitulés dans le tableau S1). Après réception des graines, celles-ci ont été semées comme décrit dans Zhu, Mazard *et al.*, 2021. Après 4 semaines de culture, l'ADN génomique des plantes a été extrait suivant la méthode du gradient de sucrose (Berendzen *et al.*, 2005). La présence d'une insertion T-DNA a été vérifiée par PCR en utilisant les amorces listées dans le tableau S2. Deux PCR ont été réalisées pour chaque mutant : la PCR avec les amorces LP et RP a permis d'amplifier le gène natif et la PCR avec les amorces RP et BP a permis de vérifier la présence du T-DNA. Les plantes homozygotes pour l'insertion ont été amenés à graines et les phénotypages avec *Rs* ont été réalisés comme décrits dans Zhu, Mazard *et al.*, 2021.

4) Phénotypage des lignées transgéniques *CML8* lors d'un stress combiné et simultané (inoculation avec *Rs* x élévation de la température)

Des plantes sauvages Col-8 et des lignées transgéniques sous- (amiRNA 2.3.2) et sur-exprimant *CML8* (OECML8 2.3 et OECML8 3.2) de 4 semaines ont été cultivées comme décrit dans Zhu, Mazard *et al.*, 2021. La réponse des plantes à la souche GMI1000 de *Rs* a été évaluée à 27°C et 30°C en utilisant la condition d'inoculation CUT où les racines ont été sectionnées avec des ciseaux à environ 1 cm du fond du jiffy donnant aux bactéries un accès direct aux vaisseaux du xylème. Les plantes ont été inoculées pendant 15 minutes dans 2 litres d'une suspension bactérienne à 10⁷ bactéries/mL puis transférées dans des chambres de culture avec des conditions contrôlées à 27°C ou 30°C (75% Humidité Relative, 12 h lumière, 100

| Mutant | Nom du primer | Séquence 5' -> 3' |
|----------------|---------------|-------------------------------------|
| AT4G33070_mut1 | LP | CACTTAGCTCGTCGTCTCGTC |
| | RP | TGGACCTGCAAAAATGTAAGC |
| | BP | ATTTTGCCGATTTTCGGAAC |
| AT4G33070_mut3 | LP | GTCTGTAGTCCAACAAACGGC |
| | RP | TGGACCTGCAAAAATGTAAGC |
| | BP | ATTTTGCCGATTTTCGGAAC |
| AT4G14365_mut1 | LP | CCCCTGAATCCAAAACCATAG |
| | RP | TTCCAACACCAACTCAACCTC |
| | BP | ATTTTGCCGATTTTCGGAAC |
| AT4G14365_mut2 | LP | AACCGAGTCCAGTCAACTCTG |
| | RP | CAAGCATATACCTCGATTGCG |
| | BP | TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC |
| rlp41-1 | LP | ATTTAACCTGTTGGGGTTTGC |
| | RP | TTGGCTACAATCGATTAACGG |
| | BP | ATTTTGCCGATTTTCGGAAC |
| rlp41-2 | LP | TGGTCCTCTATCTCCTCCAA |
| | RP | GCCTTCCCAGTTCAACACTTGTTCTG |
| | BP | TACGAATAAGAGCGTCCATTTTAGAGTGA |
| AT2G04450_mut1 | LP | TTTATCAAGCCATTGGGATTG |
| | RP | ACGACATTCGATCATTCTTG |
| | BP | ATTTTGCCGATTTTCGGAAC |
| AT5G55450_mut1 | LP | CCGACTTGGCTAAAAATACCC |
| | RP | TGCAAGTTGCAAAGAGACATG |
| | BP | ATTTTGCCGATTTTCGGAAC |
| AT5G55450_mut2 | LP | CCGACTTGGCTAAAAATACCC |
| | RP | TGCAAGTTGCAAAGAGACATG |
| | BP | ATTTTGCCGATTTTCGGAAC |
| AT2G39330_mut1 | LP | TAACGAACTTTGTACCGGTCG |
| | RP | GAATGATAACATGCAGCCAGG |
| | BP | ATTTTGCCGATTTTCGGAAC |
| AT2G39330_mut2 | LP | TGGCAATTTCCATCACTTTTC |
| | RP | CCGACTCCTATAATTCCAGCC |
| | BP | ATTTTGCCGATTTTCGGAAC |
| AT2G18660_mut1 | LP | TTTCCGGATATCCGAAATTC |
| | RP | ATGTGATTTAGGGTCTGCGTG |
| | BP | ATTTTGCCGATTTTCGGAAC |

Tableau S2. Liste des amorces utilisées pour les PCR de génotypage des lignées mutantes.

$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les symptômes de flétrissement ont été notés sur une échelle d'indice de maladie établie de 0 à 4, les notes 0 et 4 correspondant respectivement aux plantes saines et mortes. Les symptômes ont été suivis de 3 à 10 jours après inoculation (Deslandes *et al.*, 1998).

5) Test d'interaction par levure double-hybride

Les clones d'ADNc des gènes *SSL4* et *SSL5* d'*A. thaliana* ont été commandés auprès de l'ABRC (« Arabidopsis Biological Resource Center », <https://abrc.osu.edu/>) : références G82541 et DKLAT3G51430 respectivement. Les cadres ouverts de lecture pleine taille ont été introduits dans des vecteurs pGAD-NX-C (AD) et pGBG-NSC (BD) (Figure 37) (dérivés des plasmides pGADT7 et pGBKT7 de Clontech) par la technologie de clonage Gateway (Invitrogen) et les constructions ont été vérifiées par séquençage. Ces mêmes constructions pour les gènes *CaM3* (AT3G56800), *CML8* (AT4G14640), *CML9* (AT3G51920) et *PRR2* (AT4G18020) étaient déjà disponibles dans l'équipe. Les tests d'interaction dans la levure par double-hybride ont été effectués comme décrit par Perochon *et al.* (2010). Brièvement, des cellules de levure (souche AH109) ont été transformées avec les plasmides portants les constructions détaillées ci-dessus par choc thermique. Les colonies transformées ont été sélectionnées sur milieu sans tryptophane (W) et leucine (L) (SD-WL) puis sans tryptophane/leucine/histidine (H) (-WLH) et sans tryptophane/leucine/histidine/adenine (A) (-WLHA) (Sigma Aldrich). Ces milieux ont été complétés ou non par du 3-AT (3-Amino-1,2,4-Triazol) qui est un inhibiteur compétitif de la transcription utilisé pour empêcher l'auto-activation de la transcription.

6) Matériels bactériens et conditions de culture

Les souches de *Rs* ont été cultivées soit dans un milieu riche (Bactopeptone 10 g/L ; Acides casamino 1 g/L ; Extrait de levure 1 g/L ; Agar 15 g/L) + Triphényl

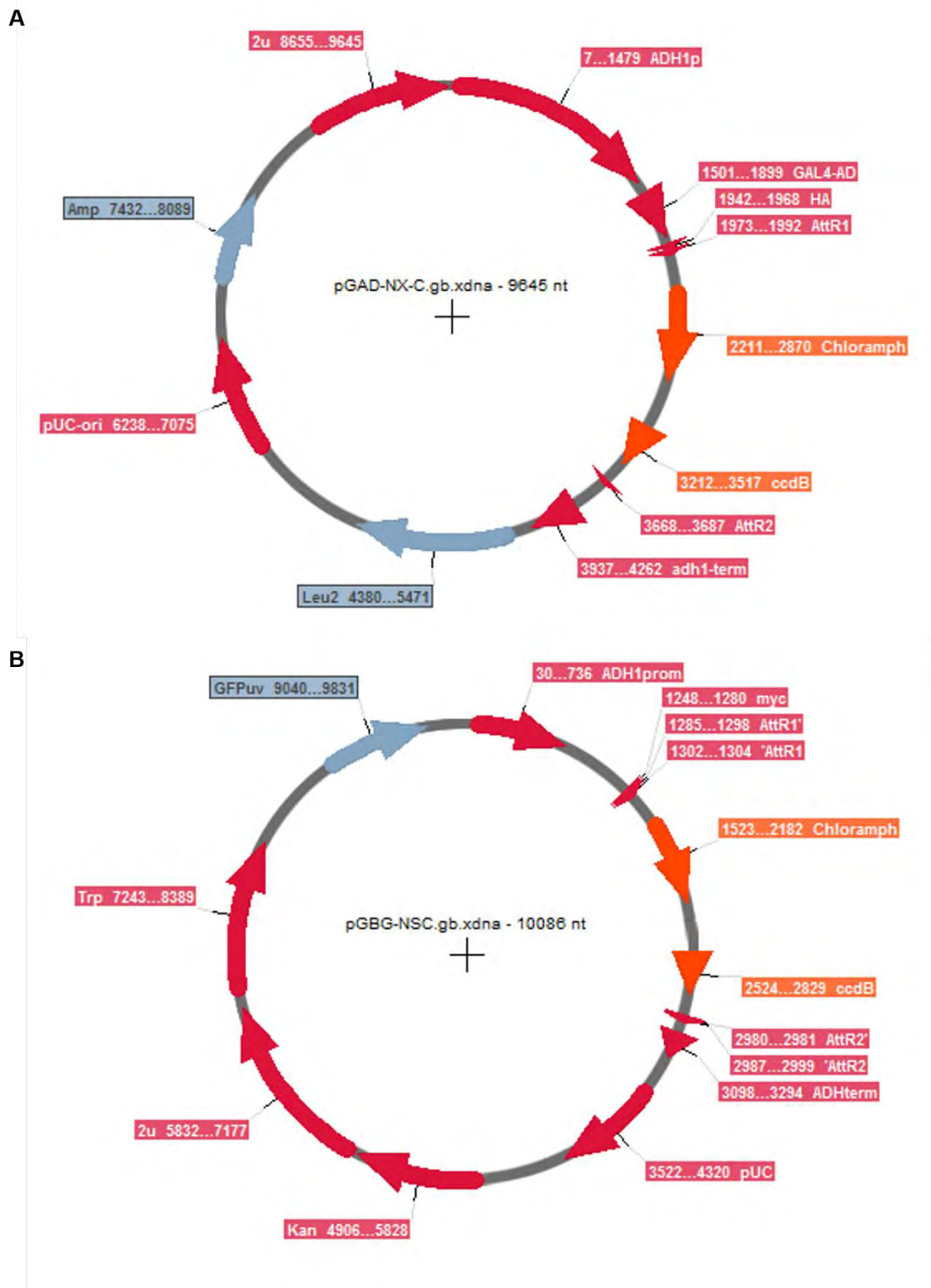


Figure 37. Cartes des vecteurs pGAD-NX-C et pGBG-NSC utilisés pour les constructions des tests d'interaction par levure double-hybride. (A) Carte du vecteur pGAD-NX-C pour les constructions AD. (B) Carte du vecteur pGBG-NSC pour les constructions BD.

Tétrazolium Chloride 1% + Glucose 20%, soit dans un milieu pauvre (KH_2PO_4 , 6,8g/L ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mL/L ; MgSO_4 10 mL/L ; FeSO_4 0,1 mL/L ; pH = 6,5).

7) Détection d'IAA à partir de milieux de culture bactériens par analyse LC-MS/MS

50 mL de culture bactérienne cultivée pendant la nuit en milieu riche ou pendant 24 heures en milieu minimum complémenté ou non avec du Trp ont été centrifugés à 7000 rpm pendant 30 min et filtrés pour obtenir les surnageants qui ont ensuite été acidifiés jusqu'à pH₃ avec une solution de HCl 2M. Puis 50 mL d'une solution d'acétate d'éthyle ont été ajoutés aux surnageants et les solutions ont été mélangées pendant 10 min. La phase supérieure a été récupérée et 50 mL d'acétate d'éthyle ont été ajoutés à la phase inférieure. Cette étape de partition a été répétée trois fois au total. Les trois phases supérieures extraites ont été regroupées et mises à évaporer sous flux d'azote. Les extraits obtenus ont été resolubilisés dans 100 µL de méthanol 80% avant d'être analysés en LC-MS/MS. Les analyses LC-MS/MS ont été réalisées sur un système UHPLC Dionex Ultimate série 3000 (Thermo Scientific, USA) couplé à un spectromètre de masse Q Exactive Plus (ThermoFisher, USA). La colonne utilisée pour la séparation chromatographique était une colonne Hypersyl GOLD aQ (100x2,1 mm, 1,9 µm, Thermo Scientific). Les phases mobiles utilisées étaient : A = H₂O UHQ + 0,1% acide formique (v/v) et B = acétonitrile + 0,1% acide formique (v/v). Le gradient d'éluion était le suivant : 0-1 min, 5 % B dans A ; 1 à 7 min, 5 à 96 % de B dans A ; 7-8 min, 96 % de B dans A ; 8-8,2 min, 96-5% B dans A ; 8,2-11 min, 5% B dans A. Le débit de la phase mobile était de 0,3 mL/minute, le volume injecté était de 10 µL et la température de la colonne était de 35°C. Les analyses ont été réalisées en mode positif sur la source Electrospray. Les paramètres appliqués étaient : tension capillaire : 3,5 kilovolts, température capillaire = 290°C, température de désolvatation : 450°C. L'identification de l'IAA a été réalisée par comparaison avec des standards commerciaux grâce aux temps de rétention chromatographiques et aux mesures de masse exactes.

8) Test d'activité de l'IAA bactérienne sur des plantules d'*A. thaliana*

Des plantules d'*A. thaliana* sauvages âgées d'une semaine ont été transférées dans des boîtes de Pétri (3 plantules par boîte) contenant du milieu MS 0,5X et 1,2% d'agar seul ou additionné de 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M et 10 μ M d'IAA ou des extraits de milieux de cultures bactériens concentrés en IAA (50 μ L d'extrait dans 2 mL de milieu MS 0,5X et 1,2% d'agar soit une concentration finale de 2,5%). La boîte est enveloppée de parafilm et les plantes sont cultivées pendant une semaine à 22°C avant prise de photographies.

9) Analyse de l'induction des gènes de virulence bactériens par dosage enzymatique de la β -galactosidase

Les souches GMI1425 (*HrpG::LacZ*) et GMI1475 (*HrpB::LacZ*) ont été mises en culture liquide pendant 24 heures dans du milieu minimum + glutamate (20mM) ou du milieu riche complétés avec de l'IAA à 1 μ M, 5 μ M et 10 μ M. Lorsque les cultures bactériennes ont atteint une DO_{600} entre 0,2 et 0,8, elles ont été centrifugées deux minutes à 6000 rpm. Les surnageants ont été aspirés avec une pompe à vide et les culots ont été repris dans 1,5 mL de tampon Z ($Na_2HPO_4, 7H_2O$, 16,1 g/L ; NaH_2PO_4, H_2O , 5,5 g/L ; KCl, 0,75 g/L ; $MgSO_4, 7H_2O$, 0,246 g/L ; pH = 7). 750 μ L de suspension bactérienne ont été ajoutés à 100 μ L de chloroforme et 50 μ L de SDS 0,1% afin de tuer les bactéries. Les échantillons ont été placés cinq minutes au bain marie à 28°C puis 150 μ L d'Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside (ONPG), qui est le substrat de l'enzyme β -galactosidase, ont été ajoutés toutes les dix secondes dans les tubes contenant les échantillons. Dès l'apparition d'une couleur jaune, la réaction a été figée par l'ajout de 375 μ L de CO_3Na_2 1 M et le temps a été noté. Les échantillons ont ensuite été placés dans de la glace avant centrifugation et les surnageants ont été transférés dans des cuves à spectrophotomètre où les DO à 420 nm (mesure du produit de l'activité β -galactosidase) et à 550 nm (composants cellulaires restants dans le surnageant) ont été relevées.

10) Analyse de la croissance bactérienne sur plaque après un traitement auxinique

Les souches bactériennes ont été suspendues dans du milieu riche et amenées par dilution à une DO_{600} de 0,1. Puis 100 μ L de milieu riche seul ou complétés avec de l'IAA 1 μ M et 5 μ M et 100 μ L de culture bactérienne ont été ajoutés dans les puits d'une plaque 96 qui a ensuite été placée dans le lecteur de microplaques FLUOstar Omega (BMG Labtech) pendant deux jours avec agitation à 28°C. La DO_{600} a été mesurée toutes les six minutes pendant 48 heures. Pour chaque souche, cinq répliques techniques et trois répliques biologiques ont été réalisés. En parallèle, une prise manuelle de la DO_{600} à 0, 4, 8, 24 et 28 heures a été faite sur des bactéries mises en culture dans du milieu riche seul ou complétés avec de l'IAA 1 μ M et 5 μ M. Trois répétitions biologiques ont été faites pour chaque condition.

11) Phénotypage des lignées transgéniques *CML8* lors d'une inoculation avec *Rs* après un traitement auxinique

Des plantes sauvages Col-8 et des lignées transgéniques sous- (amiRNA 2.3.2) et sur-exprimant *CML8* (OECML8 2.3 et OECML8 3.2) de 4 semaines ont été cultivées comme indiqué dans l'article Zhu, Mazard *et al.*, 2021. Une semaine avant l'inoculation, les plantes ont été arrosées avec de l'eau ou une solution d'eau additionnée d'IAA 10 μ M. L'inoculation et l'IGC ont été réalisées comme indiqué dans l'article Zhu, Mazard *et al.*, 2021.

Références

Acosta IF, Gasperini D, Chételat A, Stolz S, Santuari L, Farmer EE. 2013. Role of NINJA in root jasmonate signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 15473–15478.

Adie BAT, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez MM, Godoy M, Sánchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R. 2007. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 1665–1681.

Agrios GN. 2005. chapter six - HOW PLANTS DEFEND THEMSELVES AGAINST PATHOGENS. In: Agrios GN, ed. *Plant Pathology (Fifth Edition)*. Academic Press, 207–248.

Ailloud F. 2015. Le pouvoir pathogène chez *Ralstonia solanacearum* phylotype II : génomique intégrative et paysages transcriptomiques en relation avec l'adaptation à l'hôte.

Akke M, Forsén S, Chazin WJ. 1991. Molecular basis for co-operativity in Ca²⁺ binding to calbindin D9k. 1H nuclear magnetic resonance studies of (Cd²⁺)₁-bovine calbindin D9k. *Journal of Molecular Biology* **220**: 173–189.

Aldon D, Mbengue M, Mazars C, Galaud JP. 2018. Calcium signalling in plant biotic interactions. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 1–19.

Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Islam ST, Mushtaq M, Yadav P, et al. 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research* **212–213**: 29–37.

Álvarez-Fernández MA, Fernández-Cruz E, Garcia-Parrilla MC, Troncoso AM, Mattivi F, Vrhovsek U, Arapitsas P. 2019. *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* Intra- and Extra-Cellular Aromatic Amino Acids Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **67**: 7942–7953.

Álvarez B, Biosca EG, López MM. 2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*: 267-279.

Aoun N, Desaint H, Boyrie L, Bonhomme M, Deslandes L, Berthomé R, Roux F. 2020. A complex network of additive and epistatic quantitative trait loci underlies natural variation of *Arabidopsis thaliana* quantitative disease resistance to *Ralstonia solanacearum* under heat stress. *Molecular Plant Pathology* **21**: 1405-1420.

Aoun N, Tauleigne L, Lonjon F, Deslandes L, Vailliau F, Roux F, Berthomé R. 2017. Quantitative Disease Resistance under Elevated Temperature: Genetic Basis of New Resistance Mechanisms to *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1-16.

Astegno A, Bonza MC, Vallone R, La Verde V, D'Onofrio M, Luoni L, Molesini B, Dominici P. 2017. *Arabidopsis* calmodulin-like protein CML36 is a calcium (Ca²⁺) sensor that interacts with the plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform ACA8 and stimulates its activity. *Journal of Biological Chemistry* **292**: 15049-15061.

Bacete L, Mélida H, Miedes E, Molina A. 2018. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *Plant Journal* **93**: 614-636.

Bagheri R, Bashir H, Ahmad J, Iqbal M, Qureshi MI. 2015. Spinach (*Spinacia oleracea* L.) modulates its proteome differentially in response to salinity, cadmium and their combination stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **97**: 235-245.

Balint-Kurti P. 2019. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology* **20**: 1163-1178.

Banerjee J, Magnani R, Nair M, Dirk LM, De SB, Maiti IB, Houtz RL. 2013. Calmodulin-mediated signal transduction pathways in *Arabidopsis* are fine-tuned by methylation. *Plant Cell* **25**: 4493-4511.

Barash I, Manulis-Sasson S. 2007. Virulence mechanisms and host specificity of gall-forming *Pantoea agglomerans*. *Trends in Microbiology* **15**: 538-545.

Barbacci A, Navaud O, Mbengue M, Barascud M, Godiard L, Khafif M, Lacaze A, Raffaele S. 2020. Rapid identification of an Arabidopsis NLR gene as a candidate conferring susceptibility to *Sclerotinia sclerotiorum* using time-resolved automated phenotyping. *Plant Journal* **103**: 903–917.

Bartoli C, Roux F. 2017. Genome-wide association studies in plant pathosystems: Toward an ecological genomics approach. *Frontiers in Plant Science* **8**: 763.

Bender KW, Dobney S, Ogunrinde A, Chiasson D, Mullen RT, Teresinski HJ, Singh P, Munro K, Smith SP, Snedden WA. 2014. The calmodulin-like protein CML43 functions as a salicylic-acid-inducible root-specific Ca²⁺ sensor in Arabidopsis. *Biochemical Journal* **457**: 127–136.

Benjamins R, Galván Ampudia CS, Hooykaas PJJ, Offringa R. 2003. PINOID-mediated signaling involves calcium-binding proteins. *Plant Physiology* **132**: 1623–1630.

Berendzen K, Searle I, Ravenscroft D, Koncz C, Batschauer A, Coupland G, Somssich IE, Ülker B. 2005. A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between Arabidopsis thaliana ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. *Plant Methods* **1**.

Berens ML, Berry HM, Mine A, Argueso CT, Tsuda K. 2017. Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology* **55**: 401–425.

Bergougnoux V. 2014. The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances* **32**: 170–189.

Bernal P, Llamas MA, Filloux A. 2018. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. *Environmental Microbiology* **20**: 1–15.

Bhattacharya S, Bunick CG, Chazin WJ. 2004. Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1742**: 69–79.

Bi G, Su M, Li N, Liang Y, Dang S, Xu J, Hu M, Wang J, Zou M, Deng Y, et al. 2021. The ZAR1 resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling. *Cell* **184**: 3528-3541.e12.

Bianco C, Imperlini E, Calogero R, Senatore B, Amoresano A, Carpentieri A, Pucci P, Defez R. 2006. Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. *Archives of Microbiology* **185**: 373-382.

Bigeard J, Colcombet J, Hirt H. 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant* **8**: 521-539.

Block A, Schmelz E, Jones JB, Klee HJ. 2005. Coronatine and salicylic acid: The battle between *Arabidopsis* and *Pseudomonas* for phytohormone control. *Molecular Plant Pathology* **6**: 79-83.

Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* **7**: 1-16.

Boonburapong B, Buaboocha T. 2007. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biology* **7**.

Bouché N, Yellin A, Snedden WA, Fromm H. 2005. Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 435-466.

Boudsocq M, Droillard MJ, Regad L, Laurière C. 2012. Characterization of *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinases: Activated or not by calcium? *Biochemical Journal* **447**: 291-299.

Boudsocq M, Sheen J. 2013. CDPKs in immune and stress signaling. *Trends in Plant Science* **18**: 30-40.

Braam J. 1992. Regulated expression of the calmodulin-related TCH genes in cultured *Arabidopsis* cells: induction by calcium and heat shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 3213-3216.

- Brito B, Marena M, Barberis P, Boucher C, Genin S. 1999.** PrhJ and hrpG, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology* **31**: 237-251.
- Brown KK, Hampton MB. 2011.** Biological targets of isothiocyanates. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1810**: 888-894.
- Brumbley SM, Carney BF, Denny TP. 1993.** Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of PhcA, a putative LysR transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology* **175**: 5477-5487.
- Bürger M, Chory J. 2019.** Stressed Out About Hormones: How Plants Orchestrate Immunity. *Cell Host and Microbe* **26**: 163-172.
- van der Burgh AM, Joosten MHAJ. 2019.** Plant Immunity: Thinking Outside and Inside the Box. *Trends in Plant Science* **24**: 587-601.
- Campos ML, Kang J-H, Howe GA. 2014.** JASMONATE-TRIGGERED PLANT IMMUNITY. *Journal of Chemical Ecology* **40**: 655-675.
- Castañeda A, Reddy JD, El-Yacoubi B, Gabriel DW. 2005.** Mutagenesis of all eight avr genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one avr gene affected race specificity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 1306-1317.
- Cesari S. 2018.** Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytologist* **219**: 17-24.
- Chen Z, Agnew JL, Cohen JD, He P, Shan L, Sheen J, Kunkel BN. 2007.** *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 20131-20136.
- Cheng C, Gao X, Feng B, Sheen J, Shan L, He P. 2013.** Plant immune response to pathogens differs with changing temperatures. *Nature Communications* **4**: 1-9.

Cheval C. 2013. Contribution d'une 'Calmodulin-like protein' CML9, et d'un facteur de transcription de type GARP PRR2, à la mise en place des réactions de défense chez *Arabidopsis thaliana*.

Cheval C, Aldon D, Galaud JP, Ranty B. 2013. Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1833**: 1766-1771.

Chiasson D, Ekengren SK, Martin GB, Dobney SL, Snedden WA. 2005. Calmodulin-like proteins from *Arabidopsis* and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Plant Molecular Biology* **58**: 887-897.

Cochrane FC, Davin LB, Lewis NG. 2004. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: Kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* **65**: 1557-1564.

Cook DE, Mesarich CH, Thomma BPHJ. 2015. Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. *Annual Review of Phytopathology* **53**: 541-563.

Crépin A, Barbey C, Beury-Cirou A, Hélias V, Taupin L, Reverchon S, Nasser W, Faure D, Dufour A, Orange N, et al. 2012. Quorum sensing signaling molecules produced by reference and emerging soft-rot bacteria (*Dickeya* and *Pectobacterium* spp.). *PLoS ONE* **7**.

Day IS, Reddy VS, Shad Ali G, Reddy ASN. 2002. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome biology* **3**: RESEARCH0056.

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, et al. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**: 414-430.

Deepak S, Shailasree S, Kini RK, Hause B, Shetty SH, Mithöfer A. 2007. Role of hydroxyproline-rich glycoproteins in resistance of pearl millet against downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. *Planta* **226**: 323-333.

Delaney KJ, Xu R, Zhang J, Li QQ, Yun KY, Falcone DL, Hunt AG. 2006. Calmodulin interacts with and regulates the RNA-binding activity of an Arabidopsis polyadenylation factor subunit. *Plant Physiology* **140**: 1507-1521.

Delaspre F, Nieto Peñalver CG, Saurel O, Kiefer P, Gras E, Milon A, Boucher C, Genin S, Vorholt JA. 2007. The *Ralstonia solanacearum* pathogenicity regulator HrpB induces 3-hydroxy-oxindole synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 15870-5.

Delk NA, Johnson KA, Chowdhury NI, Braam J. 2005. CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca²⁺ sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress. *Plant Physiology* **139**: 240-253.

Delormel TY, Boudsocq M. 2019. Properties and functions of calcium-dependent protein kinases and their relatives in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **224**: 585-604.

Delplace F, Huard-Chauveau C, Dubiella U, Khafif M, Alvarez E, Langin G, Roux F, Peyraud R, Roby D. 2020. Robustness of plant quantitative disease resistance is provided by a decentralized immune network. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **117**: 18099-18109.

Demidchik V, Shabala S. 2017. Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated 'ROS-Ca²⁺ Hub'. *Functional Plant Biology* **45**: 9-27.

Derbyshire M, Denton-Giles M, Hegedus D, Seifbarghi S, Rollins J, Kan J Van, Seidl MF, Faino L, Mbengue M, Navaud O, et al. 2017. The complete genome sequence of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* reveals insights into the genome architecture of broad host range pathogens. *Genome Biology and Evolution* **9**: 593-618.

Desaint H, Aoun N, Deslandes L, Vailleau F, Roux F, Berthomé R. 2021. Fight hard or die trying: when plants face pathogens under heat stress. *New Phytologist*

229: 712-734.

Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Can C, Williams K, Holub E, Beynon J, Arlat M, Marco Y. 1998. Genetic Characterization of *RRS1*, a Recessive Locus in *Arabidopsis thaliana* that Confers Resistance to the Bacterial Soilborne Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 659-667.

Devendrakumar KT, Li X, Zhang Y. 2018. MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**: 2981-2989.

Ding P, Ding Y. 2020. Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends in Plant Science* **25**: 549-565.

Ding Y, Sun T, Ao K, Peng Y, Zhang Y, Li X, Zhang Y. 2018. Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity. *Cell* **173**: 1454-1467.

Ding Y, Wei W, Wu W, Davis RE, Jiang Y, Lee IM, Hammond RW, Shen L, Sheng JP, Zhao Y. 2013. Role of gibberellic acid in tomato defence against potato purple top phytoplasma infection. *Annals of Applied Biology* **162**: 191-199.

Dobney S, Chiasson D, Lam P, Smith SP, Snedden WA. 2009. The calmodulin-related calcium sensor CML42 plays a role in trichome branching. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 31647-31657.

Donati AJ, Lee HI, Leveau JHJ, Chang WS. 2013. Effects of Indole-3-Acetic Acid on the Transcriptional Activities and Stress Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS ONE* **8**: 1-11.

Dong A, Xin H, Yu Y, Sun C, Cao K, Shen W-H. 2002. The subcellular localization of an unusual rice calmodulin isoform, OsCaM61, depends on its prenylation status. *Plant Molecular Biology* **48**: 203-210.

Elphinstone J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: global overview. In: Allen C., Prior P. HAC, ed. *Bacterial Wilt Diseases and the Ralstonia solanacearum*

Species Complex. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 9-28.

Elphinstone JG, Stanford HM, Stead DE. 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum* in Potato Tubers, *Solanum dulcamara* and Associated Irrigation Water. In: Prior P., Allen C., Elphinstone J. (eds) *Bacterial Wilt Disease*. Springer, Berlin, Heidelberg. Berlin, Heidelberg: Springer.

Estenson K, Hurst GB, Standaert RF, Bible AN, Garcia D, Chourey K, Doktycz MJ, Morrell-Falvey JL. 2018. Characterization of Indole-3-acetic Acid Biosynthesis and the Effects of This Phytohormone on the Proteome of the Plant-Associated Microbe *Pantoea* sp. YR343. *Journal of Proteome Research* **17**: 1361-1374.

Eustaquio AS, Gust B, Luft T, Li S-M, Chater KF, Lutz H. 2003. Clorobiocin Biosynthesis in *Streptomyces*: Identification of the Halogenase and Generation of Structural Analogs. *Chemistry & Biology* **10**: 279-288.

Fegan M, Prior P. 2005. How complex is the '*Ralstonia solanacearum* species complex'? *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*: 449-461.

Feng F, Zhou JM. 2012. Plant-bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 469-476.

Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, et al. 2011. The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701-715.

Ferrari S, Galletti R, Pontiggia D, Manfredini C, Lionetti V, Bellincampi D, Cervone F, De Lorenzo G. 2008. Transgenic Expression of a Fungal endo-Polygalacturonase Increases Plant Resistance to Pathogens and Reduces Auxin Sensitivity. *Plant Physiology* **146**: 669-681.

Fett WF, Osman SF, Dunn MF. 1987. Auxin production by plant-pathogenic pseudomonads and xanthomonads. *Applied and Environmental Microbiology* **53**:

1839-1845.

Fischer C, Kugler A, Hoth S, Dietrich P. 2013. An IQ domain mediates the interaction with calmodulin in a plant cyclic nucleotide-gated channel. *Plant and Cell Physiology* **54**: 573-584.

Le Floch G, Rey P, Benizri E, Benhamou N, Tirilly Y. 2003. Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant and Soil* **257**: 459-470.

French E, Kim BS, Iyer-Pascuzzi AS. 2016. Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **56**: 201-208.

Fu J, Liu H, Li Y, Yu H, Li X, Xiao J, Wang S. 2011. Manipulating broad-spectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin accumulation in rice. *Plant Physiology* **155**: 589-602.

Gachon C, Saindrenan P. 2004. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 367-371.

Gallie DR. 2015. Ethylene receptors in plants - Why so much complexity? *F1000Prime Reports* **7**: 1-12.

Gao Z, Wen CK, Binder BM, Chen YF, Chang J, Chiang YH, Kerris RJ, Chang C, Schaller GE. 2008. Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 23801-23810.

García-Andrade J, González B, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez PL, Vera P. 2020. The role of ABA in plant immunity is mediated through the PYR1 receptor. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 1-22.

García RO, Kerns JP, Thiessen L. 2019. *Ralstonia solanacearum* species complex: A quick diagnostic guide. *Plant Health Progress* **20**: 7-13.

Garcion C, Lohmann A, Lamodièrre E, Catinot J, Buchala A, Doermann P,

Métraux JP. 2008. Characterization and biological function of the Isochorismate Synthase2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiology* **147**: 1279-1287.

Genin S. 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist* **187**: 920-928.

Genin S, Boucher C. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 107-134.

Genin S, Brito B, Denny TP, Boucher C. 2005. Control of the *Ralstonia solanacearum* Type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. *FEBS Letters* **579**: 2077-2081.

Genin S, Denny TP. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Annual Review of Phytopathology* **50**: 67-89.

Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ. 2007. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochemical Journal* **405**: 199-221.

Glickmann E, Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 793-796.

Glickmann E, Gardan L, Jacquet S, Hussain S, Elasri M, Petit A, Dessaux Y. 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 156-162.

Głowacki S, Macioszek VK, Kononowicz AK. 2011. R proteins as fundamentals of plant innate immunity. *Cellular and Molecular Biology Letters* **16**: 1-24.

Goda H, Sawa S, Asami T, Fujioka S, Shimada Y, Yoshida S. 2004. Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in arabidopsis. *Plant Physiology* **134**: 1555-1573.

Godiard L, Sauviac L, Torii KU, Grenon O, Mangin B, Grimsley NH, Marco Y.

2003. ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant Journal* **36**: 353–365.

Gough C, Sadanandom A. 2021. Understanding and exploiting post-translational modifications for plant disease resistance. *Biomolecules* **11**: 1–36.

Greenberg JT, Yao N. 2004. The role of regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**: 201–211.

Grefen C, Städele K, Růžička K, Obrdlík P, Harter K, Horák J. 2008. Subcellular localization and in vivo interactions of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor family members. *Molecular Plant* **1**: 308–320.

Guan R, Su J, Meng X, Li S, Liu Y, Xu J, Zhang S. 2015. Multilayered regulation of ethylene induction plays a positive role in *Arabidopsis* resistance against *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology* **169**: 299–312.

Guo Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu JK. 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **13**: 1383–1399.

Gupta A, Bhardwaj M, Tran LSP. 2020. Jasmonic acid at the crossroads of plant immunity and *Pseudomonas syringae* virulence. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 1–19.

Haeger W, Henning J, Heckel DG, Pauchet Y, Kirsch R. 2020. Direct evidence for a new mode of plant defense against insects via a novel polygalacturonase-inhibiting protein expression strategy. *Journal of Biological Chemistry* **295**: 11833–11844.

Harper JR, Breton G, Harmon A. 2004. Decoding Ca²⁺ signals through plant protein kinases. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 263–288.

Hartmann J, Fischer C, Dietrich P, Sauter M. 2014. Kinase activity and calmodulin binding are essential for growth signaling by the phytosulfokine receptor PSKR1. *Plant Journal* **78**: 192–202.

Hartmann J, Stührwohldt N, Dahlke RI, Sauter M. 2013. Phytosulfokine control of growth occurs in the epidermis, is likely to be non-cell autonomous and is dependent on brassinosteroids. *Plant Journal* **73**: 579-590.

Hayward AC. 1991. Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review Phytopathology* **29**: 65-87.

Hemnani T, Parihar M. 1998. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* **42**: 440-452.

Heo W Do, Lee SH, Kim MC, Kim JC, Chung WS, Chun HJ, Lee KJ, Park CY, Park HC, Choi JY, et al. 1999. Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 766-771.

Hrabak EM, Chan CWM, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, et al. 2003. The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology* **132**: 666-680.

Hua J, Meyerowitz EM. 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94**: 261-271.

Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, Chen QG, Bleecker AB, Ecker JR, Meyerowitz EM. 1998. EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1321-1332.

Hua L, Yong C, Zhanquan Z, Boqiang L, Guozheng Q, Shiping T. 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety* **2**: 111-119.

Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou YH, Yu JQ, Chen Z. 2010. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology* **153**: 1526-1538.

Huang H, Ullah F, Zhou DX, Yi M, Zhao Y. 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science* **10**: 1-10.

Huang W, Wang Y, Li X, Zhang Y. 2020. Biosynthesis and Regulation of Salicylic Acid and N-Hydroxyphenylacetic Acid in Plant Immunity. *Molecular Plant* **13**: 31-41.

Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY. 2014. Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant* **7**: 1267-1287.

Jameson PE. 2000. Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions - An overview. *Plant Growth Regulation* **32**: 369-380.

Javed T, Shabbir R, Ali A, Afzal I, Zaheer U, Gao SJ. 2020. Transcription factors in plant stress responses: Challenges and potential for sugarcane improvement. *Plants* **9**: 1-18.

Jeandet P. 2015. Phytoalexins: Current progress and future prospects. *Molecules* **20**: 2770-2774.

Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.

Ju C, Yoon GM, Shemansky JM, Lin DY, Ying ZI, Chang J, Garrett WM, Kessenbrock M, Groth G, Tucker ML, et al. 2012. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 19486-19491.

Kamoun S, Furzer O, Jones JDG, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJD, Roy SG, Schena L, Zambounis A, Panabières F, et al. 2015. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **16**: 413-434.

Kanyuka K, Rudd JJ. 2019. Cell surface immune receptors: the guardians of the plant's extracellular spaces. *Current Opinion in Plant Biology* **50**: 1-8.

Kazan K, Manners JM. 2013. MYC2: The master in action. *Molecular Plant* **6**: 686-703.

Kim MC, Chung WS, Yun DJ, Cho MJ. 2009. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Molecular Plant* **2**: 13-21.

Koga J. 1995. Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular* **1249**: 1-13.

Koga J, Adachi T, Hidaka H. 1991. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. *MGG Molecular & General Genetics* **226**: 10-16.

Kolukisaoglu Ü, Weinl S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J. 2004. Calcium Sensors and Their Interacting Protein Kinases: Genomics of the Arabidopsis and Rice CBL-CIPK Signaling Networks. *Plant Physiology* **134**: 43-58.

Kong X, Pan J, Cai G, Li D. 2012. Recent insights into brassinosteroid signaling in plants: Its dual control of plant immunity and stomatal development. *Molecular Plant* **5**: 1179-1181.

Krämer U. 2015. Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* **4**: 1-13.

Kretsinger. 2004. Calcium-Modulated Proteins (EF-Hand). In: Encyclopedia of Biological Chemistry. 294-299.

Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK, Kang SG. 2017. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1-10.

Kunkel BN, Harper CP. 2018. The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. *Journal of Experimental Botany* **69**: 245-254.

Leba L-J. 2011. Contribution de CML9, une « Calmodulin-like protein » à la mise en place de réactions de défense chez *Arabidopsis thaliana*.

Leba L-J, Cheval C, Ortiz-Martin I, Ranty B, Beuzon CR, Galaud JP, Aldon D. 2012. CML9, an Arabidopsis calmodulin-like protein, contributes to plant innate immunity through a flagellin-dependent signalling pathway. *The Plant Journal* **71**:

976-989.

Levine A, Tenhaken R, Lamb C. 1994. H2O₂ from the Oxidative Burst Orchestrates the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response. *Cell* **79**: 583-593.

Levy M, Wang Q, Kaspi R, Parrella MP, Abel S. 2005. Arabidopsis IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant Journal* **43**: 79-96.

Leyser O. 2018. Auxin signaling. *Plant Physiology* **176**: 465-479.

Li G, Meng X, Wang R, Mao G, Han L, Liu Y, Zhang S. 2012. Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in arabidopsis. *PLoS Genetics* **8**: e1002767.

Liang L, Flury S, Kalck V, Hohn B, Molinier J. 2006. CENTRIN2 interacts with the arabidopsis homolog of the human XPC protein (AtRAD4) and contributes to efficient synthesis-dependent repair of bulky DNA lesions. *Plant Molecular Biology* **61**: 345-356.

Liao J, Deng J, Qin Z, Tang J, Shu M, Ding C, Liu J, Hu C, Yuan M, Huang Y, et al. 2017. Genome-Wide identification and analyses of calmodulins and Calmodulin-Like proteins in lotus japonicas. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1-12.

Liese A, Romeis T. 2013. Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1833**: 1582-1589.

Lin WD, Liao YY, Yang TJW, Pan CY, Buckhout TJ, Schmidt W. 2011. Coexpression-based clustering of Arabidopsis root genes predicts functional modules in early phosphate deficiency signaling. *Plant Physiology* **155**: 1383-1402.

Ljung K. 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* **140**: 943-950.

Llorente F, Alonso-Blanco C, Sánchez-Rodríguez C, Jorda L, Molina A. 2005. ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from Arabidopsis are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant Journal* **43**: 165-180.

Loivamäki M, Stührwohldt N, Deeken R, Steffens B, Roitsch T, Hedrich R, Sauter M. 2010. A role for PSK signaling in wounding and microbial interactions in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* **139**: 348-357.

Lozano-Durán R, Zipfel C. 2015. Trade-off between growth and immunity: Role of brassinosteroids. *Trends in Plant Science* **20**: 12-19.

Luan S, Kudla J, Rodríguez-concepcion M, Yalovsky S, GUISSEM W. 2002. Calmodulins and Calcineurin B - like Proteins : Calcium Sensors for Specific Signal Response Coupling in Plants. *The Plant Cell Supplement*: 389-400.

Ludwig-Müller J. 2011. Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1757-1773.

Ma W, Smigel A, Tsai YC, Braam J, Berkowitz GA. 2008. Innate immunity signaling: Cytosolic Ca²⁺ elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiology* **148**: 818-828.

Macho AP, Guidot A, Barberis P, Beuzón CR, Genin S. 2010. A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 1197-1205.

Magnan F, Ranty B, Charpentreau M, Sotta B, Galaud JP, Aldon D. 2008. Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from Arabidopsis thaliana, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *The Plant Journal* **56**: 575-589.

Makiyama RK, Fernandes CAH, Dreyer TR, Moda BS, Matioli FF, Fontes MRM, Maia IG. 2016. Structural and thermodynamic studies of the tobacco calmodulin-like rgs-CaM protein. *International Journal of Biological Macromolecules* **92**: 1288-1297.

Malik NAA, Kumar IS, Nadarajah K. 2020. Elicitor and receptor molecules: Orchestrators of plant defense and immunity. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 1-34.

Malinovsky FG, Fangel JU, Willats WGT. 2014. The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1-12.

Mang HG, Qian W, Zhu Y, Qian J, Kang HG, Klessig DF, Hua J. 2012. Abscisic acid deficiency antagonizes high-temperature inhibition of disease resistance through enhancing nuclear accumulation of resistance proteins SNC1 and RPS4 in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 1271-1284.

Mano Y, Nemoto K. 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* **63**: 2853-2872.

Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer S V., Machado MA, et al. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**: 614-629.

Manulis S, Haviv-Chesner A, Brandl MT, Lindow SE, Barash I. 1998. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 634-642.

Mao J, Manik SMN, Shi S, Chao J, Jin Y, Wang Q, Liu H. 2016. Mechanisms and physiological roles of the CBL-CIPK networking system in *Arabidopsis thaliana*. *Genes* **7**: 1-15.

Matsukawa E, Nakagawa Y, Iimura Y, Hayakawa M. 2007. Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. *Actinomycetologica* **21**: 32-39.

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

McClerklin SA, Lee SG, Harper CP, Nwumeh R, Jez JM, Kunkel BN. 2018. Indole-

3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000. *PLoS Pathogens* **14**: 1–24.

McCormack E, Braam J. 2003. Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. *New Phytologist* **159**: 585–598.

McCormack E, Tsai YC, Braam J. 2005. Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends in Plant Science* **10**: 383–389.

Meng H, Sun M, Jiang Z, Liu Y, Sun Y, Liu D, Jiang C, Ren M, Yuan G, Yu W, et al. 2021. Comparative transcriptome analysis reveals resistant and susceptible genes in tobacco cultivars in response to infection by *Phytophthora nicotianae*. *Scientific Reports* **11**: 1–13.

Meng X, Zhang S. 2013. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology* **51**: 245–266.

Miller RNG, Alves GSC, Van Sluys MA. 2017. Plant immunity: Unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of Botany* **119**: 681–687.

Mitra RM, Gleason CA, Edwards A, Hadfield J, Downie JA, Oldroyd GED, Long SR. 2004. A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 4701–4705.

Mittler R. 2017. ROS Are Good. *Trends in Plant Science* **22**: 11–19.

Mizuno T. 2005. Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: From hormone responses to circadian rhythms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **69**: 2263–2276.

Molinier J, Ramos C, Fritsch O, Hohn B. 2004. Centrin2 modulates homologous recombination and nucleotide excision repair in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1633–1643.

Monaghan J, Zipfel C. 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 349-357.

Morel A, Guinard J, Lonjon F, Sujeeun L, Barberis P, Genin S, Vaillau F, Daunay MC, Dintinger J, Poussier S, et al. 2018. The eggplant AG91-25 recognizes the Type III-secreted effector RipAX2 to trigger resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum* species complex). *Molecular Plant Pathology* **19**: 2459-2472.

Mosher S, Seybold H, Rodriguez P, Stahl M, Davies KA, Dayaratne S, Morillo SA, Wierzba M, Favery B, Keller H, et al. 2013. The tyrosine-sulfated peptide receptors PSKR1 and PSY1R modify the immunity of Arabidopsis to biotrophic and necrotrophic pathogens in an antagonistic manner. *Plant Journal* **73**: 469-482.

Munir S, Khan MRG, Song J, Munir S, Zhang Y, Ye Z, Wang T. 2016. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of calmodulin-like (CML) proteins in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Physiology and Biochemistry* **102**: 167-179.

Nagano AJ, Fukao Y, Fujiwara M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. 2008. Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type β -glucosidase complexes in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology* **49**: 969-980.

Nakahara KS, Masuta C, Yamada S, Shimura H, Kashihara Y, Wada TS, Meguro A, Goto K, Tadamura K, Sueda K, et al. 2012. Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 10113-10118.

Narumiya S, Takai K, Tokuyama T, Noda Y, Ushiro H, Hayaishi O. 1979. A new metabolic pathway of tryptophan initiated by tryptophan side chain oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **254**: 7007-7015.

Nascimento FX, Rossi MJ, Glick BR. 2018. Ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) in plant-bacterial interactions. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1-17.

Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG. 2006. A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science* **312**: 436-440.

Nawrath C, Métraux J-P. 1999. Salicylic Acid Induction-Deficient Mutants of Arabidopsis Express. *The Plant Cell* **11**: 1393-1404.

Ngou BPM, Ahn HK, Ding P, Jones JDG. 2021. Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* **592**: 110-115.

Ngou BPM, Ahn HK, Ding P, Redkar A, Brown H, Ma Y, Youles M, Tomlinson L, Jones JDG. 2020. Estradiol-inducible AvrRps4 expression reveals distinct properties of TIR-NLR-mediated effector-triggered immunity. *Journal of Experimental Botany* **71**: 2186-2197.

Ning Y, Liu W, Wang GL. 2017. Balancing Immunity and Yield in Crop Plants. *Trends in Plant Science* **22**: 1069-1079.

Nolan TM, Vukasinović N, Liu D, Russinova E, Yin Y. 2020. Brassinosteroids: Multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses. *Plant Cell* **32**: 298-318.

Nonhebel HM. 2015. Tryptophan-independent indole-3-acetic acid synthesis: Critical evaluation of the evidence. *Plant Physiology* **169**: 1001-1005.

Normanly J. 2010. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**: 1-17.

Oberhansli T, Defago G, Haas D. 1991. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: Role of tryptophan side chain oxidase. *Journal of General Microbiology* **137**: 2273-2279.

Ogunrinde A, Munro K, Davidson A, Ubaid M, Snedden WA. 2017. Arabidopsis calmodulin-like proteins, CML15 and CML16 possess biochemical properties distinct from calmodulin and show non-overlapping tissue expression patterns. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1-17.

Oh MH, Kim HS, Wu X, Clouse SD, Zielinski RE, Huber SC. 2012. Calcium/calmodulin inhibition of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID- INSENSITIVE 1 receptor kinase provides a possible link between calcium and brassinosteroid signalling. *Biochemical Journal* **443**: 515-523.

Ouyang J, Shao X, Li J. 2000. Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* **24**: 327-334.

Pagán I, Fraile A, Fernandez-Fueyo E, Montes N, Alonso-Blanco C, García-Arenal F. 2010. Arabidopsis thaliana as a model for the study of plant-virus co-evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**: 1983-1995.

Park HC, Park CY, Koo SC, Cheong MS, Kim KE, Kim MC, Lim CO, Lee SY, Yun DJ, Chung WS. 2010. AtCML8, a calmodulin-like protein, differentially activating CaM-dependent enzymes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Reports* **29**: 1297-1304.

Patil S, Takezawa D, Poovaiah BW. 1995. Chimeric plant calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene with a neural visinin-like calcium-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4897-4901.

Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, Pérez AC, Chico JM, Bossche R Vanden, Sewell J, Gil E, et al. 2010. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**: 788-791.

Peng Y, Yang J, Li X, Zhang Y. 2021. Salicylic Acid: Biosynthesis and Signaling. *Annual Review of Plant Biology* **72**: 761-791.

Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ. 2009. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* **14**: 399-408.

Perochon A, Dieterle S, Pouzet C, Aldon D, Galaud JP, Ranty B. 2010. Interaction

of a plant pseudo-response regulator with a calmodulin-like protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **398**: 747-751.

Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C. 2003. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment* **26**: 189-199.

Peyraud R, Cottret L, Marmiesse L, Genin S. 2018. Control of primary metabolism by a virulence regulatory network promotes robustness in a plant pathogen. *Nature Communications* **9**.

Phelps RH, Sequeira L. 1967. Synthesis of Indoleacetic Acid by Cell-Free Systems from Virulent and Avirulent Strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **57**: 1182-1190.

Phukan UJ, Jeena GS, Shukla RK. 2016. WRKY transcription factors: Molecular regulation and stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1-14.

Piasecka A, Jedrzejczak-Rey N, Bednarek P. 2015. Secondary metabolites in plant innate immunity: Conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist* **206**: 948-964.

Pieterse CMJ, Van Der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**: 489-521.

Piquerez SJM, Harvey SE, Beynon JL, Ntoukakis V. 2014. Improving crop disease resistance: Lessons from research on *Arabidopsis* and tomato. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1-13.

Pruitt RN, Locci F, Wanke F, Zhang L, Saile SC, Joe A, Karelina D, Hua C, Fröhlich K, Wan W-L, et al. 2021. The EDS1-PAD4-ADR1 node mediates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity. *Nature*.

van Puyvelde S, Cloots L, Engelen K, Das F, Marchal K, Vanderleyden J, Spaepen S. 2011. Transcriptome Analysis of the Rhizosphere Bacterium

Azospirillum brasilense Reveals an Extensive Auxin Response. *Microbial Ecology* **61**: 723-728.

Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK. 2002. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 8436-8441.

Ranf S, Eschen-Lippold L, Pecher P, Lee J, Scheel D. 2011. Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant Journal* **68**: 100-113.

Ranty B, Aldon D, Cotellet V, Galaud JP, Thuleau P, Mazars C. 2016. Calcium sensors as key hubs in plant responses to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1-7.

Ranty B, Aldon D, Galaud JP. 2006. Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: Multifaceted relays to decode calcium signals. *Plant Signaling and Behavior* **1**: 96-104.

Rao SS, El-Habbak MH, Havens WM, Singh A, Zheng D, Vaughn L, Haudenschild JS, Hartman GL, Korban SS, Ghabrial SA. 2014. Overexpression of GmCaM4 in soybean enhances resistance to pathogens and tolerance to salt stress. *Molecular Plant Pathology* **15**: 145-160.

Rao RP, Hunter A, Kashpur O, Normanly J. 2010. Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in Saccharomyces cerevisiae triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. *Genetics* **185**: 211-220.

Rasmussen MW, Roux M, Petersen M, Mundy J. 2012. MAP kinase cascades in Arabidopsis innate immunity. *Frontiers in Plant Science* **3**: 1-6.

Reen FJ, Gutiérrez-Barranquero JA, Parages ML, O'Gara F. 2018. Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**: 2063-2073.

Reina-Pinto JJ, Yephremov A. 2009. Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 540-549.

Richards SL, Laohavisit A, Mortimer JC, Shabala L, Swarbreck SM, Shabala S, Davies JM. 2014. Annexin 1 regulates the H₂O₂-induced calcium signature in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Journal* **77**: 136-145.

Robert-Seilaniantz A, MacLean D, Jikumaru Y, Hill L, Yamaguchi S, Kamiya Y, Jones JDG. 2011. The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *The Plant Journal* **67**: 218-231.

Rothan C, Diouf I, Causse M. 2019. Trait discovery and editing in tomato. *Plant Journal* **97**: 73-90.

Roux KJ, Kim DI, Burke B, May DG. 2018. BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions. *Current Protocols in Protein Science* **91**: 1-15.

Le Roux C, Huet G, Jauneau A, Camborde L, Trémousaygue D, Kraut A, Zhou B, Levailant M, Adachi H, Yoshioka H, et al. 2015. A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell* **161**: 1074-1088.

Roux F, Voisin D, Badet T, Balagué C, Barlet X, Huard-Chauveau C, Roby D, Raffaele S. 2014. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: Placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology* **15**: 427-432.

Ruan J, Zhou Y, Zhou M, Yan J, Khurshid M, Weng W, Cheng J, Zhang K. 2019. Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 1-15.

Ryu CM. 2015. Against friend and foe: Type 6 effectors in plant-associated bacteria. *Journal of Microbiology* **53**: 201-208.

Sakano K. 2001. Metabolic regulation of pH in plant cells: Role of cytoplasmic pH in defense reaction and secondary metabolism. *International Review of Cytology*

206: 1-44.

Salanoubat M, Schiex T, Thébault P, Levy M, Weissenbach J, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, et al. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**: 497-502.

Salgon S, Jourda C, Sauvage C, Daunay MC, Reynaud B, Wicker E, Dintinger J. 2017. Eggplant resistance to the *Ralstonia solanacearum* species complex involves both broad-spectrum and strain-specific quantitative trait loci. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1-21.

Sánchez-Barrena MJ, Martínez-Ripoll M, Albert A. 2013. Structural biology of a major signaling network that regulates plant abiotic stress: The CBL-CIPK mediated pathway. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 5734-5749.

Sánchez-Rodríguez C, Estévez JM, Llorente F, Hernández-Blanco C, Jordá L, Pagán I, Berrocal M, Marco Y, Somerville S, Molina A. 2009. The ERECTA receptor-like kinase regulates cell wall-mediated resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 953-963.

Scholz SS, Vadassery J, Heyer M, Reichelt M, Bender KW, Snedden WA, Boland W, Mithöfer A. 2014. Mutation of the *Arabidopsis* calmodulin-like protein CML37 deregulates the jasmonate pathway and enhances susceptibility to herbivory. *Molecular Plant* **7**: 1712-1726.

Schütz A, Sandalova T, Ricagno S, Hübner G, König S, Schneider G. 2003. Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *European Journal of Biochemistry* **270**: 2312-2321.

Schweizer F, Fernández-Calvo P, Zander M, Diez-Diaz M, Fonseca S, Glauser G, Lewsey MG, Ecker JR, Solano R, Reymond P. 2013. *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell* **25**: 3117-3132.

Sijmons PC, Grundler FMW, von Mende N, Burrows PR, Wyss U. 1991.

Arabidopsis thaliana as a new model host for plant-parasitic nematodes. *The Plant Journal* **1**: 245-254.

Smirnova A, Li H, Weingart H, Aufhammer S, Burse A, Finis K, Schenk A, Ullrich MS. 2001. Thermoregulated expression of virulence factors in plant-associated bacteria. *Archives of Microbiology* **176**: 393-399.

Smith EF. 1896. A Bacterial Disease of the Tomato, Eggplant, and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.). *U.S. Department of Agriculture, Washington, DC*: 3-32.

Smolińska U, Kowalska B. 2018. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* -- a review. *Journal of Plant Pathology* **100**: 1-12.

Sneath P. 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In: Sneath PHA, ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1104-1138.

Snelders NC, Rovenich H, Petti GC, Rocafort M, van den Berg GCM, Vorholt JA, Mesters JR, Seidl MF, Nijland R, Thomma BPHJ. 2020. Microbiome manipulation by a soil-borne fungal plant pathogen using effector proteins. *Nature Plants* **6**.

Song J, Zhao Q, Thao S, Frederick RO, Markley JL. 2004. Solution structure of a calmodulin-like calcium-binding domain from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of biomolecular NMR* **30**: 451-456.

Spaepen S, Vanderleyden J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**: 1-13.

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* **31**: 425-448.

Spoel SH, Johnson JS, Dong X. 2007. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 18842-18847.

Stael S, Wurzinger B, Mair A, Mehlmer N, Vothknecht UC, Teige M. 2012. Plant organellar calcium signalling: An emerging field. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1525-1542.

Swatek KN, Wilson RS, Ahsan N, Tritz RL, Thelen JJ. 2014. Multisite phosphorylation of 14-3-3 proteins by calcium- dependent protein kinases. *Biochemical Journal*: 15-25.

The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHAJ. 2011. Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell* **23**: 4-15.

Tian W, Wang C, Gao Q, Li L, Luan S. 2020. Calcium spikes, waves and oscillations in plant development and biotic interactions. *Nature Plants* **6**: 750-759.

Tripathy BC, Oelmüller R. 2012. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior* **7**: 1621-1633.

Tsai YC, Delk NA, Chowdhury NI, Braam J. 2007. Arabidopsis potential calcium sensors regulate nitric oxide levels and the transition to flowering. *Plant Signaling and Behavior* **2**: 446-454.

Tsai YC, Koo Y, Delk NA, Gehl B, Braam J. 2012. Calmodulin-related CML24 interacts with ATG4b and affects autophagy progression in Arabidopsis. *Plant Journal* **73**: 325-335.

Tzipilevich E, Benfey P. 2021. Plant Immune System Activation is Necessary for Efficient Interaction with Auxin Secreting Beneficial Bacteria. *bioRxiv preprint*.

Ulm R, Ichimura K, Mizoguchi T, Peck SC, Zhu T, Wang X, Shinozaki K, Paszkowski J. 2002. Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1. *EMBO Journal* **21**: 6483-6493.

Vadassery J, Reichelt M, Hause B, Gershenzon J, Boland W, Mithöfer A. 2012a.

CML42-mediated calcium signaling coordinates responses to Spodoptera herbivory and abiotic stresses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **159**: 1159-1175.

Vadassery J, Scholz SS, Mithöfer A. 2012b. Multiple calmodulin-like proteins in Arabidopsis are induced by insect-derived (*Spodoptera littoralis*) oral secretion. *Plant Signaling and Behavior* **7**: 1277-1280.

Valls M, Genin S, Boucher C. 2006. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens* **2**: 0798-0807.

Vanderbeld B, Snedden WA. 2007. Developmental and stimulus-induced expression patterns of Arabidopsis calmodulin-like genes CML37, CML38 and CML39. *Plant Molecular Biology* **64**: 683-697.

Velásquez AC, Castroverde CDM, He SY. 2018. Plant-Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. *Current Biology* **28**: R619-R634.

La Verde V, Dominici P, Astegno A. 2018a. Towards understanding plant calcium signaling through calmodulin-like proteins: A biochemical and structural perspective. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 1-18.

La Verde V, Trande M, D'Onofrio M, Dominici P, Astegno A. 2018b. Binding of calcium and target peptide to calmodulin-like protein CML19, the centrin 2 of *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Biological Macromolecules* **108**: 1289-1299.

Wang G, Ellendorff U, Kemp B, Mansfield JW, Forsyth A, Mitchell K, Bastas K, Liu CM, Woods-Tör A, Zipfel C, et al. 2008. A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* **147**: 503-517.

Wang JF, Liu SS, Song ZQ, Xu TC, Liu CS, Hou YG, Huang R, Wu SH. 2020. Naturally Occurring Flavonoids and Isoflavonoids and Their Microbial Transformation: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)* **25**.

Wang Z, Ma LY, Cao J, Li YL, Ding LN, Zhu KM, Yang YH, Tan XL. 2019. Recent Advances in Mechanisms of Plant Defense to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Plant Science* **10**: 1-14.

Wang JP, Munyampundu JP, Xu YP, Cai XZ. 2015. Phylogeny of plant calcium and calmodulin-dependent protein kinases (CcaMKs) and functional analyses of tomato CCaMK in disease resistance. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1-15.

Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH, Dong X. 2007. Salicylic Acid Inhibits Pathogen Growth in Plants through Repression of the Auxin Signaling Pathway. *Current Biology* **17**: 1784-1790.

Wang DW, Peng XF, Xie H, Xu CL, Cheng DQ, Li JY, Wu WJ, Wang K. 2016. *Arabidopsis thaliana* as a suitable model host for research on interactions between plant and foliar nematodes, parasites of plant shoot. *Scientific Reports* **6**: 1-13.

Wang Y, Wang B, Gilroy S, Chehab EW, Braam J. 2011. CML24 is Involved in Root Mechanoresponses and Cortical Microtubule Orientation in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Growth Regulation* **30**: 467-479.

Webb AAR, Kuchitsu K, Kwak J, Pei ZM, Iida H. 2017. Sensors Make Sense of Signaling. *Plant and Cell Physiology* **58**: 1121-1125.

Weinl S, Kudla J. 2009. The CBL - CIPK Ca²⁺ -decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist* **184**: 517-528.

Wen X, Zhang C, Ji Y, Zhao Q, He W, An F, Jiang L, Guo H. 2012. Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Research* **22**: 1613-1616.

Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse JM, Barbier-Brygoo H, Pugin A. 2002. Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* **14**: 1937-1951.

White PJ, Broadley MR. 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* **92**: 487-511.

Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562-571.

Won SK, Lee YJ, Lee HY, Heo YK, Cho M, Cho HT. 2009. cis-element- and transcriptome-based screening of root hair-specific genes and their functional characterization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **150**: 1459-1473.

Woodward AW, Bartel B. 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**: 707-735.

Wu Q, Huang L, Su N, Shabala L, Wang H, Huang X, Wen R, Yu M, Cui J, Shabala S. 2020. Calcium-dependent hydrogen peroxide mediates hydrogen-rich water-reduced cadmium uptake in plant roots. *Plant Physiology* **183**: 1331-1344.

Xu B, Cheval C, Laohavisit A, Hocking B, Chiasson D, Olsson TSG, Shirasu K, Faulkner C, Gilliam M. 2017. A calmodulin-like protein regulates plasmodesmal closure during bacterial immune responses. *New Phytologist* **215**: 77-84.

Yamaguchi T, Aharon GS, Sottosanto JB, Blumwald E. 2005. Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca²⁺- and pH-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**: 16107-16112.

Yang J, Duan G, Li C, Liu L, Han G, Zhang Y, Wang C. 2019. The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science* **10**: 1-12.

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

Yoo JH, Park CY, Kim JC, Heo W Do, Cheong MS, Park HC, Kim MC, Moon BC, Choi MS, Kang YH, et al. 2005. Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of*

Biological Chemistry **280**: 3697–3706.

Young ND. 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* **34**: 479–501.

Yu TY, Shi DQ, Jia PF, Tang J, Li HJ, Liu J, Yang WC. 2016. The Arabidopsis Receptor Kinase ZAR1 Is Required for Zygote Asymmetric Division and Its Daughter Cell Fate. *PLoS Genetics* **12**: 1–23.

Yu MH, Zhao ZZ, He JX. 2018. Brassinosteroid signaling in plant–microbe interactions. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 1–15.

Zhang P, Jin T, Sahu SK, Xu J, Shi Q, Liu H, Wang Y. 2019. The distribution of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid synthesis pathways in bacteria unraveled by large-scale genomic analysis. *Molecules* **24**: 1–14.

Zhang Y, Li X. 2019. Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **50**: 29–36.

Zhang R, Wang B, Ouyang J, Li J, Wang Y. 2008. Arabidopsis indole synthase, a homolog of tryptophan synthase alpha, is an enzyme involved in the Trp-independent indole-containing metabolite biosynthesis. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 1070–1077.

Zhang L, Xu J, Xu J, Zhang H, He L, Feng J. 2014. TssB is essential for virulence and required for Type VI secretion system in *Ralstonia solanacearum*. *Microbial Pathogenesis* **74**: 1–7.

Zhang K, Yue D, Wei W, Hu Y, Feng J, Zou Z. 2016. Characterization and functional analysis of calmodulin and calmodulin-like genes in *Fragaria vesca*. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–17.

Zhao Y. 2018. Essential Roles of Local Auxin Biosynthesis in Plant Development and in Adaptation to Environmental Changes. *Annual Review of Plant Biology* **69**: 417–435.

Zhu JK. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 441-445.

Zhu X. 2016. Contribution de CML8 et CML11, deux calmodulin-like protéines d'Arabidopsis, au cours du développement des plantes et en réponses à des stress biotiques.

Zhu X, Dunand C, Snedden W, Galaud JP. 2015. CaM and CML emergence in the green lineage. *Trends in Plant Science* **20**: 483-489.

Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJJ, Farrand SK, Winans SC. 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. *Journal of Bacteriology* **182**: 3885-3895.

Zhu Y, Qian W, Hua J. 2010. Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins. *PLoS Pathogens* **6**: 1-12.

Zhu X, Robe E, Jomat L, Aldon D, Mazars C, Galaud JP. 2017. CML8, an arabidopsis calmodulin-like protein, plays a role in pseudomonas syringae plant immunity. *Plant and Cell Physiology* **58**: 307-319.

Zielinski RE. 2002. Characterization of three new members of the Arabidopsis thaliana calmodulin gene family: Conserved and highly diverged members of the gene family functionally complement a yeast calmodulin null. *Planta* **214**: 446-455.

Zimmermann S, Nürnberger T, Frachisse JM, Wirtz W, Guern J, Hedrich R, Scheel D. 1997. Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 2751-2755.

Abstract

Calcium is a universal second messenger involved in the adaptation of plants to environmental changes. Variations in calcium concentration in the plant cell are decoded and relayed by calcium sensor proteins. Among these proteins, we find the CMLs or "Calmodulin-Like" proteins. During my thesis, we identified that CML8 participates in the immune responses of the plant to multiple pathogenic microorganisms including the soil bacterium *Ralstonia solanacearum* capable of infecting more than 200 species of plants (*Arabidopsis thaliana*, tomato, banana), the leaf bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and the root oomycete *Phytophthora capsici*. The objective of my thesis project was to clarify the function of CML8 in order to understand its role in plant immunity, and more precisely in the defense response of the plant *Arabidopsis thaliana* to *Ralstonia solanacearum*. To achieve this purpose, a transcriptomic approach by RNA-sequencing allowed to identify the molecular mechanisms dependent on CML8 in response to an infection by *Ralstonia solanacearum*. Also, CML8 is preferentially expressed at the level of lateral root emergences and controls the root architecture in an auxin-dependent manner. These emergences are the site of accumulation of endogenous auxin in the plant but also the point of entries of *Ralstonia solanacearum* into the plant. Knowing this and also knowing that the sequencing of *Ralstonia solanacearum*'s genome has shown that it was possible that this bacterium could synthesize auxin, we chose to study the infection processes of *Ralstonia solanacearum* by seeking to identify the putative auxin biosynthetic pathway(s) in *Ralstonia solanacearum* in order to determine the role of auxin produced by the bacterium during the interaction with the plant.

Résumé

Le calcium est un second messager universel impliqué dans l'adaptation des plantes aux changements de l'environnement. Les variations de concentration de calcium dans la cellule végétale sont décodées et relayées par des protéines senseurs de calcium. Parmi ces protéines, on retrouve les CMLs ou protéines « Calmoduline-Like ». Au cours de ma thèse, nous avons identifié que CML8 participe aux réponses immunitaires de la plante face à de multiples microorganismes pathogènes dont la bactérie du sol *Ralstonia solanacearum* capable d'infecter plus de 200 espèces de plantes (*Arabidopsis thaliana*, tomate, banane), la bactérie foliaire *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et l'oomycète racinaire *Phytophthora capsici*. Mon projet de thèse a eu pour objectif de préciser la fonction de CML8 pour comprendre son rôle dans l'immunité végétale, et plus précisément dans la réponse de défense de la plante *Arabidopsis thaliana* à *Ralstonia solanacearum*. Pour cela, une approche de transcriptomique par RNA-sequencing a permis d'identifier les mécanismes moléculaires dépendants de CML8 en réponse à une infection par *Ralstonia solanacearum*. Egalement, CML8 est exprimé préférentiellement au niveau de l'émergence des racines latérales et contrôle l'architecture racinaire de manière auxine-dépendante. Ces émergences sont le lieu d'accumulation de l'auxine endogène de la plante mais également le point d'entrée de *Ralstonia solanacearum* dans la plante. Sachant cela et sachant aussi que le séquençage du génome de *Ralstonia solanacearum* a montré qu'il était possible que cette bactérie puisse synthétiser de l'auxine, nous avons choisi d'étudier les processus d'infection de *Ralstonia solanacearum* en cherchant à identifier la ou les voies de biosynthèse putatives de l'auxine chez *Ralstonia solanacearum* pour déterminer le rôle de l'auxine produite par la bactérie au cours de l'interaction avec la plante.