



HAL
open science

Analyse génétique et moléculaire de l'immunité des hydathodes et du système vasculaire des Brassicacées

Caroline Bellenot

► **To cite this version:**

Caroline Bellenot. Analyse génétique et moléculaire de l'immunité des hydathodes et du système vasculaire des Brassicacées. Biologie végétale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30110 . tel-03828541

HAL Id: tel-03828541

<https://theses.hal.science/tel-03828541>

Submitted on 25 Oct 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
Caroline BELLENOT

Le 1 juillet 2022

**Analyse génétique et moléculaire de l'immunité des hydathodes
et du système vasculaire des Brassicacées**

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

Spécialité : **Developpement des plantes, interactions biotiques et abiotiques**

Unité de recherche :

LIPME - Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes-Environnement

Thèse dirigée par

Laurent D. NOEL et Jean-Marc ROUTABOUL

Jury

Mme Claire VENEULT-FOURREY, Rapporteure

Mme Rozenn LE HIR, Rapporteure

M. Christophe MAUREL, Examineur

M. Laurent D. NOËL, Co-directeur de thèse

M. Jean-Marc ROUTABOUL, Co-directeur de thèse

M. Jean-Philippe GALAUD, Président

Résumé

Les hydathodes sont décrits pour la première fois à la fin du XIXe siècle, par le botaniste chirurgien microbiologiste Prussien Anton de Bary. Depuis, ces organes, pourtant présents sur les feuilles de la majorité des plantes vasculaires, ne sont étudiés que sporadiquement par la communauté scientifique. Sites de la guttation, les hydathodes se retrouvent à la pointe de la dentelure des feuilles. Constitués de pores dans l'épiderme et d'un parenchyme distinctif lié au système vasculaire, les hydathodes font le lien direct entre le milieu extérieur et les vaisseaux du xylème des feuilles. De façon surprenante, cette voie d'entrée dans les tissus végétaux n'est utilisée que par une poignée d'agents pathogènes. Parmi eux, *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* (*Xcc*) est l'agent responsable de la nervation noire de Brassicacées. Cette bactérie constitue une menace pour l'agriculture, puisqu'elle est capable d'infecter de nombreuses espèces cultivées, telles que les choux et choux-fleurs, le navet, la moutarde, le radis, etc. Si les facteurs de virulence de *Xcc* sont bien connus, peu d'études se sont attelées à décrypter le rôle des hydathodes dans l'immunité des plantes, alors qu'ils sont le premier lieu de contact entre *Xcc* et la plante.

Au cours de ce projet de thèse, j'ai étudié les spécificités transcriptomiques des hydathodes par rapport au mésophylle et les particularités du métabolome du fluide de guttation en comparaison de celui de la sève brute. J'ai ensuite établi les premières bases génétiques de l'immunité post-invasive des hydathodes de chou-fleur (cultivar Clovis) en comparant leur réponse à une souche virulente et avirulente de *Xcc*, durant les étapes précoces de l'infection. Dans la deuxième partie du projet, j'ai mis en place un système permettant de cribler un grand nombre de mutants d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à *Xcc*, qui sera utilisé au sein de l'équipe. Grâce à cette nouvelle méthode, j'ai entamé le criblage d'une collection de mutant d'*A. thaliana* et identifié plus d'une cinquantaine de lignées dont la sensibilité à *Xcc* est altérée. Pour finir, dans la troisième partie réalisée dans le cadre d'une collaboration, j'ai exploré le lien entre le nombre d'hydathodes, l'état hydrique des tissus et le comportement infectieux de *Xcc*.

Ce projet apporte des données originales et des outils qui permettront de mieux comprendre le fonctionnement des hydathodes en tant qu'organes ainsi que leur rôle au cours des interactions plantes-pathogènes.

Abstract

Hydathodes were first characterized at the end of the XIXth century by Anton de Bary, a Prussian botanist, surgeon and microbiologist. Since, these organs are studied sporadically, even if they are present on leaves of most vascular plants. Localized at the leaf serration tips, hydathodes are the sites of guttation. They are composed of pores in the epidermis and of a peculiar parenchyma connected to the vasculature. Hydathodes are thus a link between leaf xylem vessels and the outside world. Surprisingly, only a handful of pathogens can penetrate the plant this way. *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* (*Xcc*), causal agent of black rot of *Brassica* is one of them. *Xcc* represent a threat to agriculture, because it can infect many *Brassica* crops, such as cabbage, cauliflower, turnip, mustard or radish. *Xcc* virulence factors are well studied, but not much is known about plant immunity inside hydathodes, even if they are the first contact point between *Xcc* and the plant.

During this PhD project, I studied hydathode transcriptomic and guttation fluid metabolomics characteristics. I also established the genetic bases of cauliflower hydathode post-invasive immunity, by comparing hydathodes responses to an *Xcc* virulent or avirulent strain, during the early stages of infection. In the second part of the project, I set up a method to screen immune defect in many *Arabidopsis thaliana* mutants in response to *Xcc* infection. This method will be a future asset for my host team. I also used it to start the screen of a collection of *A. thaliana* mutants. I identified more than fifty lines with a modified susceptibility to *Xcc*. Last, I delved into the link between number of hydathodes, water status of tissues and *Xcc* infectious strategy.

This work brings original results and a protocol that will help us to better understand hydathodes biology as plant organs as well as their role during plant-pathogen interactions.

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mes directeurs de thèse, Laurent et Jean-Marc. Vous m'avez fait confiance pour ce projet et c'était très important pour moi. Merci de m'avoir conseillée et guidée tout au long de ce projet et durant les moments difficiles. Je suis arrivée en stage timide et peu sûre de moi, et j'en ressors quatre ans plus tard un peu moins timide et un peu plus sûre de moi ! Avec vous j'ai appris la rigueur indispensable pour devenir une scientifique compétente. Merci aux membres de mon comité de thèse, Richard Berthomé et Boris Szurek, pour leurs conseils avisés et leur aide.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe SIX pour la bonne ambiance et l'entraide, et beaucoup trop de chocolats. Matthieu, tu as été comme cet oncle aux dîners de familles qui fait des blagues inappropriées mais qui est tout de même indispensable, toujours prêt à nous faire le café ou nous éclairer de ta science. Les filles, sans vous l'équipe serait bien différente et je vous remercie toutes pour votre bienveillance quand ça n'allait pas. Merci Manue pour toujours répondre à toutes mes questions de paillasse et tes blagues discrètement décapantes. Carine, ton titre de Don Corleone se suffit à lui-même je crois, mais merci pour les fringues et vive le bricolage. Merci à ma voisine de paillasse et de bureau, Corinne, pour toutes ces discussions, ton rire explosif et ta compassion. Alice, quand je serais grande je veux être comme toi ! Merci pour les fou-rires et tout le reste. Manuel, Julien, Noe, vous avez été des super modèles pour moi, bûcheurs et déterminés à faire des thèses excellentes. Merci pour les conversations scientifiques et existentielles, merci pour votre sympathie, votre dérision et votre calme. Thomas, merci pour le choc culturel ébouriffant. Brice, le petit dernier, cette moustache et ce rire prodigieux ! Pierre et Antoine, vous faites partie de l'équipe sauf sur le papier, merci d'être aussi sympas.

Merci aussi à tous les SIX qui sont partis avant moi ou qui étaient de passage. Un grand merci à Ivanna, c'était un plaisir d'être ta stagiaire, et ton soutien m'a beaucoup apporté quand je suis arrivée toute seule et toute perdue dans une nouvelle ville et un nouveau laboratoire. Merci David pour ton énergie communicative et tes adages inoubliables. Sabine, Laurie, Célia et Célia, merci pour les coups de mains, sans vous mes expériences auraient été bien plus difficiles à faire. Merci pour les discussions et les rigolades, et vos encouragements, vous être trop cools et j'aurai aimé que vous soyez là plus longtemps.

Je tiens à remercier tout le LIPME, en particulier les services communs de la serre, la laverie et l'administration, qui rendent la vie au labo beaucoup plus simple. Merci à tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin, à l'AJS et tous les autres, qui ont fait de ce laboratoire un environnement de travail agréable.

Merci à mon équipage adoré de Boulets spéciaux, avec qui j'ai sillonné les mers de Cannelé en Bretzel quand j'avais besoin de m'échapper. Merci les copinoux pour vos mots doux malgré la distance et les burgers à papa. Merci à ma famille, vous être trop forts !

Enfin, je tiens à remercier les membres du jury Claire Veneault-Fourrey, Rozenn Le Hir, Christophe Maurel et Jean-Philippe Galaud d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse présenté lors de ma soutenance et dans ce manuscrit.

Table des matières

Résumé	1
Abstract	2
Remerciements	3
Table des matières	5
Liste des Figures	9
Liste des Tableaux	11
Liste des Annexes	12
Listes des Abréviations	13
Chapitre 1 : Introduction à l'immunité des plantes	15
Partie 1. Les premières interactions plantes-agents pathogènes	16
Partie 2. Les interactions plantes-agents pathogènes	19
2. 1. Concepts et définitions des interactions hôtes et non hôtes	19
2. 2. Le système immunitaire des plantes	21
2. 2. 1. Les défenses constitutives	23
2. 2. 1. a) Les défenses physiques	23
2. 2. 1. b) Les défenses chimiques	25
2. 2. 2. Les défenses induites	27
2. 2. 2. a) Se rendre compte de la présence des agresseurs : les mécanismes de perception	27
2. 2. 2. b) Se rendre compte de la présence des agresseurs : les récepteurs de l'immunité	29
2. 2. 2. c) Propager l'alerte par des cascades de signalisation	33
i. Le premier signal de l'immunité : le signal calcique	33
ii. Double rôle des ROS : signaux de l'immunité et action antimicrobienne	33
iii. Transduction du signal calcique par les MAPK	35
iv. Modulation de la signalisation hormonale	35
2. 2. 2. d) Réagir à la présence hostile en mettant en place de nouvelles défenses	37
i. Renforcement des défenses physique	37

ii. Production de composés toxiques pour les agents pathogènes.....	39
2. 2. 2. e) SAR : Propager l'information au-delà du site d'infection pour se mettre en alerte	39
Partie 3. Le rôle central de l'eau dans les interactions plantes-pathogènes	41
3. 1. Les aquaporines sont impliquées dans l'immunité des plantes	41
3. 2. L'accès à l'eau est un facteur majeur des maladies microbiennes des plantes	42
3. 3. Différents effecteurs induisent l'apparition de lésions aqueuses	45
Partie 4. <i>Xcc/Brassica</i> : Un pathosystème d'importance agronomique et académique	47
4. 1. Les hôtes : Brassica	47
4. 2. Découverte de la maladie de la nervation noire	49
4. 3. L'organisme pathogène : <i>Xcc</i>	49
4. 4. Méthodes de lutte contre la nervation noire	51
Partie 5. Les hydathodes	53
5. 1. Hydathodes (Quick Guide).....	53
Contexte	53
5. 2. Petite histoire des hydathodes	57
5. 2. 1. De l'importance de la terminologie	57
5. 2. 2. Ce que l'on sait de la formation des hydathodes	59
5. 2. 3. Rôle et composition de la guttation	61
5. 2. 4. Ce que l'on sait de l'immunité des hydathodes	62
Chapitre 2 : Projet de thèse	65
Chapitre 3 : Résultats	69
Partie 1 : Les signatures transcriptomiques des hydathodes mettent en évidence leurs caractéristiques physiologiques et immunitaires.....	71
1.1. Transcriptome des hydathodes de chou-fleur et d' <i>Arabidopsis thaliana</i> comparé au transcriptome du mésophylle.....	71
Contexte.....	71
Contribution.....	71
1. 2. Transcriptome des hydathodes de chou-fleur en réponse à l'infection par <i>Xcc</i> ..	72
Contexte.....	72
Contribution.....	72
Discussion.....	98

1. 3. Les hydathodes jouent un rôle important dans la capture des solutés du fluide de guttation.....	100
Contexte.....	101
Composition de la guttation chez le chou-fleur.....	101
Discussion.....	105
Partie 2 : Identification de gènes impliqués dans l'immunité des hydathodes et du système vasculaire d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	108
2. 1. Contexte	109
2. 2. Les lignées HEM : outils pour un criblage à moyen débit.....	109
2. 3. Développement et optimisation de la méthode de criblage	111
2. 3. 1. La notation des symptômes et la coloration GUS ne sont pas adaptées au phénotypage	113
2. 3. 2. Vaporisation et dénombrement bactérien in planta : pour une infection homogène d'un grand nombre d' <i>Arabidopsis</i> et un phénotypage quantitatif.....	117
2. 3. 3. Dénombrer les bactéries pour phénotyper quantitativement la maladie....	121
2. 4. Le crible de 358 des lignées HEM révèle que 63 d'entre elles ont un phénotype mutant lors de l'infection par un <i>Xcc</i> virulent	123
2. 5. Chez les lignées HEM, il n'y a pas de corrélation entre multiplication bactérienne et nombre d'hydathodes.....	126
2. 6. Discussion	130
Partie 3 : L'étude de mutants possédant moins d'hydathodes révèle l'importance de l'humidité pour la multiplication de <i>Xcc</i> dans la feuille	132
3. 1. Contexte	133
3. 2. Le triple phénotype des mutants <i>cuc2</i>	133
3. 2. 1. CUC2 régule le nombre d'hydathodes	133
3. 2. 2. Contre intuitivement, les mutants <i>cuc2-1</i> sont plus sensibles à <i>Xcc</i>	135
3. 2. 3. Les mutants <i>cuc2-1</i> développent des lésions aqueuses en condition de guttation	135
3. 2. 4. Discussion.....	139
3. 3. Validation du lien entre lésions aqueuses et niveau d'infection	143
3. 3. 1. Reproduction des lésions aqueuses sur <i>A. thaliana</i>	143
3. 3. 2. Test préliminaire de l'effet des lésions aqueuses l'infection du chou-fleur par <i>Xcc</i>	144
3. 3. 3. Discussion.....	145

3. 4. Les mutations <i>cuc2</i> n'ont pas effet sur la croissance de <i>Xcc</i> au stade post-invasif	146
3. 5. L'ouverture des stomates n'affecte pas la croissance de <i>Xcc in planta</i>	147
Chapitre 4 : Discussion générale	151
Conclusions	153
Perspectives	155
Poursuivre l'étude de l'immunité post-invasive des hydathodes	155
Etudier l'impact de l'humidité sur le comportement infectieux de <i>Xcc</i>	156
Chapitre 5 : Matériels et méthodes	159
1. Matériel biologique & conditions de culture :	161
1. 1. Matériel végétal	161
1. 2. Souches de bactéries et milieux de culture.	161
2. Méthodes d'inoculation et de phénotypage	161
2. 1. Inoculations par trempage et infiltration	161
2. 3. Scellage des hydathodes	162
2. 4. Coloration GUS	162
2. 5. Protocole de criblage des lignées HEM	163
2. 5. 1. Culture et préparation des plantes	163
2. 5. 2. Inoculation par aspersion	163
2. 5. 3. Croissance <i>in planta</i> de <i>Xcc</i>	163
2. 5. 4. Test statistique	164
Références	165
ANNEXES	185
Annexe I. Hydathodes are important organs for auxin metabolism and nutrient recycling	187
Annexe II. Transcriptomic and immunofluorescence analysis of cauliflower hydathodes	213
Annexe III. Liste des lignées HEM phénotypées en triplicat (358 sur 884)	253
Annexe IV. Genome announcement	265

Liste des Figures

Chapitre 1 : Introduction à l'immunité des plantes

Figure 1.1. Exemples d'altération causées par des champignons et des bactéries sur des tissus foliaire d'angiospermes datant de la fin du Crétacé inférieur (fin de l'Albien, -100 Millions d'années)

Figure 1.2. Interactions compatibles et incompatibles entre plantes et agents pathogènes

Figure 1.3. Illustration de la diversité des épines des végétaux

Figure 1.4. Défenses constitutives physiques des plantes

Figure 1.5. Les défenses des plantes sont induites par la perception de la présence des agents pathogènes

Figure 1.6. Exemples de perception de PAMPs par oligomérisation de PRRs

Figure 1.7. L'effecteur AvrAC est un facteur de virulence ou d'avirulence

Figure 1.8. Signalisation lors de l'induction des réponses immunitaires

Figure 1.9. La défense pré-invasive stomatique et son inhibition par des bactéries pathogènes

Figure 1.10. La résistance systémique acquise (SAR)

Figure 1.11. Illustration des lésions aqueuses et des mécanismes microbiens qui les provoquent

Figure 1.12. Origine des centres de diversité des six espèces majeures de *Brassica* cultivées

Figure 1.13. Quantité et surfaces cultivées de choux-fleurs en France, par région en 2018

Figure 1.14. Cycle infectieux de *Xcc* sur *Brassica oleracea*

Figure 1.15. Illustration des symptômes provoqués par *Xcc* sur différentes Brassicacées

Figure 1.16. Anatomie des hydathodes d'*Arabidopsis thaliana*

Figure 1.17. Régulation de la formation de l'indentation des feuilles par CUC2, l'auxine et PIN1 chez *Arabidopsis thaliana*

Figure 1.18. Localisation de l'expression de différents transporteurs dans les hydathodes d'*Arabidopsis thaliana* par fusion des promoteurs avec le reporteur *GUS*

Chapitre 3 : Résultats

Figure 3.1. Les hydathodes du chou-fleur réabsorbent une partie des métabolites de la sève du xylème

Figure 3.2. Le transporteur de phosphate PHT1;4, spécifique des hydathodes, n'impacte pas la croissance de *Xcc* chez *A. thaliana*

Figure 3.3. Schéma explicatif des deux méthodes de génération des lignées HEM (Homozygous EMS Mutants)

Figure 3.4. Echelle de notation des symptômes d'*Arabidopsis thaliana* provoqués par *Xcc* lors d'une infection par les hydathodes

Figure 3.5. L'annotation des symptômes permet de distinguer des phénotypes de résistance et de sensibilité chez *Arabidopsis thaliana*, mais la variabilité est très forte

Figure 3.6. L'annotation des symptômes ne permet pas de distinguer des différences de sensibilité à *Xcc* des accessions Col-0 et Oy-0

Figure 3.7. Taux d'infection des hydathodes d'*Arabidopsis thaliana* par *Xcc* lors d'une inoculation par trempage

Figure 3.8. Forte variabilité de taille de population de *Xcc* entre feuilles et entre les hydathodes d'une même feuille d'*A. thaliana*

Figure 3.9. Effet du sol sur la croissance d'*Arabidopsis thaliana*

Figure 3.10. Plateau de 104 lignées HEM semées sur des pastilles Jiffy-7®

Figure 3.11. Effet de l'âge des plantes d'*Arabidopsis thaliana* sur le taux d'infection et le nombre d'hydathodes par feuille

Figure 3.12. Effet de la stérilisation de surface sur la population de bactéries dans les tissus d'*Arabidopsis*, après inoculation par pulvérisation

Figure 3.13. Population de *Xcc* dans les 358 lignées HEM testées

Figure 3.14. Le phénotypage de la collection de mutant HEM a permis de détecter 63 lignées HEM présentant une modification de leur sensibilité à *Xcc*

Figure 3.15. Lignées HEM possédant un nombre d'hydathodes différent de Col-0

Figure 3.16. Observation de la serration et dénombrement des hydathodes des mutants d'*Arabidopsis thaliana* de *CUC2* et *DRN-DRNL*

Figure 3.17. Le nombre d'hydathodes n'est pas corrélé au niveau d'infection

Figure 3.18. Localisation histochimique du rapporteur GUS porté par *Xcc ΔxopAC::GUS-GFP* dans des mutants d'*Arabidopsis thaliana* au nombre d'hydathodes différent de Col-0

Figure 3.19. Illustration du rôle des hydathodes dans la protection des tissus contre les lésions aqueuses

Figure 3.20. Effet du scellage des hydathodes avec divers matériaux

Figure 3.21. L'absence de guttation modifie la multiplication de *Xcc in planta*

Figure 3.22. Le blocage de la guttation est corrélé à des symptômes accrus chez le chou-fleur Clovis infecté par *Xcc* 8004 (Données préliminaires)

Figure 3.23. Les mutations *cuc2* et *drn-drnl1* ne semblent pas avoir d'effet sur la multiplication de *Xcc* dans le mésophylle d'*A. thaliana*

Figure 3.24. La modification de l'ouverture des stomates ne semble pas affecter pas la croissance de *Xcc in planta*

Liste des Tableaux

Chapitre 1 : Introduction à l'immunité des plantes

Tableau 1.1. Les *Brassica* cultivées et leurs principales maladies

Chapitre 3 : Résultats

Tableau 3.1. Composition du fluide de guttation, de pré-guttation et de la sève du xylème du chou-fleur, déterminée par GC-MS

Tableau 3.2. Nombre de mutations détectées dans les lignées HEM (Homozygous EMS Mutants) séquencées et dans les sous-ensembles SSD (Single Seed Descents) et DH (Doubled Haploid)

Table 3.3. Répartition des lignées HEM criblées, selon leur phénotype de multiplication de *Xcc* et leur nombre d'hydathodes par rapport à Col-0

Tableau 3.4. Le blocage de la guttation est corrélé à des symptômes accrus chez le chou-fleur Clovis infecté par *Xcc* 8004 (Données préliminaires)

Chapitre 5 : Matériels et méthodes

Tableau 5.1 : Liste des espèces et lignées végétales utilisées durant ces travaux

Tableau 5.2 : Liste des souches de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* utilisées durant ces travaux

Liste des Annexes

Annexe I. Hydathodes are important organs for auxin metabolism and nutrient recycling

Annexe II. Transcriptomic and immunofluorescence analysis of cauliflower hydathodes

Annexe III. Liste des lignées HEM phénotypées en triplicat (358 sur 884)

Annexe IV. Genome sequences of 17 strains from 8 races of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Liste des Abréviations

Avr : Avirulence
CDPK : Ca²⁺-dependent protein kinase
CFU : Colonie formant unité
Col-0 : Columbia 0
cv : Cultivar
DAMP : Damage-associated molecular pattern
DH : Doubled haploid
dpi : days post-inoculation
DSF (Diffusible Signal Factor
EMS : méthanesulfonate d'éthyle
ET : Ethylène
ETI : Effector-Triggered Immunity
ETS : Effector-triggered susceptibility
GUS : β -glucuronidase
HEM : Homozygous EMS mutant
HR : Réaction hypersensible
JA : Acide jasmonique
LRR : Leucine-rich repeat
MAP : Mitogen-activated protein
NLR : NOD-like receptor
Oy-0 : Oyestes
PAMP : Pathogen-associated molecular pattern
PR : Pathogenesis related
PRR : Pattern recognition receptor
Pst : *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato*
PTI : PAMP-triggered immunity
pv : Pathovar
R: Resistance
RLCK : Receptor-like cytoplasmic kinase
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
SA : Acide salicylique
SAR : Résistance systémique acquise
SSD : Single seed descents
SWEET : Sugar Will Eventually Be Exported
TALE : Transcription activator-like effector
var : Variété
Ws : Wassilewskija
Xcc : *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*

Chapitre 1 : Introduction à l'immunité des plantes

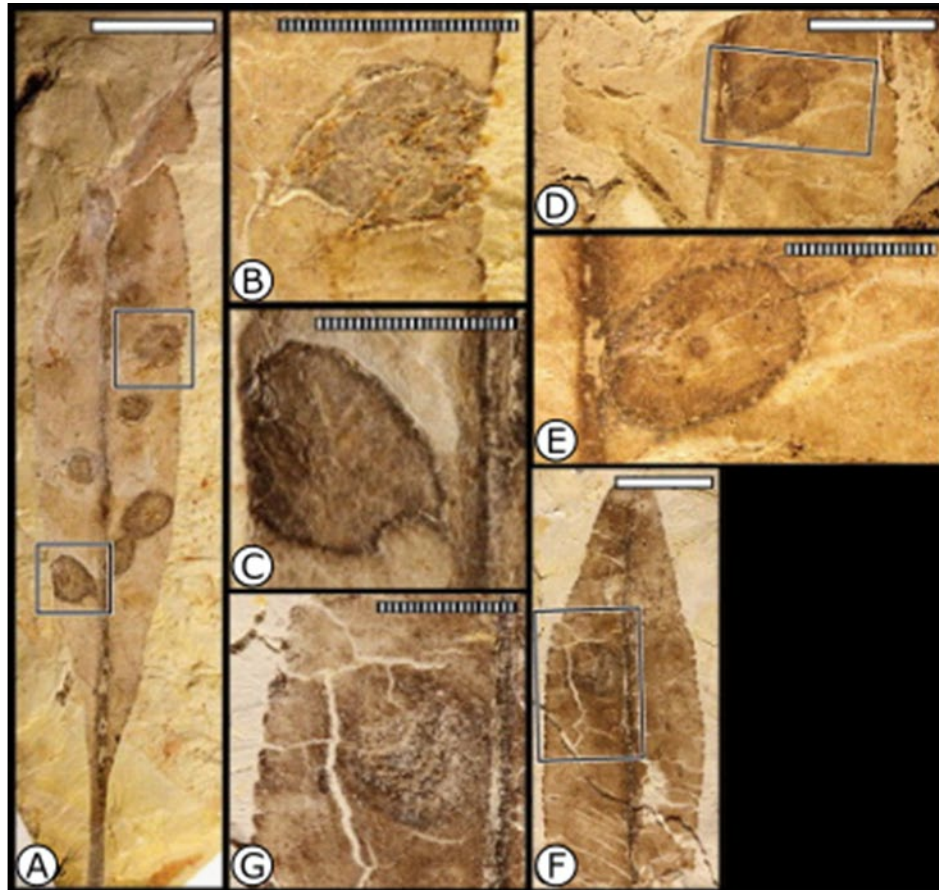


Figure 1.1. Exemples d'altération causées par des champignons et des bactéries sur des tissus foliaire d'angiospermes datant de la fin du Crétacé inférieur (fin de l'Albien, -100 Millions d'années). (A) Dommages fongiques de forme ovoïde, avec des bordures proéminentes et des expansions le long des nervures secondaires. (B) et (C) détails de (A), carrés supérieur et inférieur respectivement. (D) Nécrose fongique de forme élliptique, avec une petite fructification centrale. (E) Agrandissement de (D). (F) Symptômes d'origine probablement bactérienne, avec des cernes imbriquées entre-elles, représentant les fronts d'avancées successives de l'agent pathogène. (G) Agrandissement de (F). Tous les spécimens proviennent de *Crassidenticulum decurrens* (Lesquereux) Upchurch and Dilcher (1990) de l'ordre des Laurales, découvert dans du grès du Dakota au Kansas, États-Unis. Ils font partie de la collection du Muséum d'histoire naturelle de Floride, Gainesville, Floride, États-Unis. Échelles: barres blanches = 1cm, barres striées = 1mm. Adapté de Labandeira et Prevec, 2014.

Partie 1. Les premières interactions plantes-agents pathogènes

Les plantes sont constamment exposées à des microorganismes présents dans leur environnement, que ce soit le sol, l'air ou l'eau. Lors de l'apparition des plantes il y a 1,6 milliards d'années, les bactéries étaient déjà présentes depuis 400 millions d'années. L'ancêtre commun des *Archaeplastida* (les premières plantes) est apparu suite à l'endosymbiose d'un procaryote semblable à une cyanobactérie par un eucaryote hétérotrophe (Han, 2019). Selon l'une des hypothèses sur l'apparition des plantes terrestres, il y a 400 à 500 millions d'années, leur terrestrialisation aurait été facilitée par des champignons mycorhiziens. (Lutzoni et al., 2018). Les preuves fossiles d'association entre les plantes et des microorganismes sont rares, d'autant plus qu'il est difficile de différencier les symptômes de stress abiotique et biotiques, mais il est possible d'en dater de la fin du Crétacé inférieur (Albien, -100 millions d'années, **Figure 1.1**, Labandeira and Prevec, 2014). Tout ceci suggère que les plantes ont établi différents types d'interactions, bénéfiques ou non, avec les microorganismes depuis leur émergence. Si les deux partenaires tirent un avantage de l'interaction, comme avec les bactéries fixatrices d'azotes qui échangent des nutriments avec leur plante hôte en échange de sources de carbone, l'interaction est mutualiste. Lorsqu'un seul des partenaires bénéficie de l'interaction, sans pour autant causer de dommages à l'autre, la relation est commensale. Le parasitisme se fait au détriment d'un des partenaires, dont les ressources sont utilisées par l'autre. C'est le cas des interactions entre les plantes et les microorganismes phytopathogènes. Durant leur évolution, les plantes ont été façonnées par toutes ces interactions. En particulier, leur capacité à détecter les menaces biotiques et mettre en place des réactions de défense leur a permis de survivre et d'être présentes dans une multitude d'environnements (Chisholm et al., 2006). De ce fait, dans ce travail, l'attention se portera sur les interactions entre les plantes et leurs agents pathogènes.

Dans la nature, l'apparition de symptômes de maladie visibles est simplement une issue extrême d'une interaction pathogène entre une plante et un microorganisme pathogène (Bulgarelli et al., 2013). En revanche, dans le contexte de l'agriculture, les microorganismes ont un potentiel autrement néfaste. Depuis les débuts de l'agriculture il y a plus de 10 000 ans, les agriculteurs font face à une multitude d'organismes nuisibles : les animaux ravageurs, les microorganismes pathogènes et les plantes adventices, qui entrent en compétition avec les cultures pour les ressources (l'espace, la lumière, les nutriments, l'eau). En plus des stress abiotiques, tels que le manque d'eau, les chaleurs extrêmes et l'accès aux nutriments, ces facteurs biotiques peuvent avoir un impact substantiel sur le rendement et la qualité des cultures

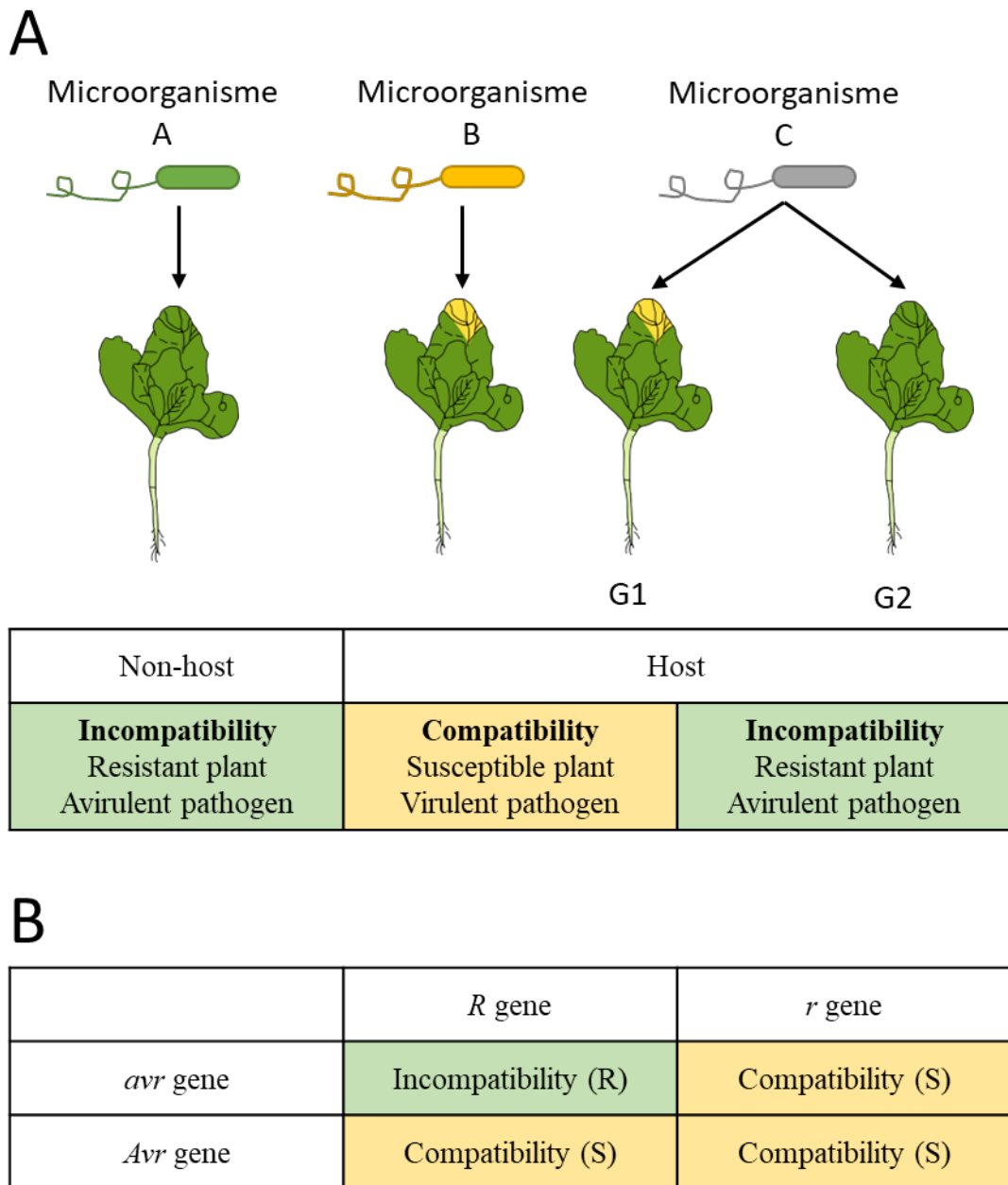


Figure 1.2. Interactions compatibles et incompatibles entre plantes et agents pathogènes. (A) Dans le cadre de la résistance non hôte, l'agent pathogène A ne provoque pas de maladie sur la plante. L'interaction est donc incompatible : la plante est résistante et l'agent pathogène est avirulent. La relation entre l'agent pathogène B et sa plante hôte est compatible : l'agent pathogène B est virulent et la plante est sensible, il y a une maladie. L'agent pathogène C provoque des symptômes de maladie sur la plante de génotype 1 (G1), mais pas sur la plante de génotype 2 (G2). La compatibilité de l'interaction dépend donc du génotype de la plante. Ainsi l'agent pathogène C est virulent sur la plante sensible G1 et avirulent sur la plante résistance G2, qui met en place une résistance hôte. (B) Dans le modèle gène pour gène de la résistance hôte, lorsque la plante possède le gène de résistance (*R*) et que l'agent pathogène possède le gène d'avirulence (*avr*) correspondant, l'hôte est résistant et l'agent pathogène est avirulent et l'interaction est incompatible. Quand l'un et/ou l'autre des deux partenaires ne possède pas le gène *R* ou *avr*, il n'y a pas de résistance et l'interaction est compatible, l'agent pathogène peut provoquer la maladie. Adapté de la thèse de Manuel González Fuente, UPS, Toulouse, 2020.

(Popp and Hantos, 2011). Selon Oerke et Savary et collègues (Oerke, 2006; Savary et al., 2019), la perte de production mondiale pour l'agriculture, causée par les microorganismes pathogènes et les ravageurs s'élève de 10 à 40% par an, selon les espèces cultivées et les régions considérées. La FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture) estime que ces pertes se chiffrent, par an, à hauteur de 220 milliards de dollars pour les maladies des plantes et 70 milliards de dollars pour les insectes ravageurs.

La vulnérabilité des agroécosystèmes¹ vient du fait qu'ils déstabilisent les interactions entre les plantes et les agents pathogènes. En effet, dans les agroécosystèmes, les populations d'hôtes sont plus denses et génétiquement plus uniformes que dans les écosystèmes naturels. Cela est devenu de plus en plus prononcé avec l'intensification de l'agriculture, l'homogénéisation des systèmes ou encore l'agrandissement des parcelles. Les agents pathogènes qui ont été domestiqués avec leur hôte sont déjà adaptés aux espèces cultivées, ce qui fait des agroécosystèmes un environnement qui facilite la transmission des agents pathogènes entre individus. Les agroécosystèmes constituent aussi un environnement propice à l'émergence de nouvelles lignées épidémiques dans les agroécosystèmes (Stukenbrock and McDonald, 2008; McCann, 2020), grâce à des événements génétiques tels que le transfert horizontal de gènes, la recombinaison homologue ou des mutations spontanées.

Partie 2. Les interactions plantes-agents pathogènes

2. 1. Concepts et définitions des interactions hôtes et non hôtes

Si l'on considère la diversité biologique des organismes présents dans l'environnement, peu d'espèces sont capables de provoquer des maladies chez les plantes. La capacité d'un agent pathogène à provoquer une maladie chez un hôte est en effet l'exception et non la règle. Un concept communément accepté en phytopathologie est que dans la nature, les plantes sont résistantes à la plupart des agents pathogènes (Staskawicz, 2001; Antonovics et al., 2013). C'est ce qu'on désigne comme la résistance non hôte. Elle résulte de la capacité des plantes à reconnaître la majorité des envahisseurs potentiels et à s'en défendre. Dans ces conditions, l'interaction entre la plante résistante et le microorganisme est dite incompatible (**Figure 1.2A**) (Glazebrook, 2005), et le microorganisme est désigné comme avirulent.

¹ Agroécosystème : désigne l'écosystème des terres cultivées qui comprend les espèces cultivées, les microorganismes associées et les microorganismes, plantes et animaux indigènes (Stukenbrock and McDonald, 2008).

À l'inverse, les rares agents pathogènes qui parviennent à occasionner une maladie sont capables de contourner la résistance des plantes en échappant à la reconnaissance ou en supprimant les mécanismes de défense de l'hôte ou les deux (Staskawicz, 2001). En ce cas, les microorganismes peuvent se multiplier dans les tissus de la plante jusqu'à provoquer la maladie. Alors, cette interaction est compatible, la plante est sensible et l'agent pathogène virulent. Cependant, en absence de la résistance non hôte, certains génotypes de plantes peuvent résister à certains génotypes d'agresseurs. Cela nécessite la présence chez l'agent pathogène d'un gène d'aviorulence (*avr*) et chez la plante d'un gène de résistance (*R*) (**Figure 1.2B**), selon le modèle « gène pour gène » décrit par Harold Flor (Flor, 1955). Ce type de résistance spécifique (la résistance hôte) rend l'interaction entre la plante hôte et l'agent pathogène incompatible. Si un des deux partenaires n'a pas le gène correspondant, l'interaction est compatible.

La résistance non hôte est considérée comme la plus durable, mais différents facteurs peuvent affecter cette durabilité en favorisant la modification du spectre d'hôtes des agents pathogènes. Ces facteurs incluent la mondialisation qui favorise les échanges de matériel végétal infecté, le changement climatique ou encore la génération de nouvelles espèces végétales hybrides (Panstruga and Moscou, 2020).

2. 2. Le système immunitaire des plantes

Le système immunitaire des plantes est très différent de celui des animaux. En effet, les plantes ne possèdent pas de système immunitaire acquis (capable de s'adapter) ni de cellules immunitaires mobiles pour se protéger des infections. En revanche, les plantes possèdent, comme les animaux, un système immunitaire inné, où chaque cellule doit se défendre elle-même quand elle fait face à un agent pathogène (Jones and Dangl, 2006a; Spoel and Dong, 2012). Les cellules infectées peuvent aussi transmettre un message au reste de la plante pour que toutes les cellules soient en état d'alerte et puissent mettre place des défenses rapidement, en cas de besoin : c'est la Résistance Systémique Acquise (SAR). Les mécanismes de défense des plantes requièrent une forte dépense de ressources, qui pourraient autrement être utilisées pour la croissance des plantes (Huot et al., 2014). Les plantes doivent donc faire un compromis entre se défendre ou se développer. Les défenses constitutives représentent donc une dépense de ressources nécessaire pour s'assurer d'une protection minimale. Le reste des réponses immunitaires sont fermement régulées et sont arrêtées en l'absence de stress biotique pour privilégier l'assignation des ressources à la croissance (Cipollini, 2010; Huot et al., 2014).



Figure 1.3. Illustration de la diversité des épines des végétaux. À gauche, les épines de type « thorn » sur les branches d'un cédratier (*Citrus medica* L., Rutacée) sont issues des bourgeons axillaires, Au centre, les épines « spines » de la cardère (*Dipsacus (fullonum ?)* L., Dipsacacée) sont des bractées transformées. À droite, les épines « prickles » de l'églantier des chiens (*Rosa canina* L. Rosacée) sont des excroissances de l'épiderme des tiges. Les différentes épines sont indiquées par des flèches. De gauche à droite : aquarelles de Marilena Pistoia (1984, no. 6773), Petr Liska (1981, no.7586) et Celia Crampton (2003, no. 6463), dans la collection de l'Institut Hunt de Documentation Botanique.

Les réponses de défense des plantes peuvent être classées en deux catégories : l'immunité pré-invasive et post-invasive. La première regroupe les défenses qui empêchent l'entrée des agents pathogènes dans les tissus. L'immunité post-invasive désigne tous les mécanismes de défenses constitutifs ou qui sont induits suite à la perception de la présence de l'agent pathogène à l'intérieur de la plante.

2. 2. 1. Les défenses constitutives

Les défenses constitutives sont classées selon le fait qu'elles représentent une barrière physique ou chimique pour les agents pathogènes.

2. 2. 1. a) Les défenses physiques

Contre les herbivores (majoritairement des insectes et des nématodes) les défenses physiques servent à empêcher leur arrivée, leur attachement et leur nourrissage sur ou dans les plantes (Mitchell et al., 2016). Les premières barrières physiques sont les épines et les poils (aussi appelés trichomes) présents à la surface des végétaux. Il est possible de différencier trois types d'épines selon leur mode de formation (**Figure 1.3**). Faute de terminologie établie en français, j'indiquerai les termes anglo-saxons : les « spines » sont des pétioles, des veines ou des stipules transformées ; les « thorns » sont des branches transformées issues de bourgeons axillaires ; et les « prickles » sont des excroissances de l'épiderme. Pour illustrer le rôle des poils dans l'immunité, prenons l'exemple de *Brassica rapa* L.: les plantes avec des poils épars subissent plus de dommages causés par la larve de piéride de la rave (*Pieris rapae* L.) que celles qui ont une toison plus dense (Hanley et al., 2007).

D'autres barrières physiques, telles que des accumulations de minéraux, peuvent contribuer à protéger les plantes : l'accumulation de silice dans des cellules spécialisées, les phytolithes, augmente la résistance physique des tissus végétaux contre les animaux brouteurs, diminue leur digestibilité, et peut directement user les mandibules des insectes (Massey and Hartley, 2009). De même, plus une plante contient de cristaux d'oxalate de calcium², plus elle est évitée par les herbivores (Hanley et al., 2007).

La première barrière que rencontrent les agents pathogènes est souvent la cuticule (**Figure 1.4A**). Située à la surface des tissus végétaux aériens, elle est composée de cutine, de dépôts internes de cires, ainsi que de dépôts externes de cires sous forme de cristaux ou de films (Yeats

² Oxalate de calcium : cristaux de sel de calcium produits par les algues, les angiospermes et les gymnospermes. La taille et la forme des cristaux dépend des espèces. Ces cristaux sont produits par les plantes notamment pour réguler la concentration du calcium libre dans les tissus et détoxifier les métaux lourds (Franceschi and Nakata, 2005).

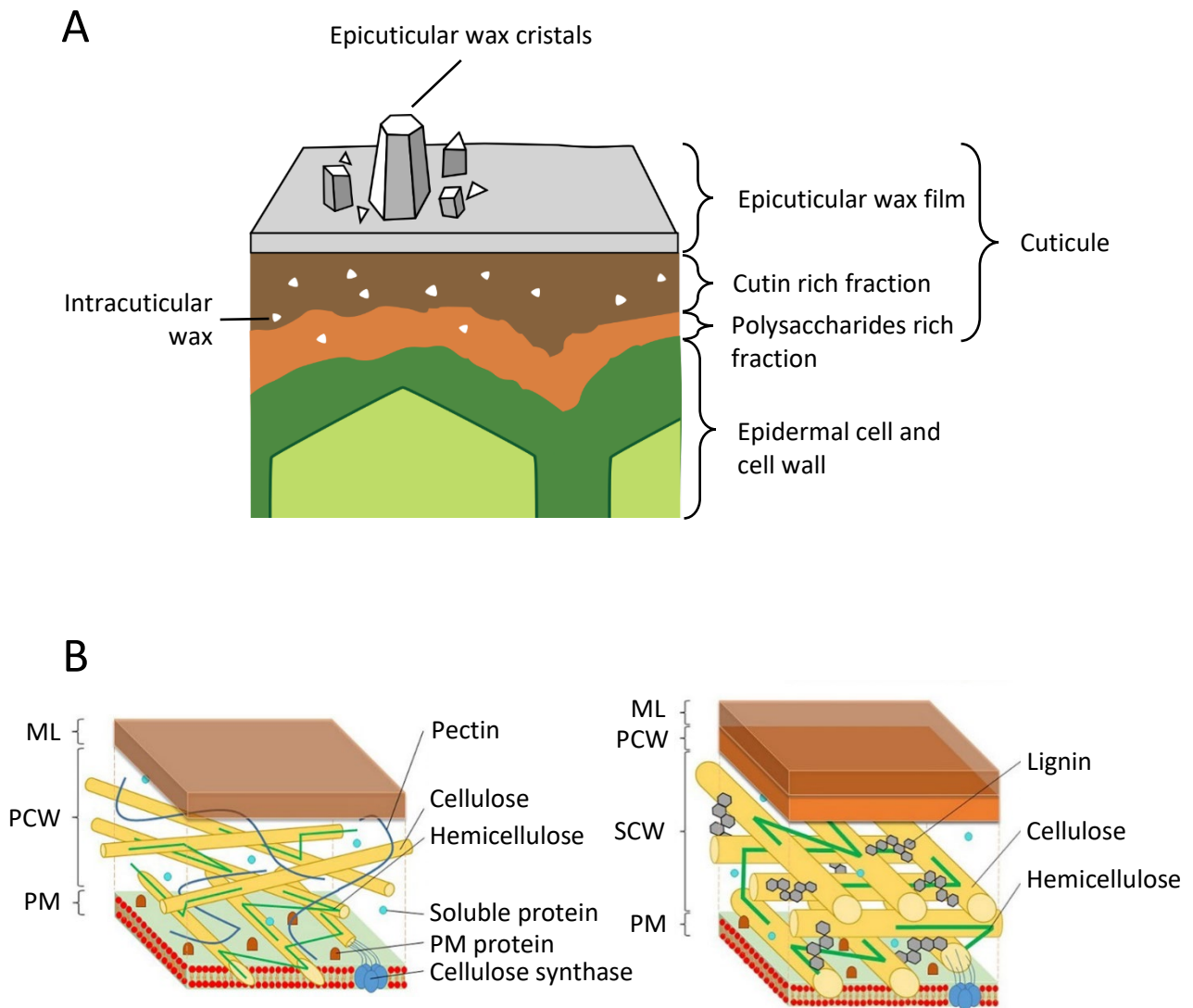


Figure 1.4. Défenses constitutives physiques des plantes. (A) Structure schématique d'une coupe transversale de la cuticule des plantes, qui protège l'épiderme sur les organes aériens. (B) Structure et composition des parois primaires (gauche) et secondaires (droite) des cellules végétales. ML : lamelle moyenne, PCW : paroi primaire, PM : membrane plasmique, SCW : paroi secondaire. Adapté de Yeats & Rose, 2013 (A); Adapté de Loix et al., 2017 (B).

and Rose, 2013). La composition de la cuticule varie selon les espèces, mais en plus de protéger les plantes de la déshydratation, elle protège de la plupart des attaques d'agents pathogènes (Serrano et al., 2014). Comme les poils, la cuticule impacte l'adhésion des agents pathogènes à la surface des feuilles. Ces agresseurs doivent la traverser activement pour accéder à l'intérieur de la plante, par des actions mécaniques (appressorium des champignons) ou chimiques (enzymes de dégradation des bactéries et des champignons), ou trouver des voies d'entrée, comme les stomates ou des blessures.

Si les agents pathogènes sont capables de passer la cuticule, ils rencontrent une nouvelle barrière passive : la paroi végétale (Malinovsky et al., 2014; Miedes et al., 2014). Cette paroi, qui entoure les cellules végétales, assure leur maintien structural en leur donnant un cadre rigide. La paroi est constituée de polysaccharides comme la cellulose, l'hémicellulose et la pectine et de protéines (**Figure 1.4B**). Toutes les cellules végétales possèdent une telle paroi, dite primaire. Certains tissus spécialisés ont aussi une paroi secondaire, qui se forme autour des cellules du xylème et du sclérenchyme par exemple, pour apporter encore plus de maintien, ce qui permet aux plantes de se développer en hauteur, ou de transporter de l'eau efficacement. La paroi secondaire est construite avec trois polymères principaux : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Loix et al., 2017). La modification de la formation ou de la composition des parois peut altérer la résistance aux agents pathogènes d'*Arabidopsis thaliana* L. Heynh, comme il est démontré avec des plantes mutantes affectées dans la biosynthèse de la cellulose ou des pectines (Miedes et al., 2014). Pour traverser cette barrière, les microbes ont développé un arsenal d'enzymes de dégradation des parois, qui sont souvent des facteurs de virulence majeurs (Malinovsky et al., 2014).

2. 2. 1. b) Les défenses chimiques

Les plantes produisent un arsenal de métabolites secondaires qui, en plus de leurs rôles dans la signalisation, la protection contre les stress abiotiques ou encore la symbiose, peuvent avoir des activités toxiques pour les agents pathogènes. Du fait de cette toxicité, qui est aussi un risque pour les plantes elles-mêmes, ces métabolites sont accumulés dans des structures spécialisées, comme les vacuoles (Du Fall and Solomon, 2011; Pedras and Yaya, 2015). Pour citer quelques exemples de métabolites secondaires qui servent de défense chimique : les isothiocyanates sont formés en cas de blessure des tissus des Brassicacées. Ils ont un effet dissuasif voir toxique sur certains parasites consommateurs. Les benzoxazinoïdes, synthétisés par des herbacées comme le maïs ou le blé, sont une famille de composés qui inhibent différents processus métaboliques, en réagissant avec les acides aminés d'enzymes ou avec les acides nucléiques des agents

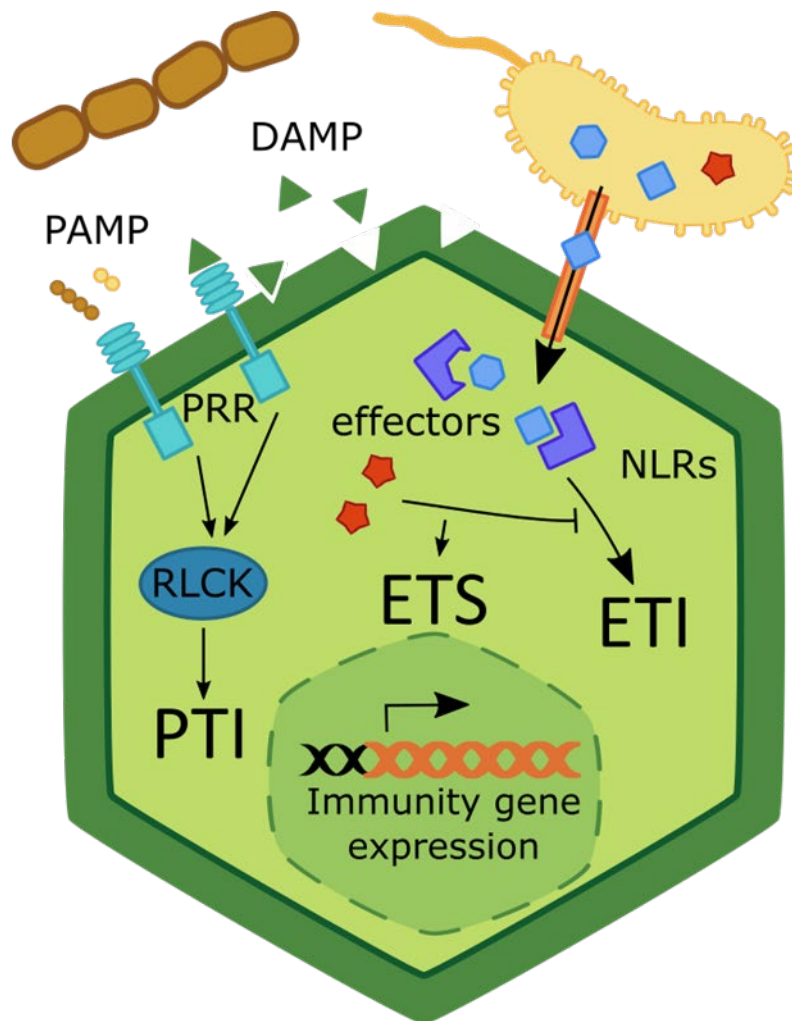


Figure 1.5. Les défenses des plantes sont induites par la perception de la présence des agents pathogènes. Les PAMPs et les DAMPs sont des molécules conservées provenant des agents pathogènes ou de la dégradation des tissus végétaux par les agents pathogènes. Les PAMP et les DAMPs sont reconnus par les récepteurs transmembranaires (PRR) qui activent des kinases intracellulaires, les RLCK. Ceux-ci transmettent le message de l'immunité pour mettre en place la PTI. Les agents pathogènes peuvent injecter des effecteurs dans les cellules végétales détourner le métabolisme des plantes à leur avantage. Les plantes reconnaissent spécifiquement les protéines effectrices grâce à leurs récepteurs NLRs, ce qui déclenche l'ETI. Pour échapper aux défenses des plantes, les agents pathogènes ont évolué des effecteurs qui bloquent les réponses de défense et rendent les plantes sensibles, c'est l'ETS. Les deux types d'immunité impliquent une modification transcriptionnelle de gènes de défense. PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern, DAMP : Danger-Associated Molecular Pattern, PRR : Pattern Recognition Receptor, RLCK : Receptor-Like Cytoplasmic Kinase, PTI : PAMP-Triggered Immunity, NLR : NOD-Like Receptor, ETI : Effector-Triggered Immunity, ETS : Effector-Triggered Susceptibility.

pathogènes (Niemeyer, 2009). Les terpènes et autres terpénoïdes regroupent la plus grande diversité de métabolites secondaires du règne végétal. Parmi eux se trouvent les saponines qui déstabilisent les membranes cellulaires, ou encore les pyréthrine, qui ont servi de modèles à la création d'insecticides de synthèse. Certains flavonoïdes (qui sont des composés phénoliques, comme les tannins) jouent un rôle dans les voies de signalisation des défenses, d'autres ont un rôle indirect : les anthocyanes ont un effet antifongique ; la quercétine est un larvicide et un antifongique (Treutter, 2006). Les glycosides cyanogènes sont des métabolites secondaires toxiques pour les cellules, car ils inhibent la respiration aérobie en altérant la fonction oxydative des cytochromes oxydases des mitochondries (Du Fall and Solomon, 2011).

Pour chacune de ces défenses constitutives, il existe des agents pathogènes qui se sont adaptés et sont capables de les contourner, les dégrader ou les détoxifier. Les agents pathogènes capables de passer ces barrières doivent alors affronter la seconde ligne de défenses, induites par leur arrivée.

2. 2. 2. Les défenses induites

2. 2. 2. a) Se rendre compte de la présence des agresseurs : les mécanismes de perception

Avant de pouvoir mettre en place des réponses de défenses contre les agents pathogènes, les plantes doivent percevoir leurs agresseurs. À partir des années 70, le terme d'“éliciteur” apparaît dans la littérature. Il désigne, à l'époque, un ensemble de molécules inconnues ou peu caractérisées (Darvill and Albersheim, 1984), qui sont reconnues par la plante et induisent des réactions de défense.

Historiquement, il est décrit que la perception de molécules d'origine microbienne ou végétale induit deux types de résistances, l'une basale (ou horizontale) et l'autre verticale. En 2006 (Chisholm et al., 2006; Jones and Dangl, 2006a), la terminologie évolue pour prendre en compte le type de molécules perçues (**Figure 1.5**). La première catégorie regroupe des molécules conservées entre de nombreux organismes : les peptides de la flagelline bactérienne (Felix et al., 1999), les peptidoglycanes, les lipopolysaccharides (Dow et al., 2000), le facteur d'élongation Tu des procaryotes (Kunze et al., 2004), la chitine des champignons (Shibuya and Minami, 2001), ou encore des molécules d'origine végétale, résultant de la dégradation de la cuticule ou des parois par les agents pathogènes, comme la cutine (Ziv et al., 2018) ou divers oligogalacturonides (Wan et al., 2021). Si elles sont d'origine microbienne ou végétale, les molécules sont appelées PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) ou DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern), respectivement. La reconnaissance des PAMP/DAMP active

chez les plantes une résistance « basale », à large spectre, la PTI (PAMP-Triggered Immunity). Certains agents pathogènes peuvent perturber cette première strate de défenses grâce à des effecteurs de type III, qui en retour peuvent être reconnus par la plante et amorcer un autre type de défense, l'ETI (Effector-Triggered Immunity). Les effecteurs sont presque toujours des facteurs de virulence, mais selon le génotype des couples hôtes/pathogènes considérés, ils peuvent parfois être des facteurs d'avirulence. Certains agents pathogènes peuvent surmonter l'ETI en gagnant de nouveaux effecteurs (ETS, Effector-Triggered Susceptibility), en perdant l'effecteur reconnu ou même en adressant l'effecteur à un compartiment cellulaire différent (Asai et al., 2018; Lu and Tsuda, 2021). L'ETI est une forme plus rapide et plus intense de la PTI, qui va entraîner la synthèse de phytoalexines et de protéines PR (Pathogenesis-Related), voire une réaction hypersensible (HR).

La HR est définie pour la première fois par Stakman (1915). Elle est caractérisée par une mort cellulaire rapide au point de contact avec un agent pathogène, qui empêche totalement ou partiellement la progression de l'infection (Goodman and Novacky, 1994). Commune aux Trachéophytes, la HR est induite par des bactéries, des champignons, des oomycètes, des virus, mais aussi des insectes, des nématodes et des plantes parasites (Balint-Kurti, 2019). Généralement associée aux agents pathogènes biotrophes, il semble que la HR soit moins efficace voire bénéfique aux nécrotrophes, puisqu'ils se multiplient sur les tissus morts de l'hôte. Au laboratoire, avec un inoculum fortement concentré d'agents pathogènes, la résistance liée à la reconnaissance du produit d'un gène *Avr* par celui d'un gène *R* (tel qu'il a été décrit plus haut, avec le modèle gène pour gène) est associée à la HR (Balint-Kurti, 2019). Les processus de mise en place de la HR sont encore méconnus. Parmi les pièces de ce casse-tête se trouve la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), d'oxyde nitrique (NO), de Ca^{2+} et d'acide salicylique en réponse à la perception d'un agent pathogène. Ceci mène à l'activation d'enzymes vacuolaires puis à la rupture du tonoplaste, qui libère des enzymes hydrolytiques pour aboutir finalement à la mort de la cellule (Mur et al., 2008).

2. 2. 2. b) Se rendre compte de la présence des agresseurs : les récepteurs de l'immunité

Les récepteurs de l'immunité des plantes peuvent se classer en deux catégories selon leur localisation subcellulaire (**Figure 1.5**) : les récepteurs de surface, capables de reconnaître des motifs moléculaires (PRR pour Pattern Recognition Receptors) et qui activent la PTI, et les récepteurs intracellulaires de type NLR (NOD-Like Receptors) qui activent l'ETI (Dodds and Rathjen, 2010).

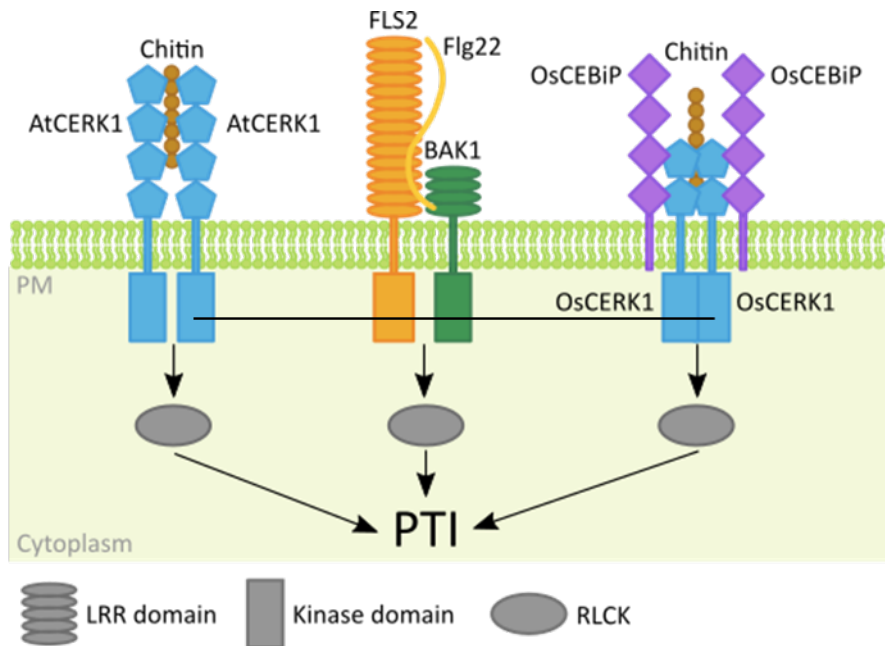


Figure 1.6. Exemples de perception de PAMPs par oligomérisation de PRRs. Chez *Arabidopsis*, la chitine sert de ligand et induit l'homodimérisation de AtCERK1. Le peptide flg22 est perçu par le récepteur AtFLS2, qui forme alors un hétérodimère avec son co-récepteur BAK1. Chez le riz, le récepteur de la chitine est formé de deux dimères de OsCEBiP et OsCERK1. Une fois que ces récepteurs sont activés par la perception de leur ligand, un réseau de RLCK déclenche la signalisation qui active la PTI. PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern ; PRR : Pattern Recognition Receptor, RLCK : Receptor-Like Cytoplasmic Kinases, PTI : PAMP-Triggered Immunity. Adapté de Macho et Zipfel, 2014.

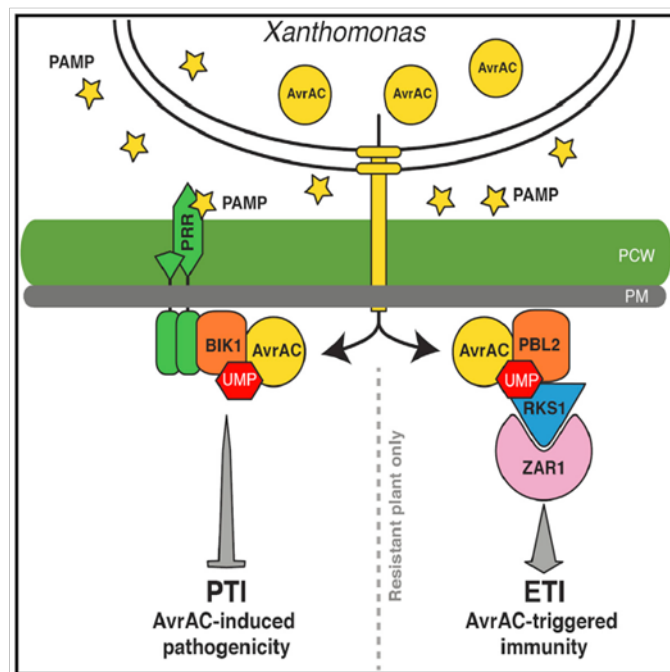


Figure 1.7. L'effecteur AvrAC est un facteur de virulence ou d'avirulence. Dans les plantes sensibles, AvrAC (= xopAC) cible le récepteur BIK1, un RLCK, ce qui inhibe la PTI. Chez les plantes résistantes, AvrAC cible un homologue de BIK1, PBL2, et l'uridylyle. PBL2 est alors recruté par le complexe de NLR RKS1/ZAR1 qui va activer l'ETI. ETI : Effector-Triggered Immunity, NLR: NOD-Like Receptor, PTI : PAMP-Triggered Immunity, RLCK : Receptor-Like Cytoplasmic Kinases. Wang *et al.*, 2015.

Parmi les PRR, il y a les récepteurs-kinases, avec un domaine de liaison au ligand extracellulaire et un domaine kinase intracellulaire, et les protéines de type récepteur (RLP Receptor-Like Protein) qui n'ont pas de domaine kinase (Dodds and Rathjen, 2010; Macho and Zipfel, 2014). Ces récepteurs reconnaissent les PAMP et les DAMP et leur activation déclenche la PTI. Les PAMP agissent comme des ligands qui activent les PRR, en induisant leur oligomérisation (**Figure 1.6**). À titre d'exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, les oligomères de chitine provoquent l'homodimérisation de AtCERK1 (Macho and Zipfel, 2014), qui devient un PRR actif. Chez le riz, la chitine permet la formation d'un récepteur formé de OsCEBiP et OsCERK1 (Monteiro and Nishimura, 2018). De même, le domaine extracellulaire d'AtFLS2 perçoit un fragment de 22 acides aminés de la flagelline (flg22), ce qui entraîne l'hétérodimérisation de FLS2 avec son corécepteur BAK1 (Chinchilla et al., 2007).

Les NLR partagent une structure similaire : un domaine C-terminal de répétitions riches en leucines (LRR, Leucin-rich repeat), un domaine central de liaison avec des nucléotides (NBS, Nucleotide-binding site) et un domaine N-terminal variable. Le domaine N-terminal peut être de type TIR (Toll-interleukin-1 receptor), CC (coiled-coil) ou RPW8 (Monteiro and Nishimura, 2018). C'est la reconnaissance, directe ou indirecte, d'effecteurs par ces différents NLR qui provoque l'ETI. Par exemple, l'effecteur XopAC (ou AvrAC, **Figure 1.7**) de la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* est capable d'inhiber la PTI chez *A. thaliana* en ciblant les récepteurs BIK1 et RIPK (Feng et al., 2012). Cependant, dans certaines accessions d'*A. thaliana* comme Col-0, XopAC est un facteur d'avirulence et provoque une ETI vasculaire (Xu et al., 2008). Dans ce cas, PBL2, un homologue de BIK1, sert de leurre et est uridylylé par XopAC (Guy et al., 2013; Wang et al., 2015). La forme uridylylée de PBL2 est recrutée par le complexe pseudo-kinase RKS1/ NLR ZAR1 et l'ETI est activée dans les accessions résistantes (Wang et al., 2015).

Malgré des localisations différentes des récepteurs PRR et NLR, et leurs rôles au premier abord distincts, plusieurs revues et études font état de la frontière de plus en plus ténue entre la PTI et l'ETI (Thomma et al., 2011; Lu and Tsuda, 2021; Pruitt et al., 2021; Chang et al., 2022). Des réponses communes, comme l'induction de gènes de défense, peuvent ainsi être activées par des cascades de signalisation elles-aussi communes à l'activation des PRR et des NLR : les oscillations calciques, le burst oxydatif ou les cascades de MAP kinases (Lu and Tsuda, 2021).

Par ailleurs, il existe des molécules microbiennes qui ne sont reconnues ni par des PRR ni par des NLR, à l'exemple des effecteurs TAL (Transcription Activator-Like Effector). Chez

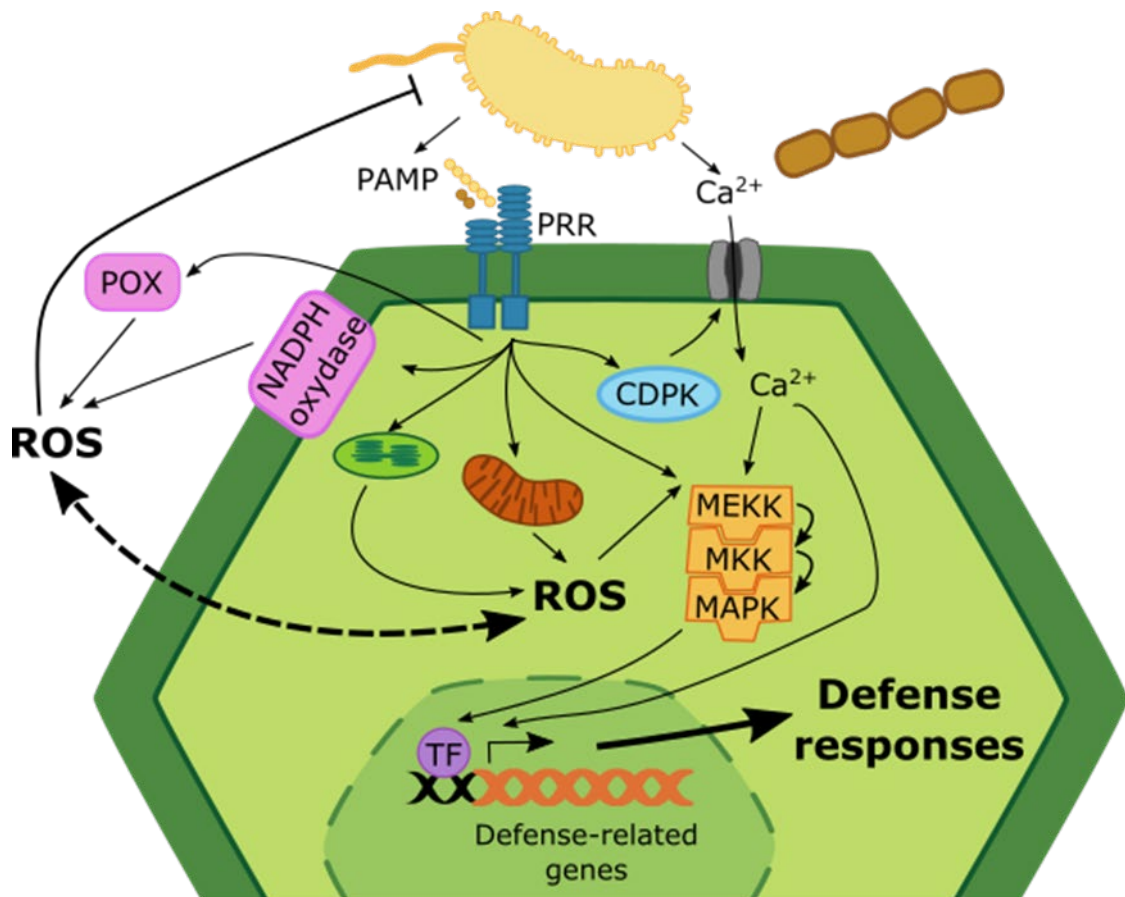


Figure 1.8. Signalisation lors de l'induction des réponses immunitaires. La perception des PAMPs par les récepteurs PRR entraîne une cascade de signalisation rapide qui inclue une accumulation de Ca^{2+} dans le cytoplasme et une production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) par les mitochondries, les chloroplastes, les NADPH oxydases et les peroxydases (POX). Les PAMPs, le Ca^{2+} et les ROS vont ensuite activer des CDPK (Ca^{2+} -dependant protein kinase) et des cascades de kinases qui se phosphorylent les unes après les autres (Mitogen-Activated Protein Kinases, qui incluent les MEKK, MKK et MAPK). A leur tour, elles activent des facteurs de transcription (TF) qui transmettent le signal dans le noyau et permettent la reprogrammation transcriptionnelle de gènes de défense. Adapté de la thèse de Manuel González Fuente, UPS, Toulouse, 2020.

les plantes résistantes, les TALEs se lient au promoteur de gènes exécuteurs et activent leur transcription, ce qui entraîne la HR, comme lors d'une interaction entre un gène *R* et *avr* (Bogdanove et al., 2010; Zhang et al., 2015). Ici il n'y a pas de récepteur, mais un gène cible d'un TALE, détourné pour activer les défenses.

2. 2. 2. c) Propager l'alerte par des cascades de signalisation

Une fois que les agents pathogènes sont perçus, durant la PTI et l'ETI, les plantes déclenchent un ensemble de réponses immunitaires. Les premières, initiées en quelques minutes au niveau local et systémique sont la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des augmentations de la concentration cellulaire de Ca^{2+} (Boller and Felix, 2009). S'en suit l'activation de protéines kinase dépendante du Ca^{2+} (Ca^{2+} -dependent protein kinase, CDPK) et de cascade de MAP kinases (mitogen-activated protein kinase, MAPK) qui convoient le message immunitaire pour lancer la production de phytohormones et une reprogrammation transcriptionnelle majeure (Tsuda and Somssich, 2015; Couto and Zipfel, 2016). L'ensemble de ces signaux converge donc vers un même but : modifier l'expression des gènes de défense, par l'intermédiaire de facteurs de transcription, pour mettre en place des réactions de défense. Le réseau de signalisation des défenses est intriqué et interconnecté à tous les niveaux (**Figure 1.8**), possiblement en reflet de la diversité d'agents pathogènes et de stratégies d'infection auxquelles les plantes sont confrontées (Tsuda and Somssich, 2015).

i. Le premier signal de l'immunité : le signal calcique

Un des signaux les plus rapides en réponse à l'infection est l'augmentation de la concentration cytoplasmique en ions calcium (Ca^{2+}). Chez *A. thaliana*, la transduction du signal calcique nécessite l'activation de BIK1 et PBL1 par des PRR (Li et al., 2014; Ranf et al., 2014). Ces deux molécules font partie de la famille des RLCK (Receptor-Like Cytoplasmic Kinases), qui sont des exécuteurs de la signalisation en aval des récepteurs PRR (DeFalco and Zipfel, 2021). BIK1 va phosphoryler CNGC4, qui forme avec CNGC2 un canal qui permet la production du pic de Ca^{2+} dans les minutes qui suivent la reconnaissance de flg22 (Tian et al., 2019). Chez le riz, OsCNGC9 (CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL 9) est un canal perméable au Ca^{2+} , qui induit un influx de calcium en réponse à la chitine et flg22 (Wang et al., 2019). D'après une étude récente, il semblerait qu'après activation, le NLR d'*A. thaliana* ZAR1 forme un canal calcique (Bi et al., 2021).

ii. Double rôle des ROS : signaux de l'immunité et action antimicrobienne

Un second signal de la perception d'un agent pathogène est la production rapide des espèces réactives de l'oxygène (ROS), que sont l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), l'ion superoxyde

($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyl ($\cdot OH$). Les ROS sont synthétisés dans le cytoplasme par les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes alors que les ROS apoplastiques sont produits par des peroxydases situées dans les parois et des NADPH oxydases situées dans la membrane plasmique. Les NADPH oxydases des plantes font partie de la famille RBOH (Respiratory Burst Oxidase Homologs). AtRBOH-D est directement associé à des complexes PRR, comme celui de FLS2 (Kadota et al., 2014; Li et al., 2014). Les ROS ont un rôle important dans la signalisation de l'immunité, mais ils servent aussi dans la signalisation des stress abiotiques ou encore dans le développement des plantes. De plus, les ROS sont cytotoxiques car ils peuvent provoquer des dommages oxydatifs sur les lipides, les protéines ou encore les acides nucléiques. Ils ont donc un effet antimicrobien.

iii. Transduction du signal calcique par les MAPK

La perception des agents pathogènes par différents récepteurs de l'immunité est transmise dans le cytoplasme et le noyau par des cascades de MAPK qui phosphorylent leur substrat (Lu and Tsuda, 2021). Chez la plante modèle *A. thaliana*, deux cascades parallèles de MAPK, impliquées dans la signalisation de l'immunité, ont été identifiées (Thulasi Devendrakumar et al., 2018). La cascade MAPKKK3/5-MKK4/5-MPK3/6, qui va induire un ensemble de réponses immunitaires, comme la biosynthèse d'éthylène, de camalexines ou de glucosinolates, ou encore la fermeture des stomates. La seconde cascade, MEKK1- MKK1/2-MPK4 induit d'autres défenses basales. Logiquement, les MAPK font partie des processus ciblés par les effecteurs des agents pathogènes (Thulasi Devendrakumar et al., 2018).

iv. Modulation de la signalisation hormonale

Les hormones végétales tiennent de nombreux rôles dans la physiologie des plantes, que ce soit leur développement ou la réponse aux stress abiotiques ou l'immunité. L'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) sont particulièrement importants pour l'immunité des plantes. Il est communément admis que les agents pathogènes biotrophes (qui colonisent et se nourrissent de tissus vivants) induisent la voie de signalisation du SA, et que les organismes herbivores (qui blessent les tissus) et les agents pathogènes nécrotrophes (qui se nourrissent de tissus morts) induisent plutôt les voies du JA et de l'éthylène qui agissent souvent en synergie pour activer des gènes de défense (Glazebrook, 2005; Bari and Jones, 2009).

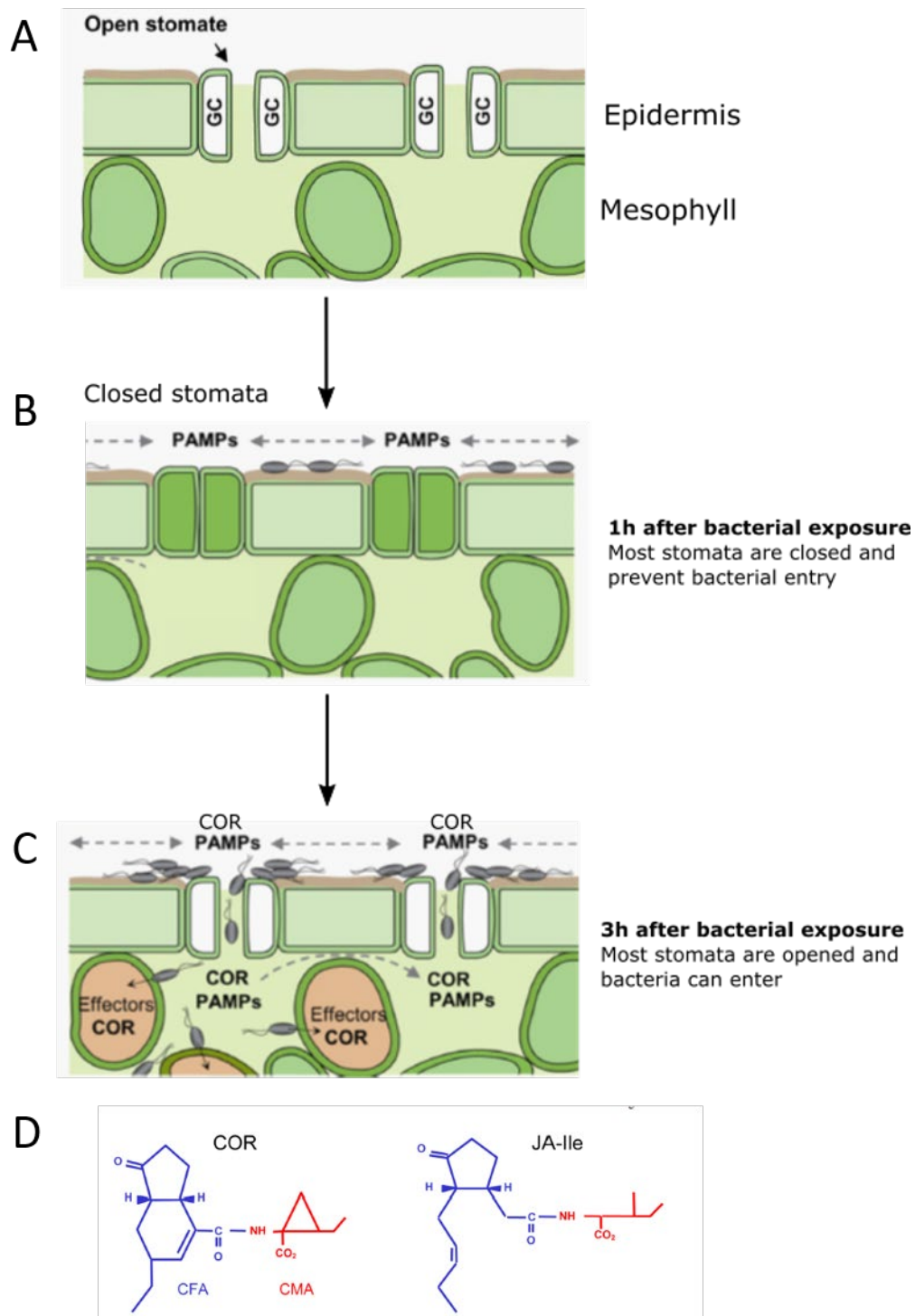


Figure 1.9. La défense pré-invasive stomatique et son inhibition par des bactéries pathogènes. (A) Coupe transversale de l'épiderme d'une feuille d'*Arabidopsis* comportant des stomates ouverts. GC : cellules de garde. (B) Lorsque les cellules de garde des stomates sont exposées à des bactéries et leurs PAMPs, les stomates peuvent se fermer dans l'heure. Les flèches pointillées indiquent la diffusion des PAMPs à la surface de l'épiderme. (C) Dans le cas d'une bactérie virulente comme *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), 3h après le début de l'infection, elle produit de la coronatine (COR) qui diffuse dans le milieu et induit la ré-ouverture des stomates. Cela augmente le nombre de points d'entrée pour *Pst*. Une fois dans les tissus, *Pst* peut injecter des effecteurs dans les cellules du mésophylle pour inhiber les défenses de l'hôte et provoquer des symptômes. (D) Les structures moléculaires du jasmonate d'isoleucine (JA-Ile) et de la coronatine sont similaires. Adapté de Melotto *et al.*, 2008

2. 2. 2. d) Réagir à la présence hostile en mettant en place de nouvelles défenses

i. Renforcement des défenses physique

Les défenses physiques induites peuvent se résumer par le renforcement des défenses constitutives mentionnées plus tôt, avec notamment celui des parois végétales. L'apposition de callose et la lignification des parois (Smith, 1900; Vance et al., 1980; Zeyen et al., 2002; Bhuiyan et al., 2009; Underwood, 2012) permettent notamment d'empêcher la pénétration des hyphes de champignons pathogènes ou de limiter la dégradation des parois. L'augmentation du taux de méthyl-estérification des pectines durant l'infection protège les parois des pectates lyases des agents pathogènes (Lionetti et al., 2012; Taurino et al., 2014).

Un autre point clef des défenses des plantes est leur capacité à fermer leurs stomates en réponse à la présence d'agents pathogènes (Melotto et al., 2006). Les stomates sont des ouvertures à la surface des tissus aériens des plantes, qui permettent des échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère. Ils sont constitués de deux cellules de gardes capables de se fermer et de s'ouvrir selon les conditions climatiques, le cycle jour/nuit et différents stimuli abiotiques et biotiques. Les stomates sont des voies d'entrées directes vers le mésophylle et de nombreux agents pathogènes les utilisent comme point d'entrée : différents *Pseudomonas* comme *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* sur le concombre (Yamanaka et al., 1980) et *P. syringae* pv. *morsprunorum* sur le merisier (Roos and Hattingh, 1983), *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* sur le pêcher (Miles et al., 1977), *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* (Hugouvieux et al., 1998), l'oomycète *Plasmopara viticola* sur la vigne (Allègre et al., 2007) ou des champignons (*Puccinia* (Grimmer et al., 2012)). Face à tous ces agresseurs, les plantes mettent en place une défense stomatique (dite pré-invasive) et ferment leurs stomates pour les empêcher d'entrer (**Figure 1.9A-C**). C'est le cas par exemple lorsque elles perçoivent des PAMP, comme flg22 et les LPS (Melotto et al., 2006), la syringomycine, une toxine bactérienne (Mott and Takemoto, 1989), ou le chitosan des champignons (Lee et al., 1999). Dans le cas de la fermeture des stomates induite par flg22, il a été prouvé que BIK1 était requis (Li et al., 2014). Pour forcer la réouverture des stomates, les agents pathogènes ont développé différentes molécules : *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) synthétise la coronatine (Mino et al., 1987), un analogue structurale d'une forme conjuguée de JA, le jasmonate d'isoleucine (**Figure 1.9D**), une des hormone impliquée dans les défenses citée précédemment, qui permet la réouverture des stomates ; *Fusicoccum amygdali* utilise la fusicoccine (Turner and Graniti, 1969) ; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* quant à lui inhibe la fermeture des stomates grâce à un

facteur de virulence régulé par un acide gras qui sert de messenger moléculaire entre cellules bactériennes, désigné DSF (Diffusible Signal Factor) (Gudesblat et al., 2009; Zhou et al., 2017).

De façon intéressante, la plante modèle *Arabidopsis thaliana* est capable d'avoir une réponse systémique développementale en réponse à *Pseudomonas syringae* ou suite à une exposition à la flg22 ou au SA : elle diminue la densité de stomates de ses nouvelles feuilles, ce qui lui confère une protection à long terme (Dutton et al., 2019).

ii. Production de composés toxiques pour les agents pathogènes

Parmi les défenses chimiques induites par la perception des agents pathogènes, on trouve les phytoalexines (Ahuja et al., 2012). Introduit il y a plus de 80 ans (Müller and Börger, 1940), le terme a été formellement défini par un groupe de travail au début des années 80 : « Les phytoalexines sont des composés antimicrobiens de faible poids moléculaires qui sont synthétisés par et accumulés dans les plantes après exposition à des microorganismes » (Paxton, 1981). Ce sont des métabolites secondaires actifs contre les agents pathogènes. Une phytoalexine amplement décrite est la camalexine (3-thiazol-2'-yl-indole), d'abord isolée de la Cameline (*Camelina sativa* (L.) Crantz, lin bâtard, Browne et al., 1991), une plante de la famille des Brassicacées cultivée pour la production d'huile et de fourrage. Elle a ensuite été détectée et étudiée chez *A. thaliana* et quelques autres Brassicacées (Bednarek et al., 2011). Son activité antimicrobienne a été prouvée *in vitro* contre *Botrytis cinerae* (Kliebenstein et al., 2005).

La synthèse d'un ensemble de protéines de défense (protéines PR pour Pathogenesis-Related proteins) est induite par les agents pathogènes (Spoel and Dong, 2012). Les protéines PR désignent une diversité de protéines classées en familles selon leurs similarités de séquence, leurs activités enzymatiques et d'autres propriétés biologiques : différentes familles vont être induites en réponse à différents agents pathogènes. À titre d'exemples, chez *Arabidopsis thaliana*, l'accumulation de PR1 (activité antifongique), PR2 (glucanases) et PR5 (thaumatines) est augmentée par le SA comme défense contre des biotrophes, alors que l'accumulation de PR3-4 (chitinases) et PR12 (défensines) l'est par le JA en réponse à des nécrotrophes (Thomma et al., 1998). Les protéines PR peuvent aussi être des inhibiteurs de protéinases (PR6) ou bien des oxalate oxydases (PR15) (Sels et al., 2008; Ali et al., 2018).

2. 2. 2. e) SAR : Propager l'information au-delà du site d'infection pour se mettre en alerte

La HR, et plus généralement les infections locales par des agents pathogènes, induisent une résistance systémique, la SAR, qui peut être décrite comme le « priming », l'amorçage, des défenses à l'échelle de la plante entière. Cet état permet à la plante de mettre en place plus

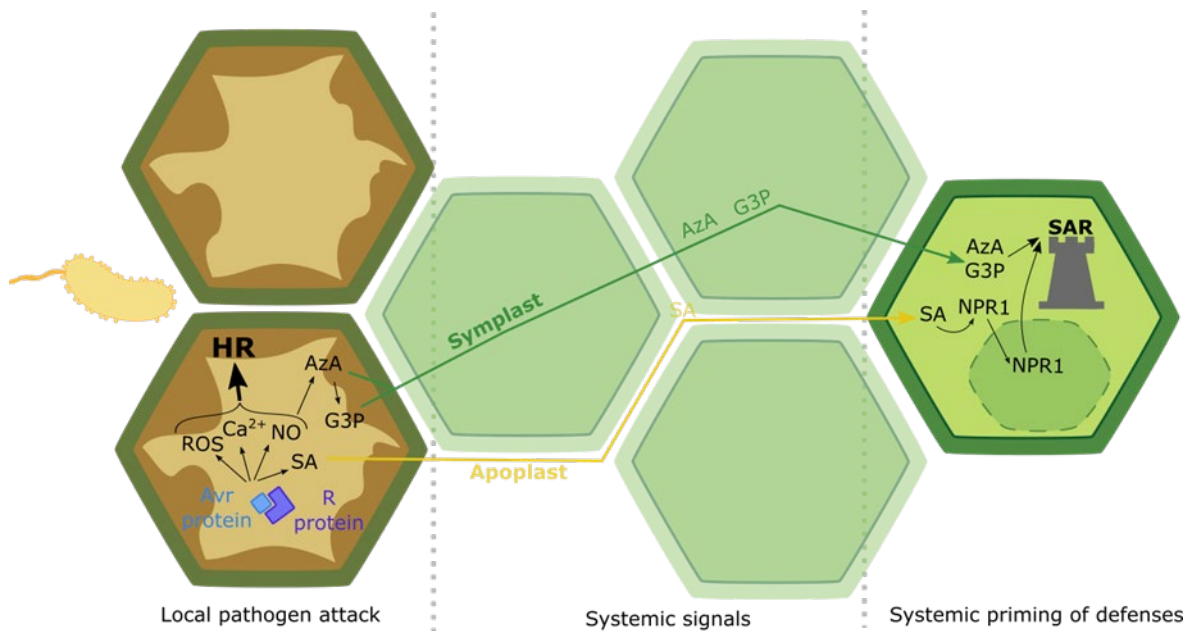


Figure 1.10. La résistance systémique acquise (SAR). La reconnaissance d'un effecteur Avr par un récepteur R induit une augmentation de la quantité de ROS, Ca^{2+} , du monoxyde d'azote (NO) et de l'acide salicylique (SA) dans le cytoplasme de la cellule végétale infectée. Tous ces signaux déclenchent l'immunité de la plante, avec potentiellement une mort cellulaire locale, la HR, qui limite la propagation des agents pathogènes. Après sa synthèse, le SA peut être transporté à longue distance dans le reste de la plante par l'apoplasme et activer la SAR grâce à NPR1. La seconde voie d'activation de la SAR est contrôlée par l'acide azélique (Aza) et le glycérol-3-phosphate (G3P). L'Aza est produit par le NO et les ROS, et l'Aza induit la synthèse de G3P. Ces deux signaux sont transportés par le symplasme dans le phloème pour aller activer la SAR dans des tissus lointains. Adapté de la thèse de Manuel González Fuente, UPS, Toulouse, 2020

rapidement ou d'une façon accentuée ses réactions de défenses contre une large gamme d'agents pathogènes, lors de la prochaine attaque qu'elle subira (Conrath et al., 2006). L'implémentation de la SAR nécessite la dispersion d'un signal à partir de la zone infectée jusqu'aux organes sains, vraisemblablement par le phloème (Gao et al., 2015; Riedlmeier et al., 2017; Singh et al., 2017; Shine et al., 2019). Deux voies de signalisation parallèles de la SAR ont été décrites (**Figure 1.10**). L'une implique l'accumulation de SA, qui est transporté par l'apoplaste et est nécessaire à la monomérisation de NPR1 et son import dans le noyau (Cao et al., 1997; Singh et al., 2017). L'autre voie débute avec l'accumulation de NO et ROS induite par les pathogènes. Les ROS et les NO agissent ensemble dans une boucle de rétroaction qui génère de l'acide azélaïque (AzA). L'AzA induit l'expression des gènes de synthèse du glycérol-3-phosphate (G3P). L'AzA et le G3P sont chargés dans le phloème par le symplaste et leur transport se fait par la régulation des plasmodesmes (Singh et al., 2017).

Partie 3. Le rôle central de l'eau dans les interactions plantes-pathogènes

3. 1. Les aquaporines sont impliquées dans l'immunité des plantes

Les aquaporines sont situées dans les membranes des vacuoles, du réticulum endoplasmique et dans la membrane plasmique (Verdoucq and Maurel, 2018). Elles permettent le transport de l'eau entre cellules des feuilles ou des racines, par les voies symplastique et apoplasmique. Elles peuvent aussi transporter d'autres petits solutés comme l'urée, l' H_2O_2 , l'acide borique et silicique et le glycérol ou des gaz comme le CO_2 et le NH_3 . Il faut noter que les aquaporines ont des rôles admis dans l'immunité des plantes. Comme elles peuvent transporter l' H_2O_2 , elles font partie du réseau de signalisation de l'immunité (Tian et al., 2016; Li et al., 2019; Zhang et al., 2019b). Elles ne sont pas utilisées directement pour l'entrée des effecteurs dans les cellules, car elles sont trop petites (l'ouverture des aquaporines est de l'ordre des Å, les effecteurs font quelques nm). En revanche, elles peuvent participer à la translocation des effecteurs, en étant impliquées dans l'ancrage du système de sécrétion de type III dans la membrane plasmique. De cette façon, l'aquaporine PIP1;3 est un facteur de sensibilité ou de résistance selon que l'effecteur transloqué par l'agent pathogène est un facteur de virulence ou d'avirulence (Zhang et al., 2019b; Zhang et al., 2019a). Comme il est décrit plus loin, les aquaporines pourraient aussi être impliquées dans le transport passif de l'eau pour rétablir le déséquilibre osmotique provoqué par différents agents pathogènes. Il semble donc que la régulation du transport de l'eau fait partie des processus impliqués dans l'immunité des plantes, qui peuvent être ciblés par les agents pathogènes pour supprimer les défenses ou promouvoir la maladie.

3. 2. L'accès à l'eau est un facteur majeur des maladies microbiennes des plantes

Pour qu'un agent pathogène puisse provoquer une maladie sur un hôte, il faut que le premier soit virulent, le second sensible et que les conditions environnementales soient favorables à la maladie. Ces trois conditions qui déterminent le résultat de l'interaction sont appelées le "triangle de la maladie". Au sein des facteurs environnementaux, la température est importante (par exemple, *Xcc* prospère à 25-30°C), mais la forte humidité atmosphérique a aussi été régulièrement associée à des épidémies (Miller et al., 1996; Schwartz, 2011; Zhang et al., 2021). L'humidité apparaît comme une condition centrale et pourtant peu étudiée dans les interactions entre plants hôtes et organismes pathogènes. En plus d'être une source de nutriments, les plantes sont probablement aussi une source d'eau indispensable à la survie et à la multiplication des agents pathogènes. Ceci a été vérifié dans des conditions d'expérimentations contrôlées : une haute humidité atmosphérique est nécessaire à la survie de *Pseudomonas syringae* lorsqu'il vient d'être inoculé dans des feuilles de haricot (Monier and Lindow, 2003).

Il est intéressant de noter que de nombreux agents pathogènes, comme des espèces de *Pseudomonas* et de *Xanthomonas* responsables des maladies de type piqûre bactérienne (leaf spot) provoquent des lésions aqueuses³ et que la sévérité de la maladie est associée avec la persistance de ces lésions (Beattie, 2011; Aung et al., 2018). En 1937, une expérience montre que provoquer des lésions aqueuses artificielles dans l'apoplaste (grâce à une pression d'eau dans les racines, qui sont enfermées dans une cloche, jointée autour de la tige) augmente la prolifération de bactéries dans des feuilles de plantes non hôtes. *Bacterium angulatum* et *Bacterium tabacum* (qui sont en fait deux souches d'une même espèce, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*), pathogènes sur le tabac, peuvent infecter la tomate, le haricot et le pommier si les feuilles ont subi des lésions aqueuses au préalable (Johnson, 1937). De même, Young (1974) montre que différentes souches non pathogènes du haricot (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* et *Erwinia herbicola*) peuvent se multiplier dans l'apoplaste des plantes autant qu'une souche virulente de *Pseudomonas phaseoli*, quand les feuilles sont infiltrées avec les suspensions bactériennes et que l'imbibition de l'apoplaste est maintenue.

Dans le pathosystème *A. thaliana*–*Pst* DC3000, Xin et al. (2016) montrent que les lésions aqueuses sont une étape nécessaire mais transitoire du début de l'infection. Par imagerie *in vivo*, ils ont montré que les zones inondées sont celles où les bactéries se multiplient

³ Lésions aqueuses : correspondent aux symptômes de « water soaking ». Elles désignent la présence d'eau dans les espaces intercellulaires (l'apoplaste) et sont provoquées par des stress biotiques ou abiotiques.

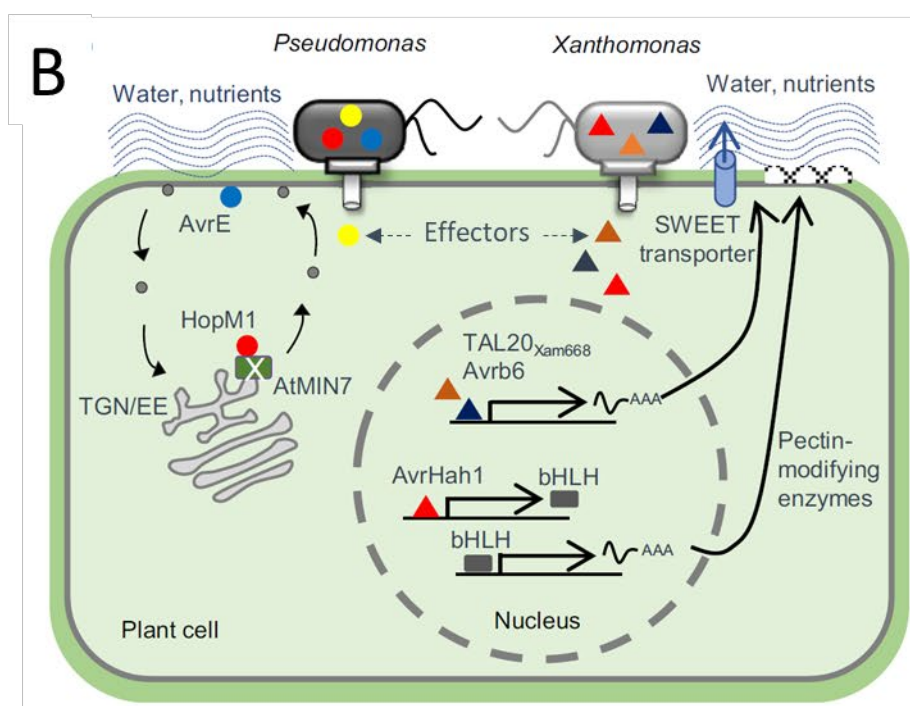


Figure 1.11. Illustration des lésions aqueuses et des mécanismes microbiens qui les provoquent. (A) Les lésions aqueuses, ou « water soaking », provoquées par *Pst* DC3000 sur *A. thaliana*, un jour après infection, sont les taches noires visibles sur les feuilles (flèches blanches). (B) Modèle illustrant différentes façons dont des bactéries pathogènes provoquent des lésions aqueuses pour supporter leur agressivité. *Pst* utilise deux effecteurs, HopM1 et AvrE. Dans la cellule végétale, HopM1 dégrade MIN7, une protéine de l'appareil de Golgi, et AvrE est localisé dans la membrane plasmique. Ces deux effecteurs affectent très probablement l'intégrité de la membrane plasmique des cellules végétale, ce qui crée un déséquilibre osmotique qui attire l'eau dans l'apoplaste. Au moins trois *Xanthomonas*, *X. gardneri*, *X. axonopodis* pv. *manihotis* et *X. citri* subsp. *malvacearum* utilisent leurs effecteurs TAL créer des lésions aqueuses. Dans un cas, le TALE manipule l'expression d'un transporteur de sucre (SWEET), ce qui redirige le sucre vers l'apoplaste et modifie comme *Pst* le potentiel osmotique de l'apoplaste, en plus de fournir des nutriments à la bactérie. Dans les autres cas, les TALEs ciblent un facteur de transcription (bHLH) qui induit la production d'enzymes modifiant les pectines de la paroi. Ceci affecte les propriétés hygroscopiques des parois qui pourrait entraîner une accumulation d'eau dans l'apoplaste. Aung et al., 2016.

rapidement. Xin *et al.* ont aussi utilisé une souche avirulente, *Pst* DC3000 *avrRpt2*, qui déclenche l'ETI, et celle-ci ne provoque pas de lésions aqueuses. Cela suggère qu'un des mécanismes de défense des plantes est de limiter l'apparition des lésions aqueuses.

3. 3. Différents effecteurs induisent l'apparition de lésions aqueuses

Plusieurs mécanismes sont utilisés par les agents pathogènes pour provoquer les lésions aqueuses dans l'apoplaste et favoriser leur développement (**Figure 1.11**). *Pseudomonas syringae* synthétise de l'alginate dans l'apoplaste, un exopolysaccharide responsable des symptômes de water soaking (Beattie, 2011). Dans plusieurs cas, l'apparition des lésions aqueuses peut être attribuée aux effecteurs des agents pathogènes. *Pantoea stewartii*, l'agent de la flétrissure de Stewart du maïs (vecteur : l'altise du maïs, *Chaetocnema pulicaria*), utilise son effecteur WtsE pour augmenter sa virulence en promouvant les lésions aqueuses (Ham *et al.*, 2006). *Xanthomonas gardneri*, responsable de la maladie de la gale bactérienne des tomates, provoque des lésions aqueuses grâce à un effecteur TAL, qui induit un facteur de transcription (bHLH) qui active une pectate lyase (Schwartz *et al.*, 2017). La façon dont la pectate lyase provoque des lésions aqueuses n'est pas certaine, mais il est probable qu'elle modifie la paroi végétale et ses propriétés hygroscopiques, ce qui entraîne une accumulation d'eau dans l'apoplaste (Aung *et al.*, 2018). Deux bactéries manipulent l'expression de transporteurs de sucres SWEET (Sugar Will Eventually Be Exported) grâce à leurs effecteurs TAL, d'une part pour faciliter leur nutrition mais aussi pour modifier le potentiel osmotique de l'apoplaste et le rendre aqueux : *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Cohn *et al.*, 2014), et *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Cox *et al.*, 2017), qui provoquent la bactériose du manioc et du coton, respectivement. Les effecteurs TALs peuvent donc cibler différents gènes des plantes hôtes pour induire des lésions aqueuses et promouvoir la maladie.

Les agents pathogènes peuvent se servir d'autres effecteurs pour arriver au même résultat : l'effecteur HopM1 de *P. syringae* induit l'imbibition de l'apoplaste, et introduire l'effecteur dans une souche non pathogène de *P. syringae* suffit à la rendre virulente sur *A. thaliana* (Xin *et al.*, 2016). Il semblerait que HopM1 cible et dégrade la protéine MIN7, impliquée dans le transport vésiculaire et l'homéostasie de l'eau dans l'apoplaste. De plus, plusieurs études montrent que les effecteurs HopM1 et AvrE1 de *P. syringae* ciblent la signalisation de l'acide abscissique pour induire la fermeture des stomates et donc produire des lésions aqueuses (Goel *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2022; Roussin-Léveillé *et al.*, 2022).

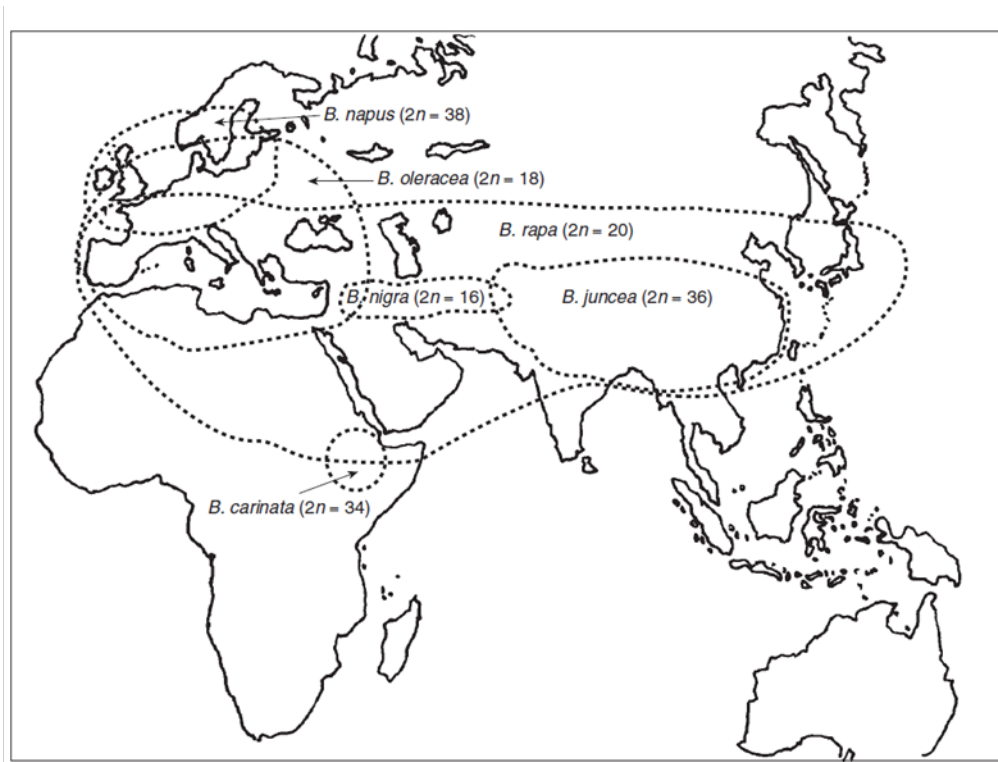


Figure 1.12. Origine des centres de diversité des six espèces majeures de *Brassica* cultivées. Les trois espèces *B. oleracea*, *B. nigra* et *B. rapa* sont originaires d'Europe, d'Asie et de l'Afrique du Nord. Elles se sont hybridées en *B. carinata*, *B. juncea* et *B. napus*. Dixon, 2006.

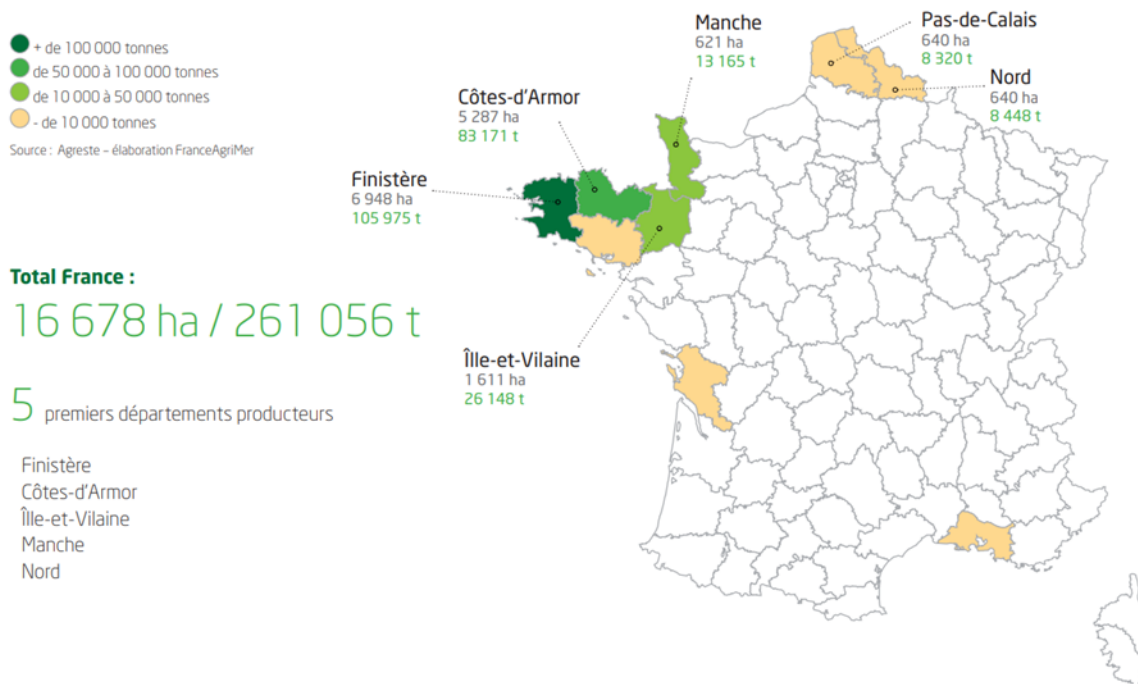


Figure 1.13. Quantité et surfaces cultivées de choux-fleurs en France, par région en 2018. La majorité de la production française de choux-fleurs provient de Bretagne. FranceAgriMer, 2018.

Même si tous les mécanismes d'action de ces effecteurs ne sont pas connus, on sait qu'ils peuvent affecter l'intégrité de la membrane plasmique des cellules végétales, ou bien qu'ils manipulent l'osmolarité de l'apoplaste pour y attirer de l'eau au bénéfice des bactéries (Aung et al., 2018). Ainsi, l'établissement d'un apoplaste humide par les bactéries pathogènes apparaît comme une étape importante de l'infection. Un apoplaste aqueux pourrait faciliter le flux de nutriments vers les bactéries, favoriser la diffusion des bactéries dans l'hôte ou affecter les défenses de l'hôte (Xin et al., 2016).

Partie 4. *Xcc/Brassica* : Un pathosystème d'importance agronomique et académique

4. 1. Les hôtes : Brassica

Le genre *Brassica* appartient à la famille des Brassicacées et regroupe 37 espèces, dont six espèces principales sont cultivées dans le monde entier pour notre alimentation et celle des animaux, l'industrie des huiles ou encore pour leurs qualités ornementales. Les espèces sauvages ont évolué pour survivre dans des climats inhospitaliers et résistent naturellement à la sécheresse, la chaleur ou la forte salinité (Dixon, 2006). Les populations naturelles (et probablement les ancêtres des espèces actuellement cultivées) de *B. oleracea* L. évoluent sur les côtes froides et humides rocailleuses d'Europe. Elles ont été croisées et sélectionnées par l'homme pour donner des variétés aussi diverses que les choux, les choux-fleurs et brocolis, et les choux kale. L'espèce *B. nigra* (L.) W.D.J Koch est annuelle et originaire des côtes rocailleuses de Méditerranée alors que *B. rapa* L. vient des hauts plateaux du croissant fertile (**Figure 1.12**). Ces trois espèces se sont hybridées naturellement et par l'entreprise de l'agriculture à plusieurs reprises (Dixon, 2006; Cartea et al., 2011), pour donner trois espèces hybrides qui ont conservé les génomes des deux parents diploïdes, ce qui fait d'elles des amphidiploïdes. *B. carinata* A. Braun est cultivée en Ethiopie et au Kenya, *B. juncea* (L.) Czern est très répandu en Asie et *B. napus* L. est originaire du nord de l'Europe (UK, Danemark, Suède).

Pour comprendre l'importance des *Brassica*, et notamment de *B. oleracea*, voici des chiffres récents de leur production : en France, 235 000 tonnes de chou-fleur ont été produites en 2020, ce qui représente une diminution de 40% en 20 ans (Agreste, 2021). Cette production recouvre quelques 15 000 hectares, majoritairement situées en Bretagne, dans les départements du Finistère et des Côtes d'Armor (**Figure 1.13**, FranceAgriMer, 2018). Dans le monde, la production de chou-fleur et de brocoli s'élève à 24 millions de tonnes en 2020, la Chine étant

Tableau 1.1. Les *Brassica* cultivées et leurs principales maladies. Lv et al., 2020

Species	Genome	Representative crops	Main diseases
<i>B. rapa</i>	AA	Chinese cabbage, turnip, pak choi, caixin	Downy mildew, TuMV, clubroot, soft rot
<i>B. nigra</i>	BB	Black mustard	Black rot, leaf spot, blackleg, TuMV
<i>B. oleracea</i>	CC	Cabbage, broccoli, cauliflower, kale, brussels sprouts	Black rot, <i>Fusarium</i> wilt, clubroot, TuMV
<i>B. napus</i>	AACC	Oilseed rape, canola, swede (rutabaga)	Clubroot, blackleg, stem rot, TuMV
<i>B. juncea</i>	AABB	Indian mustard, leaf mustard	Blackleg, white rust, stem rot, downy mildew
<i>B. carinata</i>	BBCC	Ethiopian mustard	Black rot, TuMV

le premier contributeur avec 9,6 millions de tonnes (+ 378% en 20 ans, FAOSTAT, 2020). Les pays d'Asie totalisent 78,6 % de la production mondiale de chou-fleur et brocoli et cette part augmente avec leur croissance économique et démographique.

La production des *Brassica* est affectée par des insectes ravageurs comme la piéride du chou, mais aussi par un ensemble de maladies provoquées par différents agents pathogènes comme des bactéries, des virus, des champignons ou des nématodes (**Tableau 1.1**). *B. oleracea* peut être atteint de différentes maladies comme la hernie du chou, la jaunisse fusarienne du chou, la mosaïque du navet ou encore la nervation noire des Brassicacées (Lv et al., 2020). Cette dernière maladie est particulièrement étudiée (Mansfield et al., 2012; Vicente and Holub, 2013), pour son intérêt académique, agronomique et économique.

4. 2. Découverte de la maladie de la nervation noire

La première description d'une bactériose sur chou a été faite en 1890 (Garman, 1892), où l'intérieur des têtes de choux était pourri. En 1895, le Professeur Russel de l'université du Wisconsin est appelé pour examiner des champs de choux dévastés par une maladie inconnue. Russel estime que la maladie est celle de la nervation noire des Brassicacées, ou Crucifères à l'époque (Russell, 1898), provoquée par la bactérie *Bacillus campestris*, récemment décrite par le Professeur Pammel sur des rutabagas dans l'Iowa voisin (Williams, 1980). Russel observe que la bactérie infecte les plantes en entrant par des « water-pores ». Il n'y a pas chiffres exacts sur l'impact de la nervation noire sur la production de choux, mais depuis la découverte de cette maladie, la littérature s'accorde sur le fait que la perte de rendement peut être élevée (Garman, 1892; Russell, 1898; Williams, 1980; Alvarez, 2000; Bhat et al., 2010; Singh et al., 2011), notamment dans des conditions climatiques chaudes et humides, et ce même aux stades précoces de développement des jeunes plants (Vega-Álvarez et al., 2021).

4. 3. L'organisme pathogène : *Xcc*

Le genre *Xanthomonas* (du grec ξανθός *xanthós*, « jaune » et μονάς *monás* « unité ») regroupe des bactéries de type Gram-négatif, qui synthétisent notamment un pigment jaune, la xanthomonadine, et un polysaccharide prisé dans l'industrie agro-alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et pétrolière pour sa texture : la gomme de xanthane. Les *Xanthomonas* sont des organismes aérobie obligatoire et ont des conditions de croissance optimale entre 25 et 30°C (d'après Bradbury 1984 dans An et al., 2020). De nombreuses espèces de *Xanthomonas* sont associées aux plantes et la plupart sont collectivement capables de provoquer des maladies sur quelques 400 espèces de plantes, posant un problème économique important pour les espèces

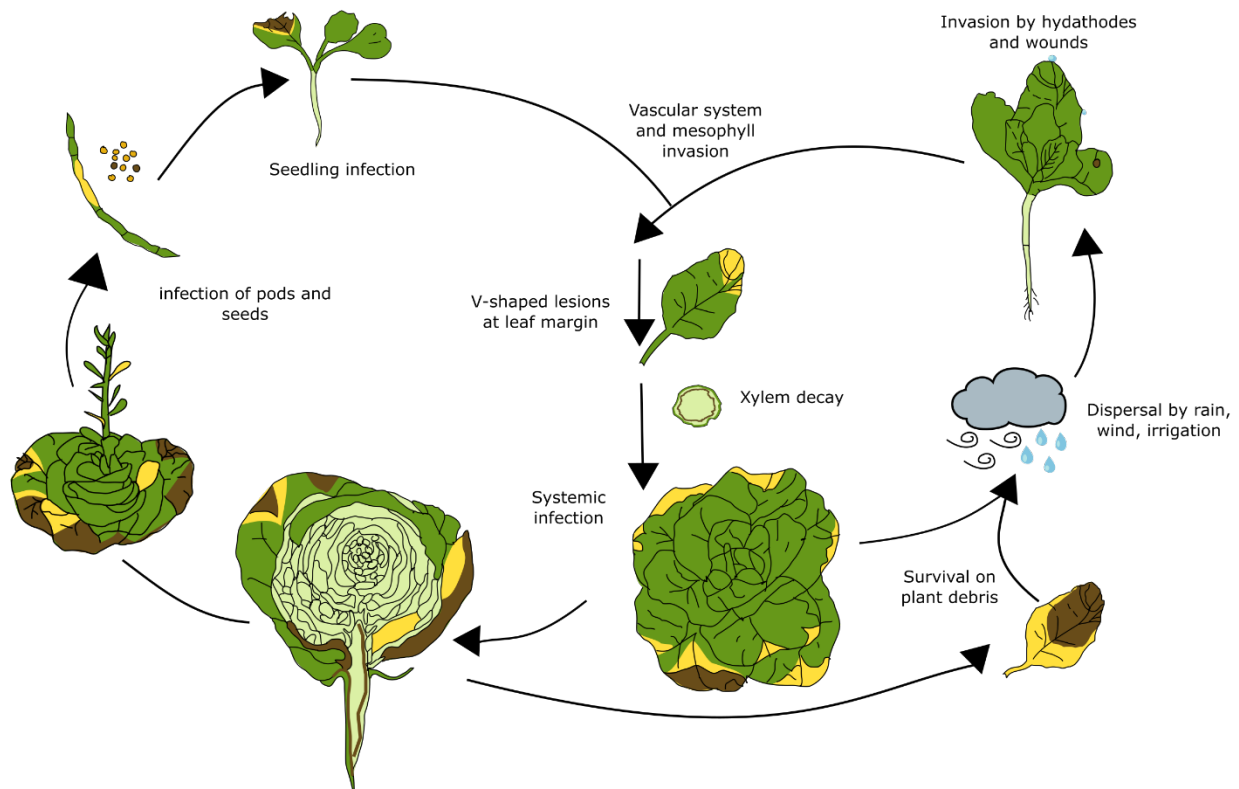


Figure 1.14. Cycle infectieux de *Xcc* sur *Brassica oleracea*. *Xcc* est dispersée par le vent, la pluie ou l'irrigation des cultures. Elle entre dans la plante par les hydathodes ou des blessures. *Xcc* va infecter le système vasculaire et le mésophylle et provoquer des symptômes de chlorose et de nécrose en forme de « V ». Par le système vasculaire, qui est nécrosé par *Xcc*, la bactérie envahit la plante de façon systémique. Cela signifie que *Xcc* peut infecter la plante entière, dont les organes floraux. De cette façon, les graines sont contaminées et les jeunes plants eux aussi contaminés vont transmettre *Xcc* à de nouvelles plantes. *Xcc* est aussi capable de survivre sur des débris de culture avant de coloniser un nouvel hôte. Adapté d'Alvarez, 2000, et An *et al.*, 2019.

cultivées telles que le riz, les choux, les tomates, les haricots, les agrumes, les bananiers ou les poivrons (Ryan et al., 2011). *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* (*Xcc*), d'abord nommée *Bacillus campestris* (Pammel 1895), est responsable de la maladie de la nervation noire sur de nombreuses espèces de la famille des Brassicacées.

Le cycle de vie de *Xcc* montre sa capacité à s'adapter à plusieurs milieux aux conditions environnementales et nutritionnelles variées (**Figure 1.14**). *Xcc* est capable de survivre sur des débris de culture et des adventices avant de coloniser un hôte. La bactérie peut aussi être dispersée par le vent, la pluie, l'irrigation des cultures et les graines. Sur son hôte, *Xcc* est d'abord épiphyte (Vicente and Holub, 2013). Elle entre dans la plante par les hydathodes ou des blessures. Les hydathodes offrent une voie directe vers le système vasculaire de la plante. *Xcc* se multiplie dans le mésophylle autour des vaisseaux du xylème et provoque une chlorose puis une nécrose des tissus, formant des symptômes en « V » typiques de la maladie qui partent des bordures des feuilles (**Figure 1.15A-C**). Grâce au système vasculaire, *Xcc* progresse dans la plante de façon systémique : les veines infectées se nécrosent (**Figure 1.15D-E**) ce qui donne son nom à la maladie. La bactérie peut donc se propager dans toute la plante et atteindre les organes floraux : les graines ainsi infectées donnent des plantules contaminées qui peuvent à nouveau transmettre *Xcc* à de nouvelles plantes.

4. 4. Méthodes de lutte contre la nervation noire

La contamination des cultures des Brassicacées par la nervation noire est causée principalement par des graines contaminées ou des plantules issues de graines contaminées transplantées en champ (Krauthausen et al., 2011). Quelques années après la découverte de la maladie de la nervation noire, une méthode de traitement à l'eau chaude des graines de Brassicacées était déjà mise en place (Walker, 1923; Clayton, 1924).

D'après plusieurs études, *Xcc* est capable de survivre dans le sol au moins deux ans sur des débris de culture (Strandberg, 1977; Kocks et al., 1998; Gazdik et al., 2021). De plus, les adventices des champs de Brassicacées infectés peuvent servir de réservoir secondaire à la bactérie : des souches ont été isolées sur des Brassicacées non cultivées (comme la Capselle bourse-à-pasteur) et d'autres adventices n'étant pas de la famille des Brassicacées (Krauthausen et al., 2011). Les méthodes de lutte contre *Xcc* reposent donc sur des pratiques culturales de prévention, en pratiquant la rotation culturale, en contrôlant les populations d'adventices dans les alentours des champs et en nettoyant les débris de cultures contaminées (An et al., 2020). La réglementation de l'Association internationale d'essais de semences (International Seed

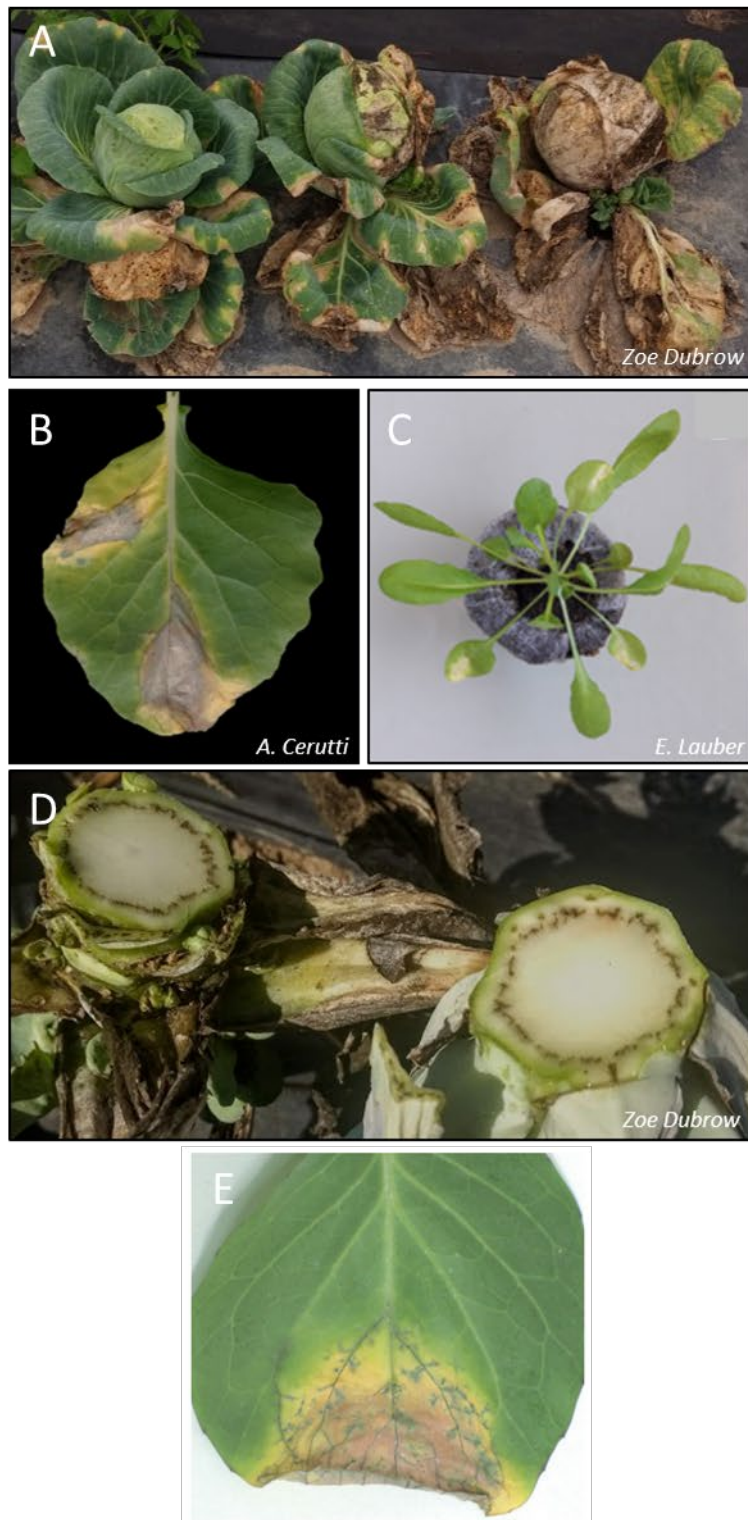


Figure 1.15. Illustration des symptômes provoqués par *Xcc* sur différentes Brassicacées. (A), (B), (C) Les symptômes caractéristiques de la nervation noire des Brassicacées sont des chloroses qui dégénèrent en nécroses. Les symptômes partent d'un hydathodes à la bordure des feuilles et suivent les nervures en formant un « V ». (D), (E) *Xcc* progresse dans toute la plante par le système vasculaire, qui nécrose. (A) et (D) *Brassica oleracea* var. *oleracea* (Z. Dubrow); (B) Feuille de *Brassica oleracea* var *botrytis* cv Clovis (A. Cerutti); (C) *Arabidopsis thaliana* (E. Lauber); (E) *Brassica oleracea*, Mansfield *et al.*, 2012.

Testing Association, ISTA) exige que les lots de graines exportées contiennent moins d'une graine sur 30 000 contaminée par *Xcc*, car 3 graines infectées sur 10 000 suffisent à démarrer une épidémie en champ (Celetti and Callow, 2011; Asma et al., 2014). Utiliser des graines et des plantules certifiées sans bactéries garantit la qualité sanitaire du matériel végétal et permet de lutter efficacement contre *Xcc*.

L'utilisation de variétés résistantes⁴ est un autre moyen de lutte efficace contre les agents pathogènes. Chez *B. oleracea*, seules des variétés tolérantes⁴ à *Xcc* sont connues. Différents gènes de résistance majeurs ont été clonés chez d'autres espèces de *Brassica*, ce qui font d'elles des sources de résistance à introduire chez *B. oleracea* par croisement ou par transformation génétique (Taylor et al., 2002; Lv et al., 2020).

Partie 5. Les hydathodes

5. 1. Hydathodes (Quick Guide)

Contexte

Les hydathodes sont des organes méconnus et peu étudiés. Nous avons eu l'opportunité de rédiger un « quick guide » pour le journal *Current Biology*. Il s'agit de faire une introduction très succincte à un sujet de biologie, ici les hydathodes, pour rendre le sujet accessible à un public aussi large que possible. J'ai réalisé la figure et rédigé le manuscrit. Ont aussi participé à la rédaction et corrigé le manuscrit : Patrick Laufs en tant que spécialiste du développement des hydathodes et Laurent Noël et Jean-Marc Routaboul, spécialistes immunité et physiologie des hydathodes.

⁴ Les plantes résistantes sont capables de limiter la multiplication de l'agent pathogène, alors que les plantes tolérantes peuvent réduire l'impact délétère de l'infection sans affecter la capacité à se multiplier de l'agresseur (Pagán and García-Arenal, 2020).

loss of biodiversity, new diseases, and predators are parts of a complex equation that reflects the way humans are transforming the world in an irresponsible way. It is impossible to study bees and not become sensitized by their dramatic fate. Therefore, I consider it important to bring to light facts and evidence showing if and how these expansive environmental changes affect behavior, neural signaling, and the molecular cascades underlying behaviors that are essential for survival. Disseminating these findings is also essential.

Any strong views on social media and science? Social media is an important communication channel to advertise science and make it accessible to broad segments of society. Yet, in no case should these platforms replace peer review and scientific standards. I have a very active Twitter account and use it to disseminate information about findings that I like or consider relevant. In all cases, they are verified, published facts, and this is important because everyone knows that social media can also serve to spread fake news and unverified information. We live in a time in which it would be naive to deny the importance of social media; the challenge is to find the compromise between rigorous scientific content and concise, readable messages.

What do you think are the biggest problems science as a whole is facing today? Beyond domain-specific questions, an essential problem for science in the future is that of the preservation of our environment. The case of the massive mortality of honey bee colonies mentioned above is just a symptom of a more complex problem that is threatening all living species, including our own. Exposing the facts and finding solutions to this problem are fundamental challenges for science now and will be in the future. The answers will come from the joint work and convergence of multiple disciplines, each one tackling the problem from its own perspective and with its specific tools. Creating gateways that facilitate practical interpretations of these findings and implementing them into global solutions will be essential.

Research Center on Animal Cognition, Center of Integrative Biology, CNRS, Paul Sabatier University — Toulouse III, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9, France. E-mail: martin.giurfa@univ-tlse3.fr

Quick guide Hydathodes

Caroline Bellenot¹,
Jean-Marc Routaboul¹, Patrick Laufs²,
and Laurent D. Noël^{1,*}

What are hydathodes? Hydathodes are plant organs that mediate the release of guttation droplets (Figure 1A) and are present on leaves of all vascular plants. So-called epithemal or passive hydathodes share a common anatomy consisting of an inner tissue composed of small, loosely connected cells forming the epithem, terminal endings of the plant xylem vasculature reaching the epithem, and an epidermal surface layer with water pores, allowing the guttation of xylem-derived fluid (Figure 1B–D). Hydathodes were first observed in 1877 by the German botanist Anton de Bary and were named water pores. The Austrian botanist Gottlieb Haberlandt later proposed the name hydathode in 1897 from the Greek ‘hyda’ (water) and ‘hodos’ (way). Surprisingly enough, the term hydathode has almost disappeared from modern plant anatomy and physiology textbooks.

What is guttation? Guttation literally means ‘formation of droplets’. In plants, the phrase ‘guttation’ initially referred

to any liquid discharge occurring in natural conditions from various organs including trichomes, glands, root apices or hydathodes. In the 1950s, the term guttation was then restricted to drops forming at leaf tips and leaf margin serrations. Guttation is commonly observed on leaf margins at dawn or in moist conditions. Guttation should not be confused with dew, which is observed when atmospheric water condenses on plant surfaces. Guttation fluid is derived from, but different to, xylem sap — a fluid produced by roots to provide water and minerals to the shoot.

Where and how do hydathodes form? Hydathodes are usually located at the tips and margins of leaves and leaflets. They are best visualized in cleared leaves by the presence of a branched and hypertrophied xylem (Figure 1C). Sites of hydathode formation are specified early in leaf development and are associated with a strong auxin response, suggesting that the distribution of this hormone may contribute to hydathode specification and formation. In addition, several mutants with modified leaf shapes (such as leaf-blade expansion or serrations in particular) also have fewer hydathodes. In such cases, a reduction in hydathode number is likely an indirect consequence of the modified leaf morphology. To date, no specific determinant controlling

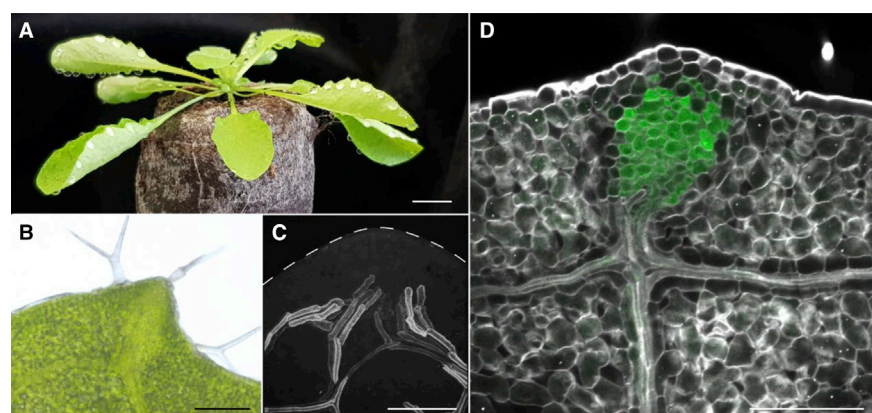
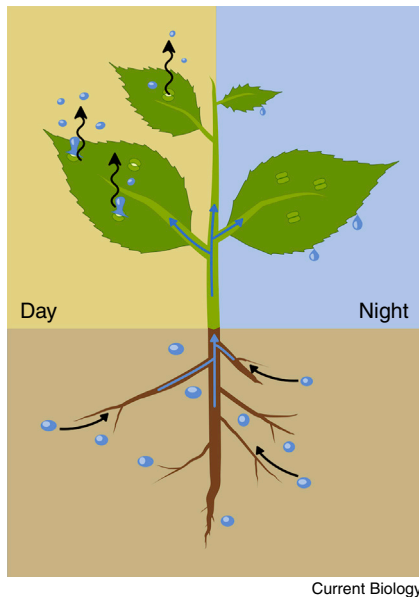


Figure 1. Hydathodes mediate guttation of root- and xylem-derived fluid.

(A) Guttation droplets are visible at the margin of *Arabidopsis thaliana* leaves. Scale bar: 1 cm. (B) *Arabidopsis* hydathode observed under bright-field microscopy. The hydathode is slightly chlorotic and located at the leaf-margin serration. Trichomes are present on the entire leaf surface and margins. Scale bar: 200 μ m. (C) 3D observation by Nomarsky microscopy of xylem vessels inside a clarified *Arabidopsis* hydathode. Dashed line indicates the leaf margin. Scale bar: 100 μ m. (D) Optical section through an *Arabidopsis* hydathode (confocal microscopy). The epithem is depicted by strong GFP expression (green), while cell-wall staining reveals the cellular organization (gray). Note that the epithem is formed by smaller cells than the neighboring mesophyll cells and that it is connected to the vascular system. Scale bar: 100 μ m. (Image credits: (A) Matthieu Arlat, (B) Jean-Marc Routaboul, (C) Alain Jauneau and Aude Cerutti, and (D) Damien Vasselon.)





Current Biology

Figure 2. Schematic representation of water flow inside the plant leading to guttation at hydathodes.

Root pressure moves water absorbed in the soil to the shoot. During the day, transpiration in the leaves promotes root-to-shoot water flow (left panel). When the transpiration rate drops (such as at night, or under high atmospheric humidity or high CO_2), excess water pressure is released at hydathodes to prevent flooding of the leaf tissues (right panel).

hydathode formation or differentiation is known.

Are there differences between hydathode pores and stomata? At first glance, hydathode pores look like large, wide-open stomata, consistent with a common developmental program for these two cell types. However, hydathode pores are specialized in the secretion of fluid derived from xylem sap, while stomata regulate the exchange of gases (water vapor, CO_2 and O_2). In contrast to early findings, the opening of hydathode pores has been found to be responsive to environmental cues, such as light or the hormone abscisic acid, similar to stomata. However, unlike stomata, hydathode pores seem unable to fully close, possibly due to the size differences between these two cell types.

What are the key physiological functions provided by hydathodes? It is intriguing that hydathodes are present in all vascular plants, including aquatic ones. Their presence in aquatic plants suggests that water supply to the shoot

is not the only function of hydathodes. Guttation is known to be primarily driven by root pressure, a force that drives the transport of xylem sap from roots to shoots. When roots deliver more xylem sap to the shoot than the leaves can evaporate, guttation is observed (Figure 2). In this scenario, hydathodes would mostly behave like pressure valves and prevent the flooding of the leaf mesophyll. Flooding is known to be deleterious for plant physiology as it hampers gas exchange needed for photosynthesis and respiration within inner tissues of leaves. Because hydathodes would enable the maintenance of xylem sap flow towards the shoot, hydathodes could also be instrumental in ensuring continuous and reliable mineral nutrition for shoots under the changing environmental conditions encountered by plants.

What is happening to the xylem sap inside hydathodes? Transcriptomic analyses identified over 100 genes preferentially expressed in hydathodes compared to neighboring leaf tissues. These genes encode proteins related to biotic stress responses, auxin metabolism, cell-wall degradation and membrane transport. These transcriptomic analyses imply that this organ possesses its own physiological identity and also suggest that hydathode epithem cells potentially modify the composition of the guttation fluid. This fluid is composed of sugars, amino acids, proteins, ions, vitamins and hormones, but at lower concentrations than in xylem sap originating from the roots. Genes upregulated in hydathodes that encode membrane transporters for amino acids, sugar or ions, such as NO_3^- , PO_4^- , SO_4^- or K^+ , could mediate the absorption of xylem-sap metabolites that have not been used by the leaf, but could also mediate the release of toxic compounds such as boron, nanoparticles or excess Ca^{2+} . In this respect, hydathodes act similarly to animal kidneys, which prevent loss of valuable nutrients while ensuring the disposal of waste into urine.

Are hydathodes major organs for auxin metabolism? Auxins are plant hormones that orchestrate many developmental processes, such as regulation of growth and differentiation, and responses to environmental cues, such as temperature and microbes. Auxin is generally biosynthesized in young aerial tissues

and roots. Numerous genes important for auxin metabolism and responses are also highly expressed in hydathodes, suggesting that these organs may be biologically relevant for auxin biosynthesis and signaling. The fate and role of such localized auxin biosynthesis in mature hydathodes is so far largely unexplored.

Can pathogens use hydathodes to infect plants? Hydathode pores connect the outer leaf surface to inner tissue and are open to infection by several bacterial pathogens. Compared to stomata, which are well known to close upon perception of bacteria, hydathode pores fail to respond to pathogen elicitors and consequently do not block pathogen entry inside hydathodes. Initial colonization of the epithem leads to subsequent systemic vascular infections. The fact that only a handful of pathogens belonging to the genera *Xanthomonas* and *Clavibacter* are known to use this infection route suggests either that potent post-invasive immune responses occur inside hydathodes and leaf vasculature or that very few microbes can adapt to an environment with such scarce nutritional resources.

Where can I find out more?

- Cerutti, A., Jauneau, A., Auriac, M.C., Lauber, E., Martinez, Y., Chiarenza, S., Leonhardt, N., Berthomé, R., and Noël, L.D. (2017). Immunity at cauliflower hydathodes controls systemic infection by *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *Plant Physiol.* 174, 700–716.
- Cerutti, A., Jauneau, A., Laufs, P., Leonhardt, N., Schattat, M.H., Berthomé, R., Routaboul, J.M., and Noël, L.D. (2019). Mangroves in the leaves: Anatomy, physiology, and immunity of epithemal hydathodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 57, 91–116.
- Haberlandt, G. (1897). Zur Kenntnis der Hydathoden. *Jb. F. Wiss. Bot.* 30, 511–528.
- Jauneau, A., Cerutti, A., Auriac, M.C., and Noël, L.D. (2020). Anatomy of leaf apical hydathodes in four monocotyledon plants of economic and academic relevance. *PLoS One* 15, e0232566.
- Nagai, M., Ohnishi, M., Uehara, T., Yamagami, M., Miura, E., Kamakura, M., Kitamura, A., Sakaguchi, S., Sakamoto, W., Shimmen, T., et al. (2013). Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to tissue ion levels along primary leaves of barley. *Plant Cell. Environ.* 36, 1826–1837.
- Pilot, G., Stransky, H., Bushy, D.F., Pratelli, R., Ludewig, U., Wingate, V.P.M., and Frommer, W.B. (2004). Overexpression of *GLUTAMINE DUMP1* leads to hypersecretion of glutamine from hydathodes of *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell.* 16, 1827–1840.
- Yagi, H., Nagano, A.J., Kim, J., Tamura, K., Mochizuki, N., Nagatani, A., Matsushita, T., and Shimada, T. (2021). Fluorescent protein-based imaging and tissue-specific RNA-seq analysis of *Arabidopsis* hydathodes. *J. Exp. Bot.* 72, 1260–1270.

¹Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes-Environnement (LIPME), Université de Toulouse, INRAE, CNRS, Castanet-Tolosan, France. ²Institut Jean-Pierre Bourgin (JPB), Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Versailles, France. *E-mail: laurent.noel@inrae.fr

5. 2. Petite histoire des hydathodes

L'étudiante en thèse qui m'a précédée, Aude Cerutti, a démarré l'étude des hydathodes dans notre équipe. En collaboration avec des partenaires, elle a publié une revue détaillée sur les hydathodes : « Mangroves in the leaves » (Cerutti et al., 2019). Pour ne pas paraphraser son travail, je vais ici faire un résumé de ce qu'il me paraît important de noter sur les hydathodes, et approfondir les points d'intérêt pour mon travail. Après un historique de la découverte des hydathodes et de l'évolution de la terminologie, je décrirai succinctement ce qui est connu de leur rôle et de leur formation.

5. 2. 1. De l'importance de la terminologie

Les hydathodes sont des organes des parties aériennes des plantes terrestres qui se retrouvent chez toutes les espèces vasculaires (Cerutti et al., 2019). La première description des hydathodes remonte au XIXe siècle, vers 1870, où sont décrits des « *water-pores* » et des « *water-stomata* ». À l'époque, les botanistes décrivent des stomates qui sont capables de sécréter des gouttes d'eau. Contrairement aux stomates, ils remarquent que ces pores sont – parfois – remplis d'eau et que leurs cellules de garde semblent immobiles. De plus, ces « *water-pores* » sont toujours retrouvés à l'extrémité de vaisseaux conducteurs (de Bary, 1884, traduction de l'allemand, 1877).

Le terme « hydathode » apparaît pour la première fois en 1895 avec le botaniste autrichien Gottlieb Haberlandt (dans un rapport de réunion de l'Académie des sciences de Vienne, Etudes anatomo-physiologiques sur les feuilles tropicales II, sur les organes sécréteurs et absorbants d'eau (Haberlandt, 1895)), nom formé à partir du grec *húdōr* : eau et *hodos* : route, chemin. Il n'est pas adopté directement, puisqu'on retrouve des références à des pores aquifères jusqu'à la fin du XXe (Williams, 1980). À l'époque le terme désigne un ensemble de différents types de cellules et organes capables de produire des gouttes (d'eau, de sève, d'huile...). Dans son ouvrage de 1895, Haberlandt classe tous ces organes en deux catégories : les hydathodes actifs ou épidermiques, qui exsudent activement de l'eau et des sels, par l'intermédiaire notamment de poils et de glandes (Haberlandt, 1895; Lepeschkin, 1923; Fahn, 1988), et les hydathodes passifs (ou épithémaux). Ces derniers sont ce que je considérerai par la suite comme les hydathodes au sens strict.

Les hydathodes sont donc des organes où a lieu la guttation. Présents chez toutes les plantes ligneuses, des fougères aux angiospermes (Cerutti et al., 2019), ils se situent à la bordure des feuilles, et parfois dans le limbe (Belin-Depoux, 1989). Les hydathodes contiennent

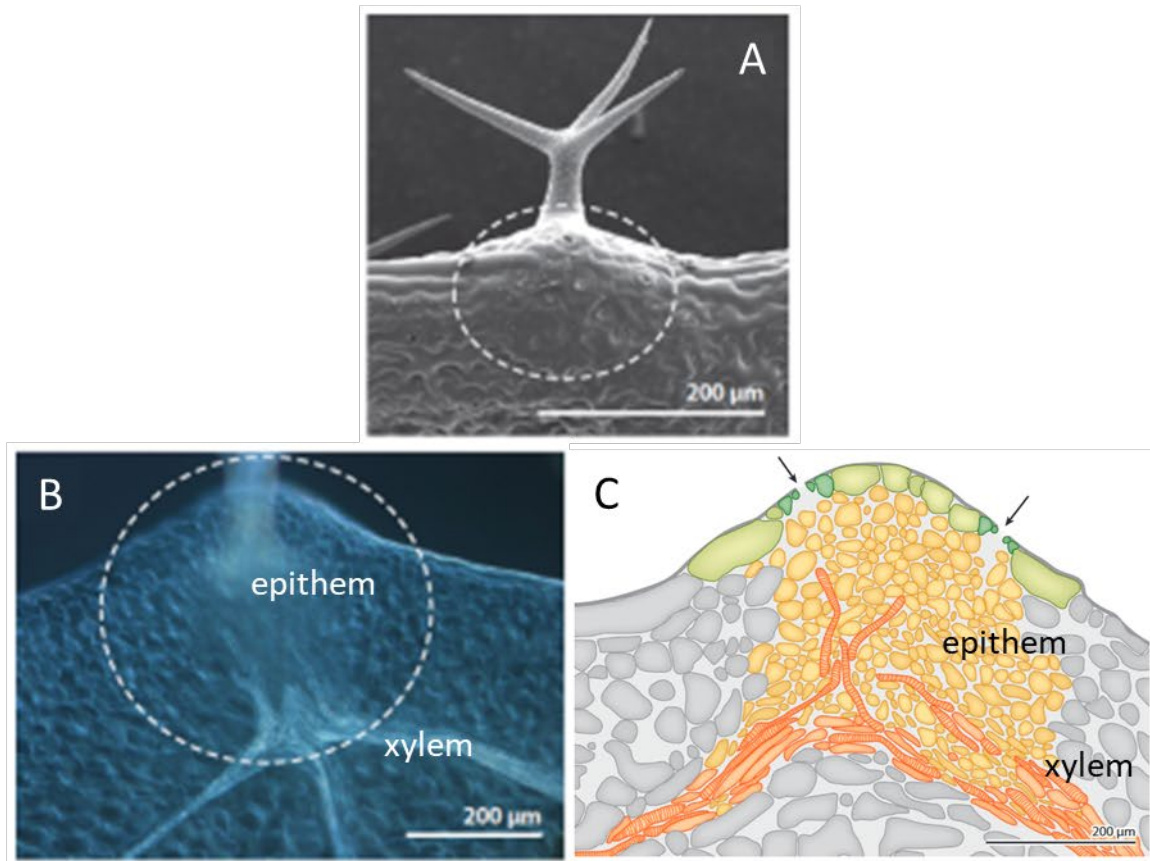


Figure 1.16. Anatomie des hydathodes d'*Arabidopsis thaliana*. (A) A la surface des feuilles, les pores de l'hydathode (C, vert foncé) traversent l'épiderme (C, vert clair). (B, C) Dans l'hydathode, l'épithème (A, zone entourée de pointillées, B, cellules en jaune) est relié au système vasculaire de la feuille par des vaisseaux de xylème (B, orange). Adapté de Cerutti et al., 2019

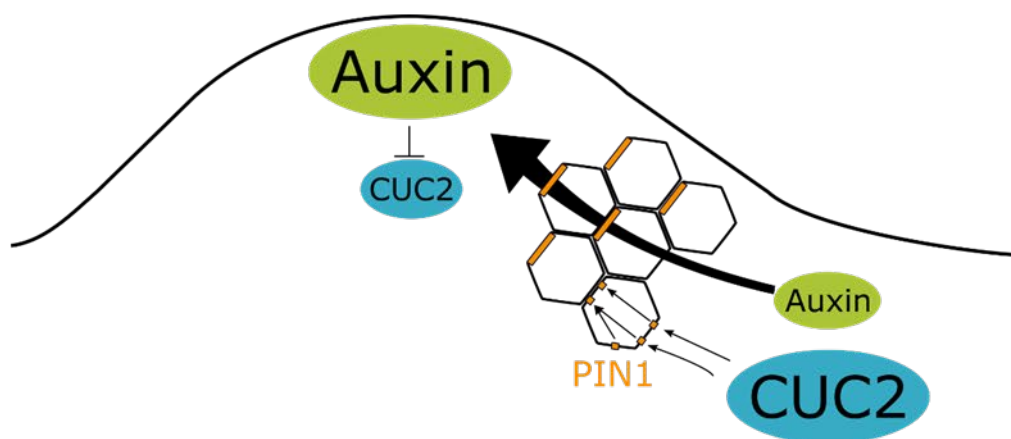


Figure 1.17. Régulation de la formation de l'indentation des feuilles par CUC2, l'auxine et PIN1 chez *Arabidopsis thaliana*. Le facteur de transcription CUC2 (bleu) provoque la polarisation du transporteur d'auxine PIN1 (orange) dans la membrane des cellules. En conséquence, les flux d'auxine (vert) convergent et l'hormone s'accumule. De son côté, l'auxine réprime l'expression de CUC2. Cela signifie que des alternances de zones d'accumulation d'auxine et de CUC2 se forment. Les zones de forte concentration en auxine à la marge des feuilles sont les zones de formation des dents et les indentations sont les zones de concentration de CUC2.

l'épithème, un tissu constitué de petites cellules espacées les unes des autres. L'épithème est un tissu spécifique des hydathodes, bien que selon les espèces, il puisse être atrophié ou absent (Perrin, 1972; Cerutti et al., 2019; Jauneau et al., 2020). Donné par le botaniste Allemand Anton de Bary, il est tiré du grec ancien ἐπίθεμα, *épithema*, « ce qu'on pose dessus », (en allemand « der deckel », le couvercle) (de Bary, 1877). Les hydathodes présentent des ouvertures à travers l'épiderme, qui sont des pores constitués de deux cellules de garde ouvertes sur des chambres situées dans l'épithème. Les hydathodes sont caractérisés par la convergence de nombreux vaisseaux du xylème (des trachéides) qui se terminent dans l'épithème, s'il est présent, ou sous les pores des hydathodes (Jauneau et al., 2020, **Figure 1.16**).

Il est à noter que dans la littérature, le terme « hydathode » est abusivement employé pour désigner à la fois l'organe entier et les pores aquifères. Dans un souci de compréhension je ferai la distinction et emploierai hydathode uniquement pour désigner l'organe, et préciserai quand je fais référence aux pores des hydathodes.

5. 2. 2. Ce que l'on sait de la formation des hydathodes

Les hydathodes sont généralement situés à la marge des feuilles, dans le domaine intermédiaire (middle domaine). Une fois la différenciation entre les domaines adaxial (face supérieure) et abaxial (face inférieure) des feuilles faite, le domaine intermédiaire est mis en place, grâce à l'expression de *PRS* (PREsed flower) et *WOX1* (Wuschel-related homeobOX1) (Nakata et al., 2012), et le limbe se développe. Les tissus spécifiques de la marge des feuilles, dont les hydathodes, peuvent alors se former.

La formation des hydathodes est intimement liée à celle de la dentelure des feuilles chez *A. thaliana* (Tsukaya and Uchimiya, 1997), elle-même dépendant de l'hormone auxine. La formation de la dentelure est contrôlée par le transporteur d'auxine *PINI* (PIN-formed1) et le facteur de transcription *CUC2* (CUp-shaped Cotyledon2) (Nikovics et al., 2006; Bilsborough et al., 2011; Hasson et al., 2011). *PINI* a une localisation polarisée dans la membrane des cellules, ce qui permet d'établir des gradients d'auxine. Dans ce contexte, *CUC2* promeut la réorientation des transporteurs *PINI* et permet la convergence des flux d'auxine, entraînant son accumulation (Bilsborough et al., 2011). Par ailleurs, l'auxine réprime l'expression de *CUC2*. Cela signifie que les interactions entre *PINI*, *CUC2* et l'auxine génèrent des zones d'accumulation d'auxine et de *CUC2* alternées (**Figure 1.17**). Les zones de fortes concentrations d'auxine à la marge des feuilles sont les zones de formation des dents et aussi

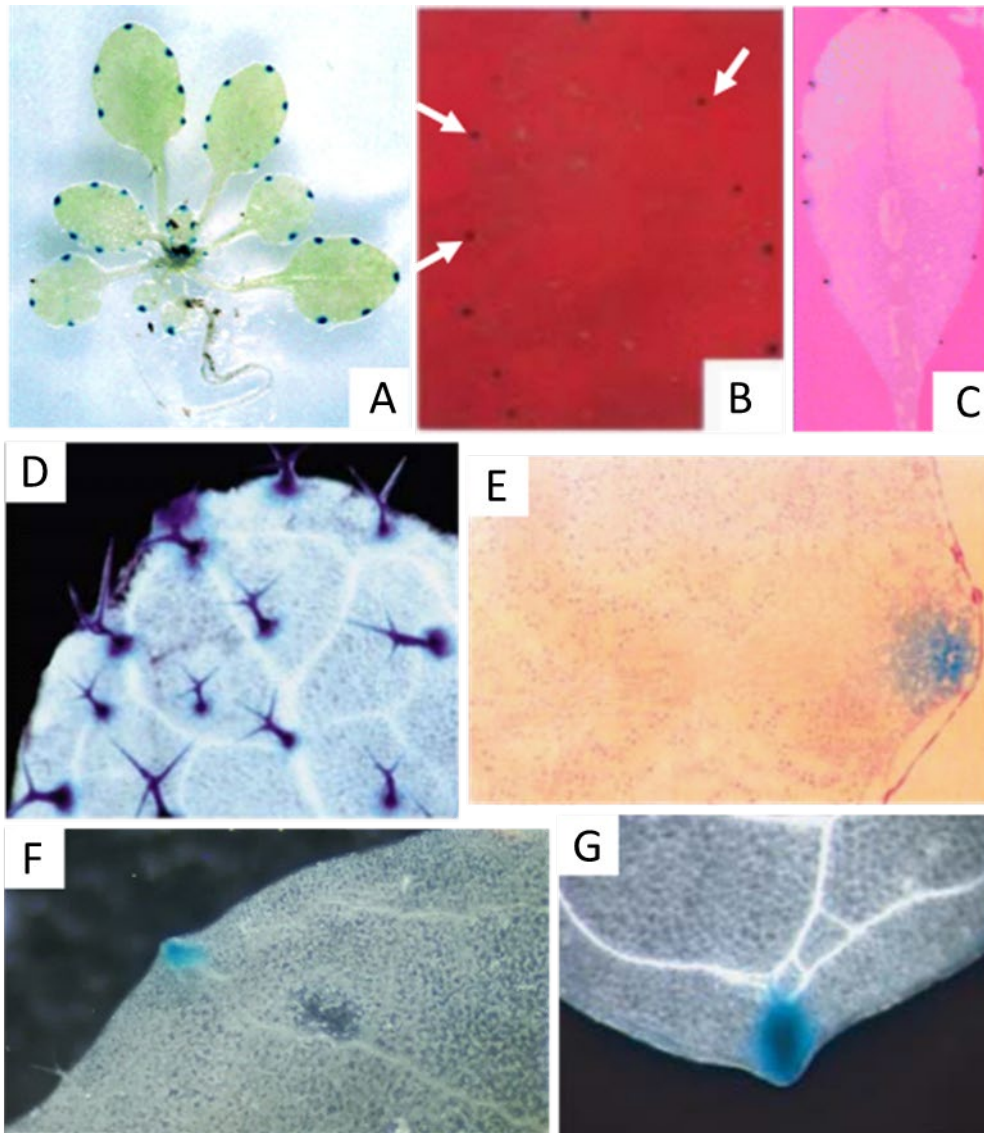


Figure 1.18. Localisation de l'expression de différents transporteurs dans les hydathodes d'*Arabidopsis thaliana* par fusion des promoteurs avec le reporteur *GUS*. (A) *PUP1* (Bürkle et al., 2003); (B) *KTI* (Lagarde et al., 1996); (C) *SULTR1;2* (Shibagaki et al., 2002); (D) *KCI* (Pilot et al., 2003); (E) *NRT2;1* (Naoza et al., 2003); (F) *PHT1;4* (C. Bellenot); (G) *GUDI* (Pilot et al., 2004).

des hydathodes, et les indentations sont les zones de concentration de *CUC2* (Bilsborough et al., 2011).

La différenciation des tissus spécifiques des hydathodes est encore méconnue, bien que quelques pistes existent : comme discuté plus haut, le transport de l'auxine est impliqué dans la formation des hydathodes, mais cette hormone est aussi synthétisée dans les hydathodes (Wang et al., 2011). Comme l'auxine fait partie des régulateurs de la formation du xylème, elle est importante pour la formation des vaisseaux du xylème qui se terminent dans l'hydathode (Cheng et al., 2006; Wang et al., 2011; Kondo et al., 2014; Ursache et al., 2014). Les pores des hydathodes et les stomates partagent des caractéristiques structurales, ainsi que des mécanismes de différenciation, comme le facteur de transcription *MUTE* (Pillitteri et al., 2008). Des divergences, notamment sur la régulation de l'espacement des deux types de pores, restent à expliquer (Pillitteri and Dong, 2013). Il est aussi curieux de noter que les mécanismes de régulation de la différenciation des pores des hydathodes sont partagés ou au moins connectés à ceux des trichomes (Torii, 2021).

5. 2. 3. Rôle et composition de la guttation

La guttation désigne le phénomène de rejet de liquide sous forme de goutte par les hydathodes. La guttation provient des vaisseaux du xylème et est provoquée par la poussée racinaire lorsqu'il y a peu de transpiration. Les rôles connus de la guttation sont de maintenir le flux d'eau ascendant dans les plantes et de protéger les tissus d'une accumulation d'eau dans l'apoplaste lorsque les stomates sont fermés (Feild et al., 2005; Shatil-Cohen and Moshelion, 2012).

La composition du fluide de guttation dépend entre autres de l'espèce considérée, du stade de développement ou encore des conditions environnementales. La guttation contient des minéraux, des acides aminés, des sucres, des protéines, des hormones et des vitamines (Cerutti et al., 2019). Beaucoup de transporteurs sont exprimés très spécifiquement dans les hydathodes, comme il est montré avec des fusions de reporteur GUS dans diverse études (**Figure 1.18**) : *KT1* (Lagarde et al., 1996) et *KC1* (Pilot et al., 2003) transportent du K^+ , *NRT2;1* du NO_3^- (Naoza et al., 2003), *SULTRI;2* du SO_4^{2-} (Shibagaki et al., 2002), *PUP1* transporte de la purine et de l'adénine (Bürkle et al., 2003), *GUDI* de la glutamine (Pilot et al., 2004) et *PHT1;4* du phosphate inorganique (Mudge et al., 2002; Misson et al., 2004). L'expression de ces transporteurs suggèrent que l'épithème tient un rôle de filtre entre la sève du xylème et le fluide de guttation, en réabsorbant les composés résiduels 'utiles', et peut même excréter des

composés toxiques. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le fluide de guttation est moins concentré en métabolites que la sève de xylème (Nagai et al., 2013). Si l'on prend l'exemple du phosphate inorganique (Pi) : il y a moins de Pi dans la guttation de l'orge que dans sa sève de xylème (Nagai et al., 2013) et le transporteur de Pi à haute affinité *PHT1;4* est exprimé exclusivement dans les hydathodes d'*A. thaliana* sans que la plante soit pourtant en carence (Misson et al., 2004). Ceci laisse supposer qu'il y a peu de Pi dans l'apoplaste de l'épithème ou dans le fluide de guttation. Sachant aussi que cet ion est essentiel à *Xcc* et que les transporteurs de Pi de *Xcc* sont requis et induits par l'infection dans les hydathodes de chou-fleur (Luneau et al., 2022b), il pourrait y avoir une compétition pour le Pi dans les hydathodes.

Dans sa thèse soutenue en 1972, Perrin observe que lorsque les conditions de guttation prennent fin, la disparition des gouttes est plus rapide que ce qui résulterait de la simple évaporation : une partie du liquide de guttation est vraisemblablement réabsorbé par les hydathodes. Le reste s'évapore ou bien s'écoule lorsque les gouttes atteignent un certain volume, lié aux propriétés hygroscopiques de la cuticule des plantes (Perrin, 1972). Dans tous les cas, le caractère aqueux des tissus hydathères est un point important pour l'entrée des bactéries dans les hydathodes. Elles peuvent entrer passivement grâce à la réabsorption de la guttation et facilement nager dans ce milieu liquide.

Il est clair que des analyses sur le métabolisme de l'épithème permettront de mieux comprendre le rôle des hydathodes dans la physiologie et de l'immunité des plantes.

5. 2. 4. Ce que l'on sait de l'immunité des hydathodes

Il existe plusieurs espèces de bactéries capables d'entrer dans leur hôte par les hydathodes. Dans le genre *Xanthomonas*, on retrouve *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, responsable de la pourriture noire des Brassicacées (Williams, 1980; Hugouvieux et al., 1998), *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* qui cause une bactériose des feuilles des Aracées (bacterial leaf blight aroids (Fukui et al., 1996a) et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Niño-Liu et al., 2006) qui provoque la maladie bactérienne du riz. Chez d'autres genres, il a aussi été observé une entrée des bactéries par les pores des hydathodes : *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Carlton et al., 1998) qui est responsable sur la tomate le chancre bactérien, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Yu et al., 2013), provoquant la tâche bactérienne sur la tomate et *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Gu et al., 2013), un agent pathogène humain responsable de la gastroentérite et la typhoïde. Il n'existe que peu ou pas de données sur des pathogènes fongiques capables de coloniser les plantes par leur hydathodes. Dans la

littérature, sont décrites majoritairement des évidences d'entrée par les stomates, mais très peu par les pores des hydathodes. Il est possible que si les champignons sont capables d'entrer par les stomates, les pores des hydathodes sont simplement pour eux une voie d'entrée moins fréquemment utilisée, puisqu'il y a moins de pores d'hydathodes que de stomates sur les feuilles. En effet, même si la densité de pores des hydathodes est semblable à celle des stomates (Cerutti et al., 2017), les pores des hydathodes ne sont présents qu'à la surface des hydathodes, alors que les stomates se trouvent sur toute la surface du limbe des feuilles.

Comme évidence d'immunité pré-invasive des hydathodes, Grunwald et al. ont détecté des protéines PR dans le fluide de guttation d'orge non infecté (Grunwald et al., 2003). En plus, une activité antimicrobienne du fluide de guttation de chou sur *Xcc* a été montrée *in vitro* (Gay and Tuzun, 2000). Chez *B. oleracea* L., il y a dix fois plus de peroxydases dans le fluide de guttation de variétés tolérantes que dans celui de variétés sensibles, et il y a aussi plus de peroxydase si les plantes ont été inoculées avec *Xcc* que si elles ne sont pas inoculées (Gay and Tuzun, 2000). Ceci suggère que dans les hydathodes, des défenses sont mises en place grâce à la signalisation ROS produite notamment par les peroxydases. Dans la même étude, un autre type de défense est mise en place dans les hydathodes : le dépôt de lignine est corrélé positivement à celui des peroxydases. Une autre étude montre que les hydathodes de *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. se nécrosent 48h après infection par une souche de *Xcc* dont le système de sécrétion de type III est muté (elle ne peut donc pas injecter d'effecteurs dans les cellules végétales), ce qui limite la croissance des bactéries (Cerutti et al., 2017). Avec la souche sauvage de *Xcc*, les hydathodes ne sont pas nécrosés, les bactéries se multiplient plus et après une dizaine de jours, les symptômes de la maladie apparaissent. Ceci indique bien que les hydathodes mettent en place des défenses immunitaires, efficaces contre des bactéries pathogènes, et que la suppression de ces défenses par le système de sécrétion de type III et les effecteurs de type III de *Xcc* est nécessaire à la réussite d'une infection (Luneau et al., 2022b).

En dehors des quelques défenses immunitaires citées précédemment, les pores des hydathodes, contrairement aux stomates, ne sont pas capables de se fermer totalement pour empêcher l'entrée des agents pathogènes (Cerutti et al., 2017). Par ailleurs, il suffit d'une seule bactérie présente dans une goutte de guttation pour démarrer l'infection d'un hydathode (Robeson et al., 1989). Ceci laisse penser que les hydathodes ne constituent pas une barrière physique, et que beaucoup d'agents pathogènes devraient pouvoir entrer par les pores des hydathodes, comme ils le feraient avec d'autres ouvertures comme les stomates ou des blessures. Il y a pourtant peu d'espèces connues qui sont capable d'entrer dans les hydathodes

et de les coloniser (Cerutti et al., 2019). Peut-être est-ce en raison de défenses immunitaires spécifiques aux hydathodes, ou bien parce qu'ils sont pauvres en nutriments. En tous les cas, il apparaît que les hydathodes sont un environnement distinctif, auquel peu de microorganismes sont adaptés. La question de l'adaptation des microorganismes aux hydathodes est intrigante, puisque malgré la similitude des pores des hydathodes avec les stomates, *Xcc* est incapable d'initier une infection à partir des stomates (Gluck-Thaler et al., 2020). L'adaptation aux hydathodes se ferait alors au détriment des autres modes d'infection des agents pathogènes, pour des raisons d'incompatibilité ou du coût du maintien des différentes stratégies, ce qui souligne la particularité des hydathodes.

Chapitre 2 : Projet de thèse

Les hydathodes sont des organes végétaux qui ont été peu étudiés jusqu'à récemment. Pourtant, comme il a été expliqué auparavant, ils jouent un rôle important dans la physiologie des plantes et dans leur immunité puisqu'ils sont le point d'entrée de différents agents pathogènes. Ce projet de thèse s'articule donc autour de plusieurs questions :

- Quelles sont les spécificités physiologiques des hydathodes et est-ce qu'ils influencent la composition du fluide de guttation ?
- Quelles sont les bases génétiques de l'immunité post-invasive mise en place contre *Xcc* dans l'épithème et la vasculature ?
- Quel est le rôle de l'eau dans la pathogénie de *Xcc*, l'immunité végétale et la phénologie des symptômes ?

Les réponses à ces questions sont présentées dans le **Chapitre 3**. Nous avons mise en œuvre des approches de génomique fonctionnelle par étude de transcriptomes et de métabolomes d'*Arabidopsis thaliana* et/ou de *Brassica oleracea* var. *botrytis* cv. Clovis et effectué des cribles génétiques sur des mutants d'*A. thaliana* infectés par une souche de *Xcc* virulente. Dans la **Partie 1** sont regroupés les résultats de deux études de transcriptomique, sous forme de manuscrits. La première compare les tissus des hydathodes et du mésophylle de chou-fleur et d'*Arabidopsis thaliana*. La seconde étude porte sur la réponse transcriptomique des hydathodes du chou-fleur cv. Clovis à l'infection par une souche de *Xcc* virulente (8004) et une souche avirulente (8004 Δ *hrcV*), à un et trois jours après inoculation. La **Partie 2** correspond à la partie centrale de mon projet de thèse. Je présente d'abord la mise au point d'une méthode de criblage de l'immunité d'*A. thaliana* à *Xcc*, puis le criblage d'une collection de mutants, à la recherche de plantes affectées dans leur sensibilité à *Xcc*. Cette nouvelle méthode de criblage m'a permis de produire la **Partie 3**, dans laquelle je présente les résultats obtenus lors de l'étude de mutants d'*A. thaliana*, concernant l'influence du nombre d'hydathodes et de l'accès à l'eau sur la croissance de *Xcc in planta*. Tous les résultats sont discutés à la fin de la partie qui leur correspond, ainsi que dans la discussion générale en **Partie 4**.

Chapitre 3 : Résultats

Partie 1 : Les signatures transcriptomiques des hydathodes mettent en évidence leurs caractéristiques physiologiques et immunitaires

1. 1. Transcriptome des hydathodes de chou-fleur et d'*Arabidopsis thaliana* comparé au transcriptome du mésophylle

Contexte

Après des décennies d'oubli, les hydathodes commencent à recevoir un regain d'intérêt dans la communauté scientifique (Perrin, 1972; Chen and Chen, 2005; Cerutti et al., 2019; Yagi et al., 2021). Les plus anciennes études se penchent sur la caractérisation physiologique et développementale des hydathodes par microscopie. Avec le développement de nouvelles technologies, nous sommes en mesure d'étudier d'autres aspects de ces organes, notamment leurs caractéristiques transcriptomiques. Nous avons étudié des hydathodes matures et comparé leur signature transcriptomique à celle du mésophylle, chez *A. thaliana* et le chou-fleur *B. oleracea* var. *botrytis*. Ceci a été complété par des analyses métabolomique et protéomique du fluide de guttation provenant des hydathodes, ainsi qu'une étude de la composition des parois des hydathodes du chou-fleur par immunomarquage.

Contribution

Le travail présenté ici est le résultat d'une collaboration entre l'équipe SIX, M. Schattat (Université d'Halle-Wittenberg) et l'IBENS. L'échantillonnage des hydathodes et du mésophylle du chou-fleur cv. Clovis et d'*A. thaliana* a été effectué par E. Lauber (LIPME) et M. Schattat (Université d'Halle-Wittenberg), respectivement. Les échantillonnages et les analyses de métabolomique ont été effectuées par J.-M. Routaboul (LIPME) et G. Clément (IJPB Versailles). L'immunomarquage a été effectué par A. Jauneau (TRI-Genotoul). Le traitement bio-informatique des résultats a été réalisé par Sébastien Carrère. J'ai participé à l'analyse bio-statistique des résultats avec M.-F. Jardinaud et à l'analyse experte des résultats avec J.-M. Routaboul.

Les ébauches de ces articles sont présentées en **Annexe I** et **II**.

1. 2. Transcriptome des hydathodes de chou-fleur en réponse à l'infection par *Xcc*

Contexte

Le projet de thèse proposait d'étudier les bases génétiques et la spécificité de l'immunité des hydathodes en utilisant une approche de RNA-seq. Ici je présente les résultats obtenus sous forme d'un article scientifique. Les transcriptomes d'hydathodes de chou-fleur (*B. oleracea* var. *botrytis* cultivar Clovis) infectés par la souche sauvage de *Xcc* 8004 et un mutant du système de sécrétion de type III (8004 Δ *hrcV*) sont comparés à celui d'hydathodes non infectés (inoculés avec du MgCl₂), et ce un jour et trois jours après inoculation.

Contribution

Le travail décrit ici a été initié dans le cadre du projet NEPHRON. Le protocole d'infection des hydathodes du chou-fleur cv. Clovis par trempage était disponible dès le début de ma thèse, puisqu'il a été mis au point par A. Cerutti pour son projet de thèse. J'ai participé à la conceptualisation du plan d'expérience, réalisé les inoculations et les tests de croissance de *Xcc in planta* et généré les échantillons. Après séquençage à la plateforme de séquençage GeT-PlaGe et le traitement bio-informatique des données (S. Carrère), j'ai participé aux analyses bio-statistiques avec M.F. Jardinaud. J'ai ensuite analysé les résultats, produit les figures et rédigé le manuscrit.

1 *Xanthomonas* Type III effectors impose a strong suppression of transcriptional
2 immune response inside cauliflower hydathodes.

3 *Authors*


4 Caroline Bellenot¹, Sébastien Carrère¹, Marie-Françoise Jardinaud², Jean-Marc
5 Routaboul¹, Laurent D. Noël¹


6 ¹ LIPME, INRAE, CNRS, Université de Toulouse, Castanet-Tolosan, France.

7 ² LIPME, INRAE, CNRS, INP-ENSAT, Castanet-Tolosan, France.

8


9 Author for correspondence: L. D. Noël, laurent.noel@inrae.fr

10 C. Bellenot  <https://orcid.org/0000-0001-6774-6761>

11 S. Carrère  <https://orcid.org/0000-0002-2348-0778>

12 M.-F. Jardinaud  <https://orcid.org/0000-0001-8290-7527>

13 J.-M. Routaboul  <https://orcid.org/0000-0003-2197-5380>

14 L. D. Noël  <https://orcid.org/0000-0002-0110-1423>

15 *Abstract*

16 Hydathodes are organs commonly found at the tip of leaf serration of vascular plants. The
17 hydathodes are the site of guttation. They represent natural openings used by pathogens, like
18 the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), to enter inside the plant tissues.
19 *Xcc* is a vascular pathogen, causing the black rot of Brassica. It is an important threat for
20 Brassica crops worldwide, as our knowledge of the resistance and susceptibility mechanisms
21 in Brassica are very limited. To understand the plant immune responses that take place during
22 the early stages of infection, we studied the transcriptome of cauliflower hydathodes infected
23 with a virulent or an avirulent *Xcc* strain. We found that the basal immune response at one day
24 post infection (dpi) is triggered by both *Xcc* strains during this time and coincides with the
25 repression of photosynthesis pathway. At 3dpi, the immune responses are very limited
26 compared to 1dpi, most probably as a result of efficient suppression of the defenses by the
27 virulent bacteria compared to the avirulent strain. This study gives a first insight of the post-

28 invasive immunity implemented inside hydathodes at early stages of *Xcc* infection. We also
29 uncovered candidate immunity genes, including one receptor-like protein and a peroxidase.

30 *Introduction*

31 Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* cv. Clovis) is a crop grown worldwide,
32 belonging to the *Brassica* genus, which encompasses cabbages, kales, radishes, turnips and
33 mustards. This genus with a complex evolution story of cross hybridization originates from
34 Mediterranean costal region and central Asia (Dixon, 2006). According to the FAO, *Brassica*
35 *oleracea* production approximates 24 million of tons in 2020 (FAOSTAT, 2020), a number in
36 constant increase to meet the food need of the growing world population.

37 *Brassica* are affected by various pests and diseases like insects, viruses, bacteria,
38 oomycetes, fungi and nematodes (Lv et al., 2020). Among the diseases caused by these
39 microorganisms, the black rot disease is one of the most studied, because of its agronomic and
40 economic impact (Mansfield et al., 2012; Vicente and Holub, 2013). Black rot of crucifers is
41 caused by the bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*). In the *Brassica oleracea*
42 species, only tolerant cultivars are used, as there is no known resistance to *Xcc* (Massomo et
43 al., 2004; Lv et al., 2020). An effective strategy to control the disease would be to use other
44 *Brassica* species as source of resistance for breeding new resistant plants (Taylor et al., 2002).

45 *Xcc* is a seed-transmitted pathogen invading vascular tissues, causing V-shaped chlorotic
46 and necrotic symptoms on leaves and necrosis of the vascular system (Vicente and Holub,
47 2013). Under humid and warm conditions (Williams, 1980a), *Xcc* enters the leaf tissues
48 through wounds or hydathodes. Hydathodes are leaf organs known for mediating guttation.
49 They are usually localized at the tips of leaf serrations. Hydathode inner tissue is composed of
50 the epithem, a loose parenchyma made of small cells and irrigated by many xylem vessel
51 endings (Cerutti et al., 2019). Hydathodes are connected to the outside by stomata-like water
52 pores, which give epiphytic *Xcc* direct access to the inside of the leaf and to xylem vessels. The
53 vascularisation of the hydathodes permits a rapid spread of the infection to systemic tissues.
54 During the first few days (up to 3 days at least), *Xcc* stays in the intercellular space of the
55 epithem without damaging the tissue (Cerutti et al., 2017). Six days after the infection, *Xcc* is
56 still confined in the hydathodes, but it has degraded the epithem cells and the xylem vessels and
57 colonized the inside of cells. Between six and thirteen days after the infection, *Xcc* spreads
58 through the vascular system of the leaf, causing the first symptoms before colonizing systemic
59 leaves start to appear (Cerutti et al., 2017).

60 Interestingly, only a handful of microorganisms infects hydathodes (Fukui et al., 1996b;
61 Carlton et al., 1998; Niño-Liu et al., 2006; Yu et al., 2013), suggesting the presence of some
62 kind of hydathode immunity. As hydathodes pores cannot fully close in the presence of *Xcc*,
63 there is no proof of an pre-invasive immunity in the hydathodes (Cerutti et al., 2017). However,
64 a post-invasive immunity takes place in the epithem (Cerutti et al., 2017). In their experiment,
65 an *Xcc* mutant is unable to multiply in the epithem nor colonize the xylem, because of a
66 mutation of its type III secretion system (T3SS). The T3SS injects type III effectors inside plant
67 cells, where they can interfere with plant physiology and immunity (Büttner and Bonas, 2010).

68 Effectors can be recognized by intracellular plant receptors (NOD-Like Receptors,
69 NLRs), which leads to the effector-triggered immunity (ETI) (Jones and Dangl, 2006b). This
70 immunity is the fall back of the first layer of the plant immune system, based on multiple
71 pattern-recognition receptors (PRRs, Macho and Zipfel, 2014). The PRRs recognize
72 evolutionary-conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and activated the
73 PAMP-triggered immunity (PTI). The detection of a pathogen triggers a rapid burst of Ca^{2+} and
74 reactive oxygen species, as well as the phosphorylation of a cascade of mitogen-activated
75 protein kinases. All of this contribute to the intracellular signalization that activates the plant
76 defenses, including activation of hormones pathway for the regulation of the defense response
77 or transcriptional reprogramming. The defenses include the reinforcement of the cell walls,
78 production of active microbial compounds, like compounds of the secondary metabolism or
79 pathogenesis-related proteins, or cell death to stop pathogens progression.

80 A way to better understand mechanisms underlying plants resistance and susceptibility to
81 pathogens is to study the transcriptomic response of the plants during the interaction. In the
82 context of *Xcc* and *Brassica oleracea* pathogenic interaction, no study has been conducted
83 directly inside the hydathodes, except Luneau et al. (2022), which focus on the bacterial
84 determinants of pathogenicity. Several studies reported on *Brassica* response to *Xcc* by
85 comparing a resistant and a susceptible cultivar (Jiang et al., 2011; Villet et al., 2016). A
86 proteomic analysis by mass spectrometry showed that susceptibility in *B. oleracea* was linked
87 to a decrease of energetic metabolism and defense (Villet et al., 2016). This study bypassed
88 hydathode infection since wound inoculation was used and the proteomic analysis was
89 conducted on whole leaves. In Jiang et al. (2011), *B. oleracea* var. *botrytis* resistant and
90 susceptible cultivar response to *Xcc*, infiltrated in leaves, were compared. The study
91 demonstrates with qualitative expression data that the plant response to *Xcc* is faster and more
92 intense in the susceptible plant than in the resistant plant.

93 In this study, we compare the transcriptomic responses of cauliflower hydathodes infected
94 with a virulent strain of *Xcc* and an avirulent mutant, at early stages of infection. We wish to
95 determine what the immune responses of hydathodes are and how these defenses are
96 manipulated by the bacterial pathogen.

97 *Results*

98 Quality control of infection and sequencing of RNA from infected hydathodes tissues

99 Bacterial growth of *Xcc* wild-type strain 8004 and 8004 Δ *hrcV* mutant were compared in
100 macro-dissected hydathodes after dpi inoculation of cv. Clovis susceptible cauliflower leaves.
101 Of the initial 10^8 bacterial CFU/mL inoculated, ca. 10^4 - 10^5 CFU make it to the hydathodes at 1
102 day post inoculation (dpi), for both strains (**Figure 1**). The bacterial population size of the wild-
103 type strain is significantly higher (p-value < 0.05) than the 8004 Δ *hrcV* mutant at 1 and 3 dpi.
104 These results are consistent with previous reports (Cerutti et al., 2017). Moreover, the
105 population size of the 8004 Δ *hrcV* mutant does not increase over time. This indicates that *Xcc*
106 8004 wild-type strain is virulent in cauliflower hydathodes, while the 8004 Δ *hrcV* mutant is
107 avirulent and poorly multiplies in the epithem. Among all the hydathodes sampled for bacterial
108 enumeration, all hydathodes from plants infected with the wild-type strain or 8004 Δ *hrcV*
109 contain a detectable number of bacteria, while in none-inoculated hydathodes no bacteria could
110 be detected. This indicates that the infection rate is 100% and there is no contamination.

111 To examine the transcriptomic response of the hydathodes to a virulent (8004 WT) and
112 an avirulent (8004 Δ *hrcV*) strain, RNA of one hundred infected hydathodes were extracted from
113 samples harvested at 1 and 3 days after dip inoculation. In each condition, Illumina RNA
114 sequencing produced on average 1.3×10^7 raw reads per sample. For the mapping of the reads,
115 we used the reference genome of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* cultivar TO1000 (Parkin
116 et al., 2014, V2.1.31; accession GCA_000695525.1), the closest relative of *B. oleracea* var.
117 *botrytis* (Cheng et al., 2016) that has a public genome annotation. Overall, 82% of the reads
118 from the cauliflower Clovis were mapped to the reference TO1000 (**Table 1**). Hydathodes
119 samples inoculated with water or bacteria formed distinct clusters after analysis of the
120 Euclidean distances between samples at 3 dpi (**Figure 2**). Interestingly, at 1 dpi hydathodes
121 samples inoculated with wild-type and mutant *Xcc* cluster together, and one different biological
122 replicate of each cluster with the mock samples. However, at 3 dpi, the three treatments cluster
123 separately. The similarity of the biological replicate within each treatment is clearly more
124 pronounced at 3dpi than 1dpi. In the hydathodes inoculated with any of the two bacterial strain

125 and at the two time points, a total of 5372 genes out of 40756 (with more than 1 read in at least
126 1 sample. All genes = 60793) were differentially expressed (DEGs) in comparison to mock-
127 inoculated hydathodes (p-value <0.01). To proceed with the ontology and annotation analysis,
128 orthologous genes between cabbage TO1000 and *Arabidopsis thaliana* were found with the
129 Mercator V4 software. Only the first best match in *Arabidopsis* was kept. Of the 5372 DEGs
130 found, 4707 (87,6%) had an ortholog in *Arabidopsis* (**Table S1**).

131 *Xcc* strongly impacts cauliflower transcriptome at early and later stage of infection

132 The early response to *Xcc* (1dpi) is twice as strong as the later response (3dpi): the DEG
133 calling identified 3773 and 1592 DEGs at 1 and 3dpi, respectively (**Table S1**). However, the
134 response intensity is similar between the two strains at 1dpi as the number of DEGs are 3133
135 for $\Delta hrcV$ and 2854 for the wild type. At 3dpi, 32% more DEGs were found in response to
136 $\Delta hrcV$ strain (1077) than to the wild type (733).

137 We defined three groups of DEGs: the shared DEGs, which we presume to be depictive
138 of the generic response of cauliflower hydathodes to any *Xcc* strains, and the specific
139 transcriptomes where the response to 8004 $\Delta hrcV$ and 8004 WT correspond to an incompatible
140 and a compatible response to *Xcc*, respectively. The number of DEG found in these different
141 groups is summarized in **Figure 3**. The most striking result is the decrease by 10 of shared
142 DEGs between 1 and 3 dpi: there are 2 214 and 218 DEGs in each group, respectively. Gene
143 ontology (GO) enrichment analysis at 1dpi finds 149 GO terms enriched in the shared
144 transcriptome, 25 specifics to the response to $\Delta hrcV$ and none for WT. 5, 31 and 29 GO terms
145 were enriched at 3 dpi in the shared, specific to $\Delta hrcV$ and WT transcriptomes, respectively
146 (**Table 2**).

147 Only a handful of GO terms are enriched in the shared DEGs of hydathodes at 3dpi.
148 Among the 8004 $\Delta hrcV$ -specific enriched GO terms, we found molecular process of “defense
149 response” and “innate immune response”, two ROS metabolism-related terms, and “cell wall
150 biogenesis”, indicative of a probable defense response with a ROS burst and cell wall
151 modification.

152 *Xcc* represses photosynthesis in hydathodes

153 The photosynthesis is strongly repressed at 1dpi in response to both strains and
154 particularly to *Xcc* 8004 $\Delta hrcV$: the most significantly enriched GO term is “photosynthesis”
155 and contains only repressed DEGs (**Table 2**). To have an overview of these genes, we did a

156 MapMan annotation (**Table S2**). The associated Wilcoxon Rank Sum Test confirmed the GO
157 enrichment analysis by pointing out those repressed genes related to photosynthesis as
158 overrepresented. Mainly, photosystems I and II are downregulated, in DEGs shared and specific
159 to *Xcc* 8004 Δ *hrcV* response (**Table S3**). A dozen of genes from photorespiration and the Calvin
160 cycle are also downregulated in the common response to *Xcc* strains. On the contrary, only a
161 few DEGs related to photosynthesis are found at 3dpi, and only in response to *Xcc* 8004 Δ *hrcV*.
162 Thus, the whole energy production appears to be downregulated only at the earliest stage of
163 infection tested.

164 Auxin-dependent signaling pathway in response to *Xcc*

165 Hormone signaling at 1dpi seems to be dominated by auxin. Indeed, in response to any
166 *Xcc*, GO terms “response to auxin” and “auxin-mediated signaling pathway” are enriched. Most
167 MapMan bins related to hormone metabolism are also found in response to both *Xcc* (**Table**
168 **S2**). Conversely, representant of all hormones known to be involved in plant defence response
169 are found in these DEGs, illustrating the complexity of the response to *Xcc* (abscisic acid, auxin,
170 brassinosteroids, cytokinin, ethylene, gibberellic acid, jasmonic acid, salicylic acid (Bari and
171 Jones, 2009)). At a later stage of infection, the GO term “response to auxin” is enriched in
172 response to the wild-type strain only.

173 Cell wall is modified in early and incompatible responses to *Xcc*

174 The modification of the cell wall was a response common to both strains, as GO terms
175 linked to cell wall modification were enriched the shared DEGs at 1dpi (**Table 2**). The MapMan
176 annotation of the DEGs present in these GO terms shows that cellulose synthases are repressed
177 and the synthesis of cell wall precursors is induced (**Table S2**). In the later response, at 3dpi,
178 GO terms of cell wall organization and biogenesis are enriched in response to 8004 Δ *hrcV*.
179 Among them, synthesis of cell wall precursors is induced, but DEGs linked to cell wall
180 modification, like pectate lyases and expansins, are repressed.

181 Intense reprogramming of transcription factors expression in response to *Xcc*

182 We retrieved transcription factors (TFs) annotation of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica*
183 *oleracea* TO1000 from the iTAK database (Zheng et al., 2016). In all the DEGs, we found a
184 total of 459 TFs. At 1dpi, most TFs were differentially expressed in response to both strains
185 (190/335, **Table S4**). However, a larger repression of TFs was observed specifically in response
186 to Δ *hrcV* (62/84) in comparison to WT (34/61). At 3dpi, most TFs were differentially expressed

187 in response to a specific strain (76+90/200). During early stage of infection, most of the
188 transcriptional reprogramming is a global response to any *Xcc*, as most TFs are shared between
189 the responses to the two strains. However, at 3dpi the pattern is inverted: the transcriptional
190 reprogramming is strain specific.

191 HB TF gene family is the most differentially impacted in response to the two different
192 strains: more of these TFs are repressed in response to 8004 Δ *hrcV*. At 3dpi, bZIP, MYB and
193 WRKY TF families are more impacted in response to 8004 Δ *hrcV* than to WT (**Figure 4**): bZIP
194 are particularly repressed and WRKY induced, and MYB are both more repressed and induced
195 by the 8004 Δ *hrcV* than the wild type.

196 Perception of *Xcc* by PRR and NLR

197 The plant defenses are expressed at 1dpi, in response to both bacteria, and at 3 dpi in
198 response to the Δ *hrcV* strain only: indeed, in both cases the GO terms annotation shows an
199 enrichment for “defense response” and “innate immune response” terms among others (**Table**
200 **2**). This suggests that the basal defense is in place at 1dpi against both strains and only against
201 the T3SS mutant at 3dpi.

202 During the early response, 38 genes annotated as PRR are DEG found in response to both
203 *Xcc* 8004 wild-type and 8004 Δ *hrcV*, 6 are specific to the response to 8004 Δ *hrcV* and 12 to 8004
204 wild-type (**Table S5**). At this time point we also found 25 NLR. Half of them are common to
205 the response to both strains, and 9 are specific to 8004 Δ *hrcV*, only 3 to 8004 wild-type.
206 Evidence of defense responses were found in the form of 5 DEG annotated as pathogenesis-
207 related proteins (PR). All of them are part of the shared response, half being induced and half
208 being repressed. Interestingly, the marker of immunity PR1 is among them, but it is surprisingly
209 repressed. The inducer of PTI, BIK1 (Lu et al., 2010) and BIR1, a repressor of PTI (Liu et al.,
210 2016) are both specifically repressed by the wild-type strain. The expression pattern of these
211 two genes seems contradictory, but we ignore their relative importance in the regulation of PTI,
212 especially in cauliflower. Because we are working with *A. thaliana* orthologues, it is possible
213 that the cauliflower genes have a different regulation or function altogether than their *A.*
214 *thaliana* orthologues.

215 There are less receptors of PTI and ETI that are differentially expressed at 3 dpi than at 1
216 dpi. Most differentially expressed PRR are specific to the response to one or the other strain
217 (22/27, **Table S5**). Among them, 15 are specific to the response to 8004 Δ *hrcV*, 7 to the WT

218 strain (for both, half are induced and half are repressed). Only 8 NLR are found to be DEGs.
219 Six of them are specific to the response to $\Delta hrcV$, with 5 being induced. It is possible that the
220 other NLR are repressed by the wild-type strain to an expression level similar to the mock
221 sample, which prevent them from being detected as DEGs. It is clear that the immune responses
222 of cauliflower to *Xcc* are complexes.

223 Candidate genes for resistance to *Xcc*

224 Interestingly, all DEGs shared between hydathodes infected with $\Delta hrcV$ and WT have a
225 log₂ fold change (FC) of the same sign, at the two time points, with the exception of only two
226 DEGs at 3dpi that have opposite reactions to the two strains: they both are induced by
227 8004 $\Delta hrcV$ and repressed by the wild-type strain. Bo8g004400 is the orthologue of *AtRLP54*
228 (*At5g40170*), encoding a receptor like-protein. Bo8g101160 is the orthologue of a cell-wall
229 located peroxidase of *AtPRX17* (*At2g22420*), which is involved in formation of lignified tissue
230 during the plant development (Cosio et al., 2017). These two genes are good candidates for
231 investigate resistance (or tolerance) to *Xcc*, especially as the first is the orthologue of a RLP
232 responsive to pathogens (Steidele and Stam, 2021) and the other, as a peroxidase, could be
233 involved in PTI (Daudi et al., 2012).

234 *Discussion*

235 Importance of immune suppression by virulent *Xcc*

236 The important difference in the number of shared DEGs between 1 and 3 dpi could be
237 explained as follow: the early immune responses are important and common to any *Xcc*. Later
238 on, the response varies depending on the presence or absence of the T3SS. In response to the
239 avirulent strain, defense responses are sustained, though lower. With its type III effectors, the
240 virulent strain imposes a strong suppression of transcriptional immune response inside
241 cauliflower hydathodes, to a basal level similar to a non-infected plant. Indeed, in the same
242 conditions, *Xcc* T3SS is induced as early as 4 hours post-infection, increasing until 3 dpi
243 (Luneau et al., 2022b). It means the T3Es can really already be in the host cells to disrupt
244 immunity.

245 Downregulation of photosynthesis by *Xcc* in early transcriptomic responses

246 The strongest early response to *Xcc* is the downregulation of photosynthesis, which is
247 even more pronounced in response to the avirulent strain. Plant immunity repressed
248 photosynthesis-related genes in response to biotic stress, the hypothesis behind this is that plants

249 allocate resources in fast defense responses (Bilgin et al., 2010). This could also be an indirect
250 consequence: in epithem, chloroplasts are well developed (Perrin, 1972; Cerutti et al., 2017)
251 and the first symptom caused by *Xcc* virulent strains is a chlorosis of the hydathodes. In
252 response to an avirulent strain, hydathodes become brown, because of an accumulation of
253 phenolic compounds (Cerutti et al., 2017). It means that in both cases, the transcriptome of the
254 hydathodes shows a downregulation of photosynthesis. At the later stages of infection, at 3dpi,
255 plant metabolism seems to be mostly back to normal, in one case because the avirulent strain is
256 contained and in the other because the virulent bacteria shuts down the defenses.

257 Auxin metabolism and signaling in response to *Xcc*

258 Genes annotated as auxin responsive, auxin synthesis/degradation, and auxin transport
259 were found as DEG in all conditions, and GO terms related to auxin were enriched during the
260 early response to *Xcc*. This plant hormone is involved in signaling during plant defenses (Kazan
261 and Manners, 2009; Kunkel and Harper, 2018) and it is probably the case here. For example,
262 many pathogens produce auxin structural analogs or impact directly the auxin pathway of the
263 plant host to interfere with their immunity (Kazan and Manners, 2009). Also, plant can regulate
264 their auxin signalization among other hormone signaling pathways to prevent such pathogenic
265 strategy: defense to biotrophic pathogen via salicylic acid-signaling involves auxin signaling
266 inhibition (Navarro et al., 2006; Wang et al., 2007). It would be worthwhile to investigate the
267 capacity of *Xcc* to produce and secrete auxin. It is also noteworthy that hydathodes are a site of
268 auxin transport and synthesis (Routaboul *et al.*, unpublished). The modification of auxin
269 metabolism inside the cauliflower during *Xcc* infection could be a part of the overall effect of
270 the bacteria on the hydathode metabolism.

271 *Conclusion*

272 In this study, we present the first description of the transcriptomic immune response
273 inside hydathodes, in response to *Xcc*. The analysis presented here lead to the hypothesis that
274 early response to *Xcc* is strong and does not reflect the virulence or avirulence of the bacteria:
275 the early transcriptome suggests that the hydathode cells perceive any *Xcc* and reacts similarly
276 to both. At 3dpi, the transcriptomic response is less intense and is specific to the *Xcc*
277 encountered. Yet the avirulent strain forces stronger immune responses as compared to the
278 virulent strain which is still able to suppress plant immunity, thanks to its T3SS and T3Es.

279 Additional studies will deepen our knowledge of hydathode post-invasive immunity, e.g.
280 using forward/reverse genetics in *A. thaliana*, including *RLP54* and *PRX17* mutants.

281 *Material and methods*

282 Plant material and growth conditions

283 Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) cultivar Clovis (F1 hybrid, Vilmorin) was
284 grown under greenhouse conditions. Four-week-old plants were transferred to a growth
285 chamber (8h light; 22°C, 70% relative humidity) two days before inoculation.

286 Bacterial strains and growth conditions

287 The *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains used in this study are strain 8004
288 (Daniels et al., 1984), and the mutant 8004 $\Delta hrcV$ (Cerutti et al., 2017). These strains were
289 cultivated in MOKA medium (4g/L yeast extract, 8g/L casamino acids, 2g/L K₂HPO₄, 0,3 g/L
290 MgSO₄·7H₂O,) at 28°C under agitation, as described (Blanvillain et al., 2007).

291 Plant infection and sampling of infected hydathodes

292 Bacteria were grown overnight in MOKA and harvested by centrifugation (4.000g,
293 10min), washed and suspended in 1mM MgCl₂ at 10⁸ cfu.mL⁻¹, 0.5% Tween®80 (Sigma-
294 Aldrich). Second true leaves of plants were dip inoculated for 30 seconds in the bacterial
295 suspension (*Xcc* 8004 or *Xcc* 8004 $\Delta hrcV$) and let to dry. Alternatively, leaves were dipped in
296 a mock solution containing 1mM MgCl₂ and 0.5% Tween®80. Plants were then placed in a
297 propagator tray and covered for 24h to be in condition promoting guttation (*i.e.* 100% relative
298 humidity). Inoculated hydathodes were harvested at 1 and 3 days after inoculation. To collect
299 hydathodes, leaves were shortly rinsed twice in sterile water and dried on a paper towel. For
300 the samples for RNA sequencing, at least 100 hydathodes were macrodissected with a 1.5 mm
301 diameter punch, with 10 to 12 being collected per leaf. Hydathode samples were immediately
302 placed in nitrogen and stored at -80°C. Three independent biological replicates were performed
303 on eleven plants.

304 Measurement of bacterial population inside hydathodes

305 To check that harvested hydathodes are infected, infection efficiency was checked at 1
306 and 3dpi by determining bacterial population in 24 individual hydathodes, 6 per second true
307 leaf in each condition. Each hydathode were placed in 200µL of 1mM MgCl₂. They were
308 grinded at room temperature 2 x 30s using a Retch MM400 grinded. 5µL of several dilutions
309 were spotted in three technical replicates on MOKA rich medium supplemented with 30mg/mL
310 of antifungal pimarinic and incubated for 48h at 28°C. Colonies were counted and the mean of
311 the three technical replicates were calculated to estimate the bacterial population level of each

312 hydathode. To assess the significance of difference between bacterial populations, the
313 nonparametric Kruskal-Wallis test with $\alpha = 0.05$ was used. Experiment was performed on four
314 different plants per condition and in three independent replicates. All infected hydathodes
315 contained at least 10^3 bacteria in these experiments. We thus considered that all hydathodes
316 were successfully infected. None of the mock-inoculated hydathode contained detectable
317 amount of bacteria.

318 RNA extraction and sequencing and bioinformatics analyses

319 RNA extraction was performed with the mirVana isolation Kit (Ambion®, Life
320 Technologies™) following the manufacturer instructions. Prior to sequencing, quality of
321 purified RNA was checked with Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Germany). Global
322 expression of cauliflower genes of the poly-A fraction was determined by replicated strand-
323 specific Illumina RNA-Seq. Paired-end RNA sequencing has been performed on an Illumina
324 HiSeq3000 using a paired-end read length of 2x150 pb with the Illumina HiSeq3000 Reagent
325 Kits (<http://get.genotoul.fr/>). Paired-end reads were mapped on the reference genome of *B.*
326 *oleracea* (var. *alboglabra* cv. TO1000, kale-like) V2.1.31 using the glint software (release
327 1.0.rc12.826:833, <http://lipm-bioinfo.toulouse.inra.fr/download/glint>). Only best-scores were
328 taken into account, with a minimal hit length of 60 bp, a maximum of 5 mismatches and no gap
329 allowed. Ambiguous matches with the same best score were removed.

330 Statistical analysis

331 Differential analysis of gene expression was performed as described (Luneau et al.,
332 2022b), with the R software (v3.6.2). Briefly, differentially expressed genes (DEGs) were
333 detected with edgeR package (v3.28.1). Gene with no reads across all libraries were discarded.
334 Normalization was performed with the trimmed mean of M-values (ref dans Luneau). Quality
335 of normalized data and reproducibility of biological replicates were checked with plots and
336 heatmaps produced with pheatmap (v.1.0.12) on sample-to-sample Euclidean distances. The
337 multiple factor analysis took biological repetition (BR) and factor of interest (time points (dpi)
338 and strains) into account, thanks to a fitted generalized linear model (GLM) with a design
339 matrix. The model was written as BR + dpi × strain. Cox-Reid profile-adjusted likelihood
340 method in estimating dispersion was used. DEGs calling used the GLM likelihood ratio test and
341 the false discovery rate (FDR) adjusted p-value <0.01.

342 *B. oleracea/A. thaliana* orthology and GO terms enrichment

343 To organize *B. oleracea* genes into functional categories, we looked for the closest *A.*
344 *thaliana* homolog using the Mercator software V3.6 ([https://www.plabipd.de/portal/mercator-](https://www.plabipd.de/portal/mercator-sequence-annotation)
345 [sequence-annotation](https://www.plabipd.de/portal/mercator-sequence-annotation)). DEGs were grouped by time point and according to their expression
346 pattern. The shared transcriptome regroups the DEGs induced and repressed in response to both
347 the wild-type and the mutant strains. The other groups consisted of DEGs specific to the
348 response to only one of the two strains. We performed an enrichment test on these different
349 groups based on gene ontology (GO). We used the Parametric Analysis of Gene set Enrichment
350 (PAGE) method of AgriGO v2.0 (Tian et al., 2017). GO terms with at least 10 genes and a False
351 Discovery Rate (FDR) < 0.05 were considered enriched. Functional annotation of DEGs was
352 provided by the Mercator software. MapMan Bin codes were used to get lists of DEGs
353 associated with photosynthesis, cell wall and hormone metabolism (<http://mapman.gapipd.org>
354 V3.6.0). *Arabidopsis thaliana* transcription factors (TFs) annotation was retrieved from the
355 iTAK database (Zheng et al., 2016, <http://itak.feilab.net>) to determine which DEGs are TFs. As
356 *Brassica oleracea* TFs were also available, we could compare the annotation of our DEGs with
357 *Arabidopsis thaliana* TFs orthologues to the annotation with *Brassica oleracea* predicted TFs.
358 Among all our DEGs, 433 are annotated as *Arabidopsis* TFs in iTAK database and 450 as
359 *Brassica oleracea* TFs. 426 TFs are common between the two annotations and the structural
360 families of the TFs are perfectly matching. 9 and 26 TFs are found only with either the *A.*
361 *thaliana* or the *B. oleracea* annotation, respectively. To be as accurate as possible, we pooled
362 both annotations to analyze the TFs data.

363 *Acknowledgements*

364 This work was funded by a grant from the Agence Nationale de la Recherche NEPHRON
365 (ANR-18-CE20-0020-01). LIPME is part of the ‘Laboratoires d’Excellences’ TULIP LabEx
366 (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02) and the ‘École Universitaire de Recherche’
367 (EUR) TULIP-GS (ANR-18-EURE-0019).

368 *References*

369 **Bari R, Jones JDG (2009)** Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol*
370 *Biol* **69**: 473–488

371 **Bilgin DD, Zavala JA, Zhu J, Clough SJ, Ort DR, DeLUCIA EH (2010)** Biotic stress
372 globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, Cell & Environment* **33**: 1597–1613

373 **Blanvillain S, Meyer D, Boulanger A, Lautier M, Guynet C, Denancé N, Vasse J,**
374 **Lauber E, Arlat M** (2007) Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent
375 Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. *PLOS ONE* **2**: e224

376 **Büttner D, Bonas U** (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors.
377 *FEMS Microbiol Rev* **34**: 107–133

378 **Carlton WM, Braun EJ, Gleason ML** (1998) Ingress of *Clavibacter michiganensis*
379 subsp. *michiganensis* into Tomato Leaves Through Hydathodes. *Phytopathology* **88**: 525–529

380 **Cerutti A, Jauneau A, Auriac M-C, Lauber E, Martinez Y, Chiarenza S, Leonhardt**
381 **N, Berthomé R, Noël LD** (2017) Immunity at Cauliflower Hydathodes Controls Systemic
382 Infection by *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *Plant Physiol* **174**: 700–716

383 **Cerutti A, Jauneau A, Laufs P, Leonhardt N, Schattat M, Berthomé R, Routaboul**
384 **J-M, Noël LD** (2019) Mangroves in the Leaves: Anatomy, Physiology, and Immunity of
385 Epithelial Hydathodes. *Annu Rev Phytopathol* **57**: 91–116

386 **Cheng F, Sun R, Hou X, Zheng H, Zhang F, Zhang Y, Liu B, Liang J, Zhuang M,**
387 **Liu Y, et al** (2016) Subgenome parallel selection is associated with morphotype diversification
388 and convergent crop domestication in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Nat Genet* **48**: 1218–
389 1224

390 **Cosio C, Ranocha P, Francoz E, Burlat V, Zheng Y, Perry SE, Ripoll J-J, Yanofsky**
391 **M, Dunand C** (2017) The class III peroxidase PRX17 is a direct target of the MADS-box
392 transcription factor AGAMOUS-LIKE15 (AGL15) and participates in lignified tissue
393 formation. *New Phytologist* **213**: 250–263

394 **Daniels MJ, Barber CE, Turner PC, Sawcyc MK, Byrde RJW, Fielding AH** (1984)
395 Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using
396 the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J* **3**: 3323–3328

397 **Daudi A, Cheng Z, O'Brien JA, Mammarella N, Khan S, Ausubel FM, Bolwell GP**
398 (2012) The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of
399 pattern-triggered immunity. *Plant Cell* **24**: 275–287

400 **Dixon GR** (2006) Origins and diversity of Brassica and its relatives. *In* GR Dixon, ed,
401 Vegetable brassicas and related crucifers. CABI, Wallingford, pp 1–33

402 **FAOSTAT** (2020) FAOSTAT données “ Production : cultures et produits animaux.”
403 <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/QCL/visualize>

404 **Fukui R, Fukui H, McElhaney R, Nelson SC, Alvarez AM** (1996) Relationship
405 between Symptom Development and Actual Sites of Infection in Leaves of Anthurium
406 Inoculated with a Bioluminescent Strain of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*.
407 *Applied and environmental microbiology* **62**: 1021–1028

408 **Jiang H, Song W, Li A, Yang X, Sun D** (2011) Identification of genes differentially
409 expressed in cauliflower associated with resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.
410 *Mol Biol Rep* **38**: 621–629

411 **Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329

412 **Kazan K, Manners JM** (2009) Linking development to defense: auxin in plant–pathogen
413 interactions. *Trends in Plant Science* **14**: 373–382

414 **Kunkel BN, Harper CP** (2018) The roles of auxin during interactions between bacterial
415 plant pathogens and their hosts. *J Exp Bot* **69**: 245–254

416 **Liu Y, Huang X, Li M, He P, Zhang Y** (2016) Loss-of-function of Arabidopsis receptor-
417 like kinase BIR1 activates cell death and defense responses mediated by BAK1 and SOBIR1.
418 *New Phytologist* **212**: 637–645

419 **Lu D, Wu S, Gao X, Zhang Y, Shan L, He P** (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase,
420 BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity.
421 *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 496–501

422 **Luneau JS, Cerutti A, Roux B, Carrère S, Jardinaud M-F, Gaillac A, Gris C, Lauber**
423 **E, Berthomé R, Arlat M, et al** (2022) *Xanthomonas* transcriptome inside cauliflower
424 hydathodes reveals bacterial virulence strategies and physiological adaptations at early
425 infection stages. *Molecular Plant Pathology* **23**: 159–174

426 **Lv H, Fang Z, Yang L, Zhang Y, Wang Y** (2020) An update on the arsenal: mining
427 resistance genes for disease management of Brassica crops in the genomic era. *Hortic Res* **7**:
428 1–18

429 **Macho AP, Zipfel C** (2014) Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling.
430 *Molecular Cell* **54**: 263–272

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

434 **Massomo SMS, Mabagala RB, Swai IS, Hockenhull J, Mortensen CN** (2004)
435 Evaluation of varietal resistance in cabbage against the black rot pathogen, *Xanthomonas*
436 *campestris* pv. *campestris* in Tanzania. *Crop Protection* **23**: 315–325

437 **Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones**
438 **JDG** (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin
439 signaling. *Science* **312**: 436–439

440 **Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ** (2006) *Xanthomonas oryzae* pathovars:
441 model pathogens of a model crop. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY* **23**

442 **Parkin IA, Koh C, Tang H, Robinson SJ, Kagale S, Clarke WE, Town CD, Nixon J,**
443 **Krishnakumar V, Bidwell SL, et al** (2014) Transcriptome and methylome profiling reveals
444 relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome Biol* **15**: R77

445 **Perrin A** (1972) Contribution à l'étude de l'organisation et du fonctionnement des
446 hydathodes: recherches anatomiques, ultrastructurales et physiologiques. Lyon, Département
447 de biologie végétale de l'Université

448 **Steidele CE, Stam R** (2021) Multi-omics approach highlights differences between RLP
449 classes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* **22**: 557

450 **Taylor JD, Conway J, Roberts SJ, Astley D, Vicente JG** (2002) Sources and Origin of
451 Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica Genomes. *Phytopathology*®
452 **92**: 105–111

453 **Tian T, Liu Y, Yan H, You Q, Yi X, Du Z, Xu W, Su Z** (2017) agriGO v2.0: a GO
454 analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res* **45**: W122–
455 W129

456 **Vicente JG, Holub EB** (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black
457 rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Mol Plant Pathol*
458 **14**: 2–18

459 **Villeth GRC, Carmo LST, Silva LP, Santos MF, de Oliveira Neto OB, Grossi-de-Sá**
460 **MF, Ribeiro IS, Dessaune SN, Fragoso RR, Franco OL, et al** (2016) Identification of

461 proteins in susceptible and resistant Brassica oleracea responsive to Xanthomonas campestris
462 pv. campestris infection. Journal of Proteomics **143**: 278–285

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

466 **Williams PH** (1980) Black Rot: A Continuing. Plant Dis **64**: 736

467 **Yates AD, Allen J, Amode RM, Azov AG, Barba M, Becerra A, Bhai J, Campbell**
468 **LI, Carbajo Martinez M, Chakiachvili M, et al** (2022) Ensembl Genomes 2022: an
469 expanding genome resource for non-vertebrates. Nucleic Acids Research **50**: D996–D1003

470 **Yu A, Lepere G, Jay F, Wang J, Bapaume L, Wang Y, Abraham A-L, Penterman J,**
471 **Fischer RL, Voinnet O, et al** (2013) Dynamics and biological relevance of DNA
472 demethylation in Arabidopsis antibacterial defense. Proceedings of the National Academy of
473 Sciences **110**: 2389–2394

474 **Zheng Y, Jiao C, Sun H, Rosli HG, Pombo MA, Zhang P, Banf M, Dai X, Martin**
475 **GB, Giovannoni JJ, et al** (2016) iTAK: A Program for Genome-wide Prediction
476 and Classification of Plant Transcription Factors, Transcriptional Regulators, and Protein
477 Kinases. Molecular Plant **9**: 1667–1670

478

Table 1 Summary of sequencing data

Samples	Average raw reads	% of mapped reads on reference genome
0dpi	13,265,059	82.5
1dpi Mock	12,465,994	82.9
1dpi <i>Xcc</i> 8004 Δ <i>hrcV</i>	10,866,733	80.8
1dpi <i>Xcc</i> 8004WT	14,176,215	83.0
3dpi Mock	11,967,822	82.6
3dpi <i>Xcc</i> 8004 Δ <i>hrcV</i>	13,369,069	81.8
3dpi <i>Xcc</i> 8004WT	16,381,941	82.1

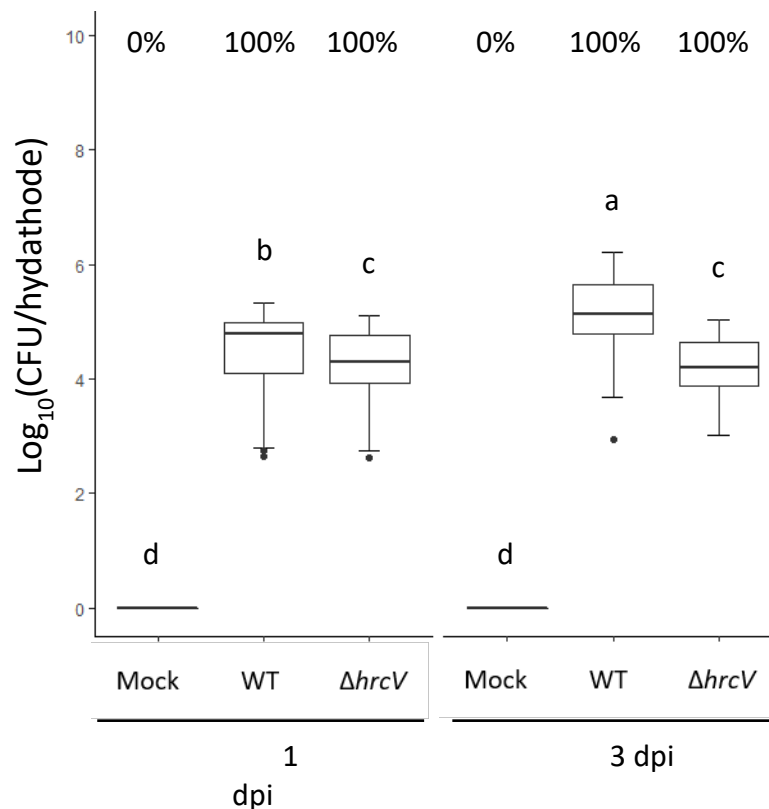


Figure 1. Measure of hydathode populations over time in the condition used for the RNAseq. Bacterial population were determined in individual hydathodes at 1 and 3 days after dip-inoculation of the second true leaf of 4-week-old cauliflower plants. Leaves were dipped in MgCl_2 1mM (Mock), in a suspension at 10^8 cells/mL of *Xcc* 8004 (WT) or of *Xcc* 8004 Δ *xopAC* (Δ *xopAC*). Six hydathodes were sampled on one leaf per plant and four plants were used per experiment. Three independent experiments were performed. Percentages indicates proportion of hydathodes containing detectable amount of *Xcc* on all the hydathodes samples for bacterial enumeration. Letters indicates statistically different groups (non parametric Kruskal-Wallis test with an α error = 0.05).

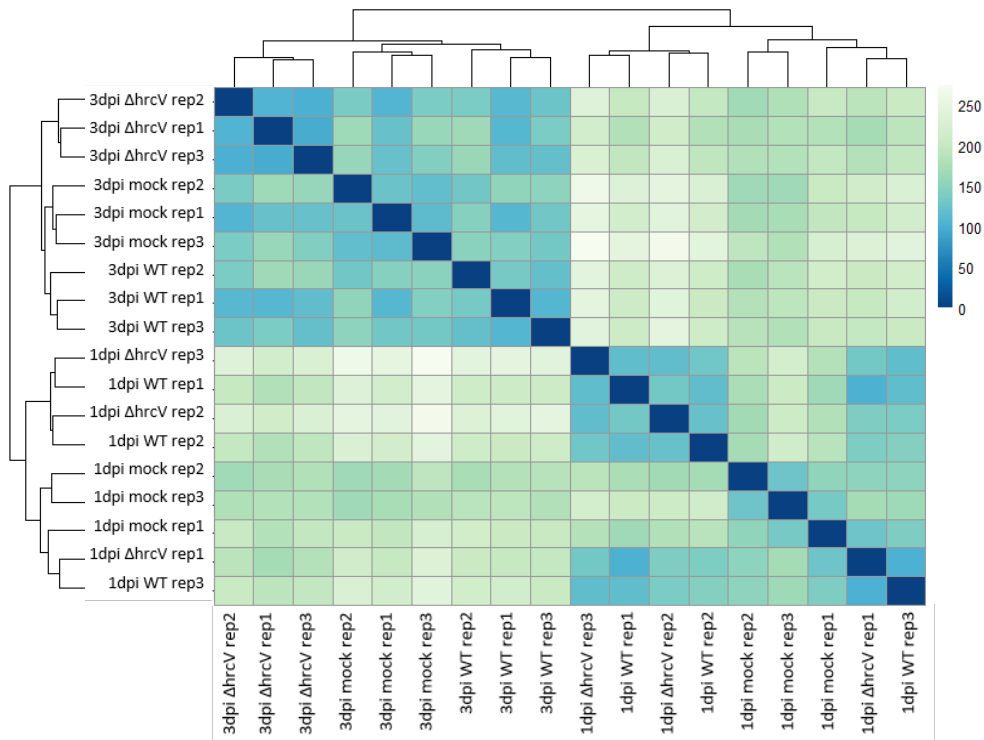


Figure 2. Clustering of samples. Euclidean distances between biological replicates are calculated from the normalized count of reads. Rep stands for biological replicate.

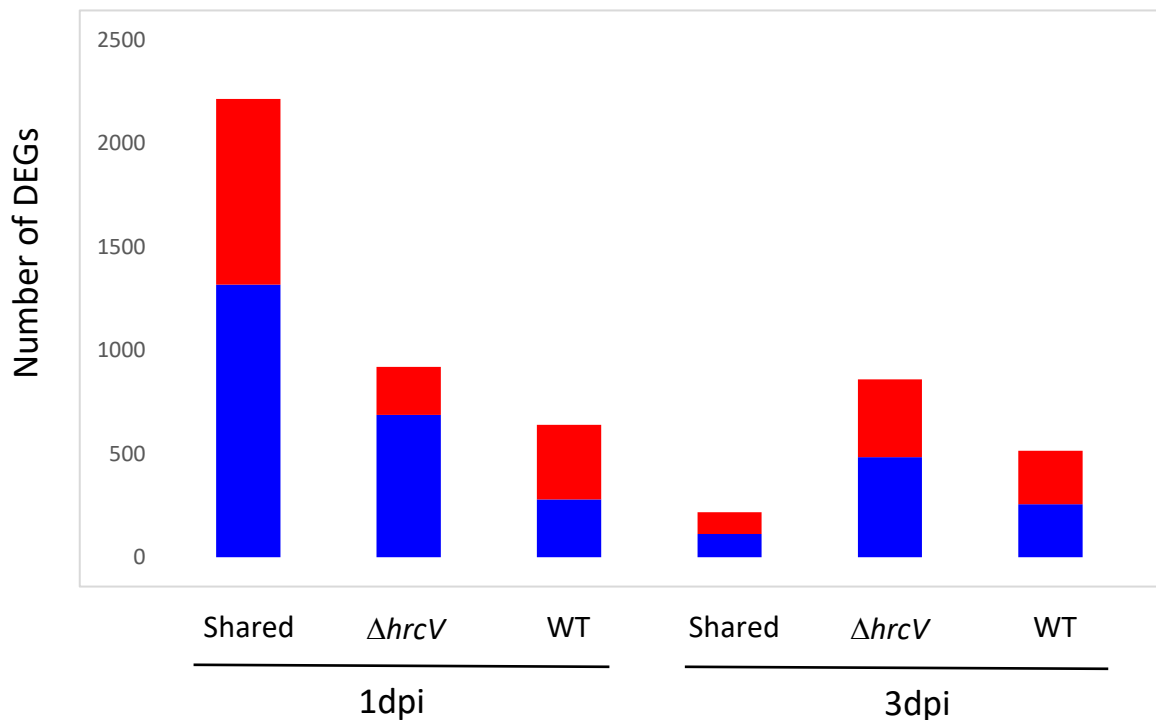


Figure 3. Number of differentially expressed genes (DEGs) in cauliflower Clovis hydathodes infected with *Xcc*, with an orthologue in *Arabidopsis thaliana*. DEGs specific to the response to *Xcc*8004Δ*hrcV* (Δ*hrcV*) and *Xcc*8004 wild type (WT) strains are separated from the DEGs common (Shared) to both condition. Up-regulated genes compared to mock inoculated hydathodes are in red, down-regulated genes are in blue.

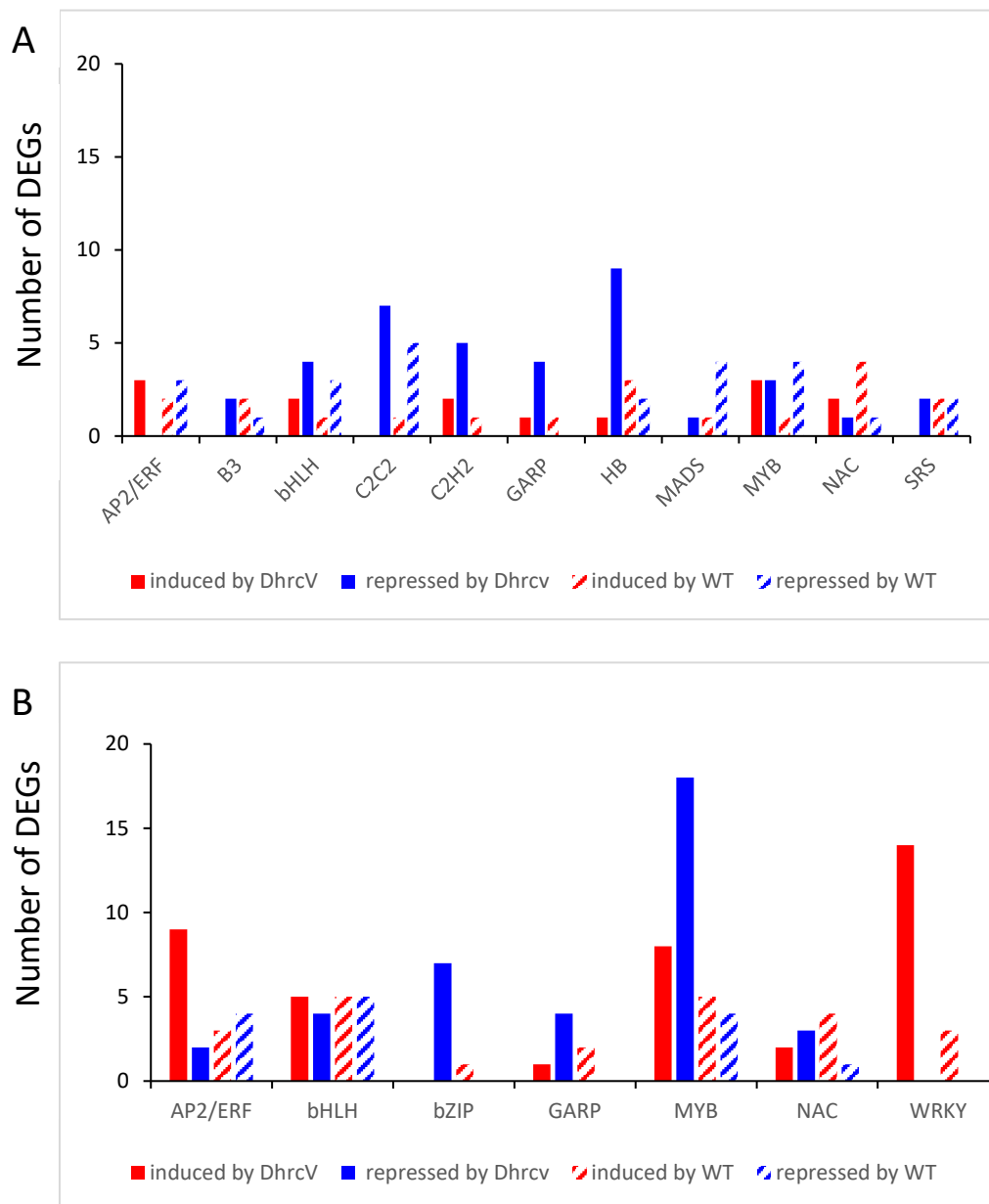


Figure 4. Number of DEGs in transcription factor superfamilies. Lists of predicted transcription factors. (A) Number of DEGs at 1dpi, (B) number of DEGs at 3dpi. Only families with at least 5 DEGs were represented. Induced (red) and repressed (blue) genes are specific to the response to *Xcc* 8004 Δ *hrcV* (solid bars) or to *Xcc* 8004 wild-type (WT, hatched bars).

Table 2 - List of enriched GO terms in shared and specific groups of DEGs at 1 and 3 dpi

Enrichment test was performed with the Parametric Analysis of Gene set Enrichment (PAGE) on AgriGO V2 (Tian et al. 2017). GO terms with at least 10 genes and a False Discovery Rate (FDR) < 0.05 were considered enriched.

^a C: cellular component, F: molecular function, P: biological process.

Group	GO Term	Ontology class ^a	Number of DEGs	Description	FDR
1dpi					
Shared	GO:0009056	P	180	catabolic process	3.5e-05
Shared	GO:0044248	P	143	cellular catabolic process	5.9e-05
Shared	GO:0009620	P	40	response to fungus	8.5e-05
Shared	GO:0050832	P	30	defense response to fungus	0.002
Shared	GO:0009308	P	101	amine metabolic process	0.0028
Shared	GO:0009057	P	87	macromolecule catabolic process	0.0039
Shared	GO:0006519	P	118	cellular amino acid and derivative metabolic process	0.0046
Shared	GO:0006520	P	80	cellular amino acid metabolic process	0.0057
Shared	GO:0044106	P	90	cellular amine metabolic process	0.0058
Shared	GO:0031347	P	24	regulation of defense response	0.007
Shared	GO:0016052	P	48	carbohydrate catabolic process	0.0079
Shared	GO:0006952	P	164	defense response	0.012
Shared	GO:0042545	P	15	cell wall modification	0.013
Shared	GO:0080134	P	27	regulation of response to stress	0.013
Shared	GO:0009651	P	70	response to salt stress	0.013
Shared	GO:0044265	P	74	cellular macromolecule catabolic process	0.013
Shared	GO:0006950	P	386	response to stress	0.013
Shared	GO:0043436	P	150	oxoacid metabolic process	0.013
Shared	GO:0019752	P	150	carboxylic acid metabolic process	0.013
Shared	GO:0006082	P	150	organic acid metabolic process	0.013
Shared	GO:0005975	P	167	carbohydrate metabolic process	0.014
Shared	GO:0009072	P	17	aromatic amino acid family metabolic process	0.016
Shared	GO:0006970	P	76	response to osmotic stress	0.016
Shared	GO:0046394	P	88	carboxylic acid biosynthetic process	0.016
Shared	GO:0016053	P	88	organic acid biosynthetic process	0.016
Shared	GO:0042180	P	155	cellular ketone metabolic process	0.016
Shared	GO:0042435	P	17	indole derivative biosynthetic process	0.016
Shared	GO:0042434	P	20	indole derivative metabolic process	0.016
Shared	GO:0042430	P	20	indole and derivative metabolic process	0.016
Shared	GO:0048583	P	43	regulation of response to stimulus	0.016
Shared	GO:0019761	P	14	glucosinolate biosynthetic process	0.016
Shared	GO:0019758	P	14	glycosinolate biosynthetic process	0.016
Shared	GO:0016144	P	14	S-glycoside biosynthetic process	0.016
Shared	GO:0006725	P	75	cellular aromatic compound metabolic process	0.016
Shared	GO:0044281	P	275	small molecule metabolic process	0.016
Shared	GO:0051704	P	148	multi-organism process	0.016
Shared	GO:0009636	P	15	response to toxin	0.016

Shared	GO:0045087	P	47	innate immune response	0.017
Shared	GO:0051707	P	140	response to other organism	0.018
Shared	GO:0044275	P	38	cellular carbohydrate catabolic process	0.023
Shared	GO:0001666	P	13	response to hypoxia	0.023
Shared	GO:0006955	P	52	immune response	0.023
Shared	GO:0002376	P	52	immune system process	0.023
Shared	GO:0044283	P	146	small molecule biosynthetic process	0.023
Shared	GO:0019760	P	24	glucosinolate metabolic process	0.024
Shared	GO:0019757	P	24	glycosinolate metabolic process	0.024
Shared	GO:0016143	P	24	S-glycoside metabolic process	0.024
Shared	GO:0006260	P	10	DNA replication	0.025
Shared	GO:0009607	P	142	response to biotic stimulus	0.025
Shared	GO:0009814	P	28	defense response, incompatible interaction	0.027
Shared	GO:0016137	P	41	glycoside metabolic process	0.03
Shared	GO:0045088	P	11	regulation of innate immune response	0.033
Shared	GO:0019748	P	91	secondary metabolic process	0.034
Shared	GO:0006575	P	54	cellular amino acid derivative metabolic process	0.043
Shared	GO:0006790	P	50	sulfur metabolic process	0.043
Shared	GO:0009627	P	16	systemic acquired resistance	0.043
Shared	GO:0008652	P	45	cellular amino acid biosynthetic process	0.047
Shared	GO:0006720	P	24	isoprenoid metabolic process	0.037
Shared	GO:0015995	P	14	chlorophyll biosynthetic process	0.037
Shared	GO:0033014	P	15	tetrapyrrole biosynthetic process	0.034
Shared	GO:0006779	P	15	porphyrin biosynthetic process	0.034
Shared	GO:0009637	P	17	response to blue light	0.033
Shared	GO:0006396	P	19	RNA processing	0.03
Shared	GO:0071482	P	22	cellular response to light stimulus	0.03
Shared	GO:0071478	P	22	cellular response to radiation	0.03
Shared	GO:0050794	P	342	regulation of cellular process	0.027
Shared	GO:0071214	P	24	cellular response to abiotic stimulus	0.025
Shared	GO:0070271	P	31	protein complex biogenesis	0.024
Shared	GO:0065003	P	31	macromolecular complex assembly	0.024
Shared	GO:0006461	P	31	protein complex assembly	0.024
Shared	GO:0009639	P	30	response to red or far red light	0.023
Shared	GO:0015994	P	17	chlorophyll metabolic process	0.023
Shared	GO:0043933	P	35	macromolecular complex subunit organization	0.023
Shared	GO:0033013	P	18	tetrapyrrole metabolic process	0.023
Shared	GO:0006778	P	18	porphyrin metabolic process	0.023
Shared	GO:0010467	P	245	gene expression	0.018
Shared	GO:0071365	P	22	cellular response to auxin stimulus	0.016
Shared	GO:0009734	P	22	auxin mediated signaling pathway	0.016
Shared	GO:0006412	P	43	translation	0.016
Shared	GO:0046148	P	27	pigment biosynthetic process	0.016
Shared	GO:0044085	P	69	cellular component biogenesis	0.016
Shared	GO:0009658	P	29	chloroplast organization	0.016
Shared	GO:0016043	P	136	cellular component organization	0.014

Shared	GO:0042440	P	29	pigment metabolic process	0.014
Shared	GO:0009767	P	28	photosynthetic electron transport chain	0.007
Shared	GO:0022900	P	31	electron transport chain	0.0046
Shared	GO:0009314	P	125	response to radiation	0.0039
Shared	GO:0009416	P	124	response to light stimulus	0.0029
Shared	GO:0009657	P	51	plastid organization	0.0028
Shared	GO:0006091	P	85	generation of precursor metabolites and energy	0.0013
Shared	GO:0019684	P	53	photosynthesis, light reaction	0.00032
Shared	GO:0015979	P	97	photosynthesis	1.2e-06
Shared	GO:0046914	F	147	transition metal ion binding	0.0016
Shared	GO:0050660	F	17	FAD binding	0.014
Shared	GO:0003824	F	866	catalytic activity	0.015
Shared	GO:0008270	F	66	zinc ion binding	0.016
Shared	GO:0005506	F	56	iron ion binding	0.016
Shared	GO:0016881	F	25	acid-amino acid ligase activity	0.024
Shared	GO:0020037	F	43	heme binding	0.024
Shared	GO:0003723	F	69	RNA binding	0.015
Shared	GO:0005829	C	132	cytosol	4.9e-05
Shared	GO:0044437	C	56	vacuolar part	0.00015
Shared	GO:0005774	C	55	vacuolar membrane	0.0003
Shared	GO:0005773	C	110	vacuole	0.00089
Shared	GO:0005794	C	67	Golgi apparatus	0.0014
Shared	GO:0005576	C	260	extracellular region	0.0014
Shared	GO:0022626	C	15	cytosolic ribosome	0.048
Shared	GO:0010319	C	17	stromule	0.023
Shared	GO:0044444	C	962	cytoplasmic part	0.023
Shared	GO:0010598	C	11	NAD(P)H dehydrogenase complex (plastoquinone)	0.016
Shared	GO:0031224	C	480	intrinsic to membrane	0.016
Shared	GO:0009522	C	16	photosystem I	0.014
Shared	GO:0016021	C	470	integral to membrane	0.012
Shared	GO:0044425	C	570	membrane part	0.011
Shared	GO:0042170	C	54	plastid membrane	0.0048
Shared	GO:0031969	C	54	chloroplast membrane	0.0048
Shared	GO:0019898	C	14	extrinsic to membrane	0.0045
Shared	GO:0031978	C	25	plastid thylakoid lumen	0.0036
Shared	GO:0009543	C	25	chloroplast thylakoid lumen	0.0036
Shared	GO:0010287	C	27	plastoglobule	0.0036
Shared	GO:0005840	C	36	ribosome	0.002
Shared	GO:0009523	C	26	photosystem II	0.0014
Shared	GO:0031977	C	29	thylakoid lumen	0.0013
Shared	GO:0030529	C	44	ribonucleoprotein complex	0.00055
Shared	GO:0043234	C	126	protein complex	0.00042
Shared	GO:0031090	C	295	organelle membrane	0.0003
Shared	GO:0009521	C	37	photosystem	0.00015
Shared	GO:0032991	C	171	macromolecular complex	2.2e-06
Shared	GO:0009570	C	177	chloroplast stroma	1.7e-06

Shared	GO:0044446	C	528	intracellular organelle part	1.1e-06
Shared	GO:0044422	C	529	organelle part	9.3e-07
Shared	GO:0009532	C	181	plastid stroma	9.1e-07
Shared	GO:0031975	C	195	envelope	1.4e-07
Shared	GO:0031967	C	195	organelle envelope	1.4e-07
Shared	GO:0009941	C	174	chloroplast envelope	3.2e-09
Shared	GO:0009526	C	179	plastid envelope	1.2e-09
Shared	GO:0009536	C	614	plastid	3.3e-11
Shared	GO:0055035	C	147	plastid thylakoid membrane	1.1e-11
Shared	GO:0009535	C	147	chloroplast thylakoid membrane	1.1e-11
Shared	GO:0009507	C	607	chloroplast	7.9e-12
Shared	GO:0042651	C	151	thylakoid membrane	7.9e-12
Shared	GO:0034357	C	153	photosynthetic membrane	4.8e-12
Shared	GO:0044436	C	158	thylakoid part	2.3e-12
Shared	GO:0031984	C	175	organelle subcompartment	1.9e-12
Shared	GO:0031976	C	172	plastid thylakoid	3.1e-13
Shared	GO:0009534	C	172	chloroplast thylakoid	3.1e-13
Shared	GO:0009579	C	192	thylakoid	5.6e-14
Shared	GO:0044434	C	367	chloroplast part	4.7e-16
Shared	GO:0044435	C	369	plastid part	4.7e-16
Δ hrcV	GO:0009505	C	12	plant-type cell wall	0.0027
Δ hrcV	GO:0044427	C	12	chromosomal part	0.0029
Δ hrcV	GO:0000785	C	11	chromatin	0.0076
Δ hrcV	GO:0071212	C	14	subsynaptic reticulum	0.015
Δ hrcV	GO:0044432	C	14	endoplasmic reticulum part	0.015
Δ hrcV	GO:0030312	C	24	external encapsulating structure	0.031
Δ hrcV	GO:0005618	C	24	cell wall	0.031
Δ hrcV	GO:0005694	C	18	chromosome	0.031
Δ hrcV	GO:0055044	C	37	symplast	0.031
Δ hrcV	GO:0030054	C	37	cell junction	0.031
Δ hrcV	GO:0009506	C	37	plasmodesma	0.031
Δ hrcV	GO:0005911	C	37	cell-cell junction	0.031
Δ hrcV	GO:0055035	C	58	plastid thylakoid membrane	0.031
Δ hrcV	GO:0042651	C	58	thylakoid membrane	0.031
Δ hrcV	GO:0009535	C	58	chloroplast thylakoid membrane	0.031
Δ hrcV	GO:0034357	C	59	photosynthetic membrane	0.031
Δ hrcV	GO:0009579	C	76	thylakoid	0.031
Δ hrcV	GO:0044436	C	63	thylakoid part	0.031
Δ hrcV	GO:0031984	C	68	organelle subcompartment	0.021
Δ hrcV	GO:0031976	C	68	plastid thylakoid	0.021
Δ hrcV	GO:0009534	C	68	chloroplast thylakoid	0.021
Δ hrcV	GO:0009507	C	255	chloroplast	0.015
Δ hrcV	GO:0009536	C	256	plastid	0.015
Δ hrcV	GO:0044434	C	150	chloroplast part	0.015
Δ hrcV	GO:0044435	C	152	plastid part	0.015
WT	-	-	-	-	-

3dpi					
Shared	GO:0046872	F	33	metal ion binding	0.0045
Shared	GO:0043169	F	33	cation binding	0.0045
Shared	GO:0043167	F	33	ion binding	0.0045
Shared	GO:0016491	F	20	oxidoreductase activity	0.044
Shared	GO:0046914	F	20	transition metal ion binding	0.06
Δ hrcV	GO:0006952	P	73	defense response	0.0027
Δ hrcV	GO:0045087	P	21	innate immune response	0.02
Δ hrcV	GO:0042743	P	10	hydrogen peroxide metabolic process	0.02
Δ hrcV	GO:0006800	P	10	oxygen and reactive oxygen species metabolic process	0.02
Δ hrcV	GO:0044264	P	28	cellular polysaccharide metabolic process	0.049
Δ hrcV	GO:0016051	P	36	carbohydrate biosynthetic process	0.04
Δ hrcV	GO:0034637	P	34	cellular carbohydrate biosynthetic process	0.03
Δ hrcV	GO:0006073	P	20	cellular glucan metabolic process	0.02
Δ hrcV	GO:0044042	P	22	glucan metabolic process	0.013
Δ hrcV	GO:0044085	P	36	cellular component biogenesis	0.0048
Δ hrcV	GO:0070882	P	25	cellular cell wall organization or biogenesis	0.0048
Δ hrcV	GO:0042546	P	25	cell wall biogenesis	0.0048
Δ hrcV	GO:0030554	F	103	adenyl nucleotide binding	0.0022
Δ hrcV	GO:0001883	F	103	purine nucleoside binding	0.0022
Δ hrcV	GO:0001882	F	103	nucleoside binding	0.0022
Δ hrcV	GO:0017076	F	107	purine nucleotide binding	0.0039
Δ hrcV	GO:0032559	F	89	adenyl ribonucleotide binding	0.014
Δ hrcV	GO:0000166	F	121	nucleotide binding	0.014
Δ hrcV	GO:0016301	F	66	kinase activity	0.014
Δ hrcV	GO:0004674	F	39	protein serine/threonine kinase activity	0.018
Δ hrcV	GO:0032555	F	93	purine ribonucleotide binding	0.018
Δ hrcV	GO:0032553	F	93	ribonucleotide binding	0.018
Δ hrcV	GO:0016773	F	49	phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	0.018
Δ hrcV	GO:0004672	F	43	protein kinase activity	0.02
Δ hrcV	GO:0016772	F	70	transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	0.02
Δ hrcV	GO:0005524	F	85	ATP binding	0.02
Δ hrcV	GO:0046527	F	12	glucosyltransferase activity	0.02
Δ hrcV	GO:0035251	F	12	UDP-glucosyltransferase activity	0.02
Δ hrcV	GO:0008194	F	17	UDP-glycosyltransferase activity	0.018
Δ hrcV	GO:0016757	F	36	transferase activity, transferring glycosyl groups	0.0022
Δ hrcV	GO:0016758	F	28	transferase activity, transferring hexosyl groups	0.002
WT	GO:0042592	P	12	homeostatic process	0.00073
WT	GO:0009733	P	15	response to auxin stimulus	0.047
WT	GO:0009908	P	12	flower development	0.046
WT	GO:0010467	P	94	gene expression	0.046
WT	GO:0031224	C	102	intrinsic to membrane	0.039
WT	GO:0016021	C	97	integral to membrane	0.039
WT	GO:0044445	C	14	cytosolic part	0.04

WT	GO:0033279	C	14	ribosomal subunit	0.04
WT	GO:0005730	C	23	nucleolus	0.039
WT	GO:0044459	C	41	plasma membrane part	0.039
WT	GO:0055044	C	33	symplast	0.039
WT	GO:0030054	C	33	cell junction	0.039
WT	GO:0009506	C	33	plasmodesma	0.039
WT	GO:0005911	C	33	cell-cell junction	0.039
WT	GO:0022626	C	15	cytosolic ribosome	0.039
WT	GO:0043234	C	32	protein complex	0.039
WT	GO:0005840	C	16	ribosome	0.039
WT	GO:0030312	C	32	external encapsulating structure	0.023
WT	GO:0005618	C	32	cell wall	0.023
WT	GO:0005654	C	11	nucleoplasm	0.014
WT	GO:0043232	C	50	intracellular non-membrane-bounded organelle	0.01
WT	GO:0043228	C	50	non-membrane-bounded organelle	0.01
WT	GO:0070013	C	36	intracellular organelle lumen	0.01
WT	GO:0043233	C	36	organelle lumen	0.01
WT	GO:0031974	C	36	membrane-enclosed lumen	0.01
WT	GO:0030529	C	24	ribonucleoprotein complex	0.01
WT	GO:0044428	C	34	nuclear part	0.01
WT	GO:0031981	C	31	nuclear lumen	0.01
WT	GO:0032991	C	54	macromolecular complex	0.0091

Discussion

Même si le génome de TO1000 est disponible et annoté, j'ai choisi de travailler avec les gènes orthologues chez *A. thaliana*, car la description des gènes de TO1000 n'est pas encore aussi complète que celle d'*A. thaliana* (Yates et al., 2022). 73% des gènes « mappés » sur TO1000 ont un orthologue chez *A. thaliana*. 27% des gènes n'ont pas d'orthologue, donc ils n'ont pas été analysés en termes d'enrichissement GO. En plus de cela, une partie des gènes avec un orthologue chez *A. thaliana* sont en copies multiplies car plusieurs gènes de chou-fleur correspondent à un seul gène d'*A. thaliana*. La triplication du génome du chou-fleur fait qu'il y a beaucoup de gènes en plusieurs copies et des paralogues, par rapport à *A. thaliana*. Pour faire les analyses de GO, il faut que les gènes soient uniques. J'ai donc gardé un seul exemplaire des gènes en copies multiples. Cela veut dire que plus 25% des DEGs n'ont pas été analysés, cela a pu apporter un biais dans l'analyse. Pour améliorer l'analyse, il serait envisageable de réaliser une annotation directement sur la fonction des gènes et les GO de *B. oleracea* TO1000.

La macrodissection des hydathodes pour faire de la transcriptomique des hydathodes peut apparaître comme une méthode approximative. En effet, des emporte-pièces de 1,5mm de diamètre ont été utilisés pour prélever les hydathodes de chou-fleur trois fois plus petits (0,5 millimètre). Si on peut craindre que le signal de l'épithème soit dilué par les transcrits du mésophylle alentour et de l'épiderme, ces transcrits ne réagissaient certainement pas à *Xcc*, comme les tissus de la condition contrôle, donc ils ont peu de chance d'apparaître comme des DEGs artificiels. Nous avons envisagé de faire de la microdissection laser pour prélever uniquement l'épithème, mais cette méthode comporte plusieurs limitations techniques : pour effectuer la microdissection, il faut fixer les échantillons et cette étape endommage les ARN ; il faut une plus grande quantité de matériel végétal pour obtenir assez d'ARN à séquencer ; et tout cela coûte bien plus de temps et d'argent que la macrodissection. Au final, la macrodissection est une méthode relativement simple à mettre en œuvre qui est satisfaisante pour l'utilisation que nous en avons fait. Il était toutefois important d'obtenir une infection de 100% des hydathodes, afin d'éviter la dilution du signal par des tissus non infectés.

Les résultats présentés dans cet article montrent une réponse métabolique forte des hydathodes du chou-fleur lors de l'infection par *Xcc* : la photosynthèse est réprimée, et l'est d'autant plus si l'agent pathogène est avirulent. Les voies de défenses sont aussi activées, avec une signalisation hormonale importante. Un des mécanismes de défense détecté pourrait être la modification des parois cellulaires, probablement pour les renforcer et limiter la propagation des bactéries.

Un résultat qui m'a surpris est le clustering des échantillons (**Figure 2 de l'article**). Il montre à 1dpi qu'il n'y a pas ou peu de différences de réponse des hydathodes aux deux souches : deux des réplicats biologiques des hydathodes infectés avec *Xcc* sauvage et avec *Xcc* mutant $\Delta hrcV$ se regroupent sans distinction entre les souches, et le dernier réplicat biologique est plus semblable aux trois échantillons inoculés avec la solution mock. On ne peut exclure que les échantillons aient été mélangés par des petites mains étourdies. Pour écarter cette hypothèse, des échantillons indépendants seront produits et analysés par qRT-PCR. Néanmoins, s'il était confirmé, ce résultat pourrait être biologiquement important. A ce stage précoce de l'infection, les réponses transcriptionnelles des hydathodes à un *Xcc* virulent et avirulent sont majoritairement identiques, suggérant qu'à ce stade, la bactérie virulente n'a pas encore perturbé les réponses immunitaires des hydathodes. Ce n'est en effet que plus tard dans l'interaction que se mettent en place des réponses spécifiques. À 3dpi, les échantillons regroupés par souche et le faible nombre de DEGs suggèrent que les réactions de défenses sont en phase descendantes en réponse à la souche avirulente et que la souche virulente supprime activement les défenses mises en place contre elle.

Deux gènes candidats ont été découverts, les orthologues de *AtRLP54* et *PRX17*. Par la suite, il faudra confirmer leur profil d'expression en réponse aux bactéries par qRT-PCR. Puisqu'ils sont réprimés spécifiquement en réponse à la souche de *Xcc* virulente, il est possible qu'ils soient des gènes de résistance du chou-fleur à *Xcc*. Afin de tester leur fonction dans l'immunité, il sera possible de phénotyper des mutants d'*A. thaliana* pour ces gènes, ou de voir s'ils ressortent lors du crible de mutants HEM (**voir Chapitre 3 Partie 2**).

Par ailleurs, pour étudier si la réponse de la plante qui est décrite dans ces résultats est spécifique ou non du T3SS de *Xcc*, il sera possible d'utiliser d'autres mutants avirulents de *Xcc* : des mutants d'autres facteurs de virulence, comme les gènes du cluster *rpf* (regulation of pathogenicity factors) ou du cluster *gum* (exopolysaccharides), ou encore des gènes impliqués dans l'acquisition des nutriments.

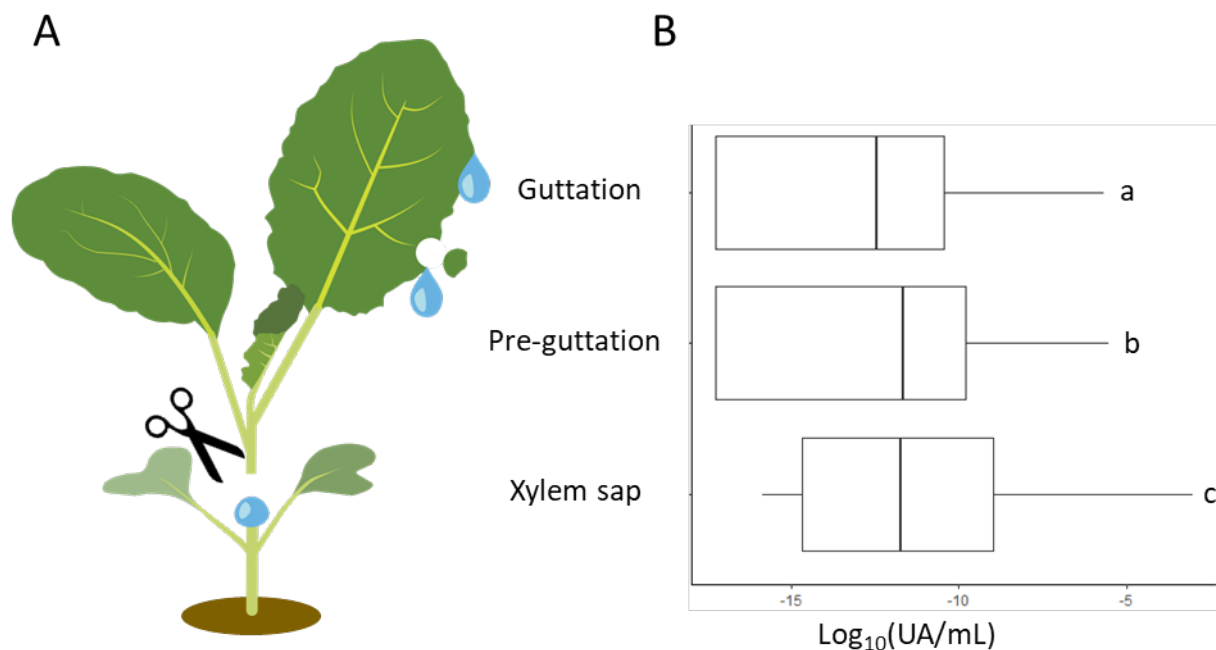


Figure 3.1. Les hydathodes du chou-fleur réabsorbent une partie des métabolites de la sève du xylème. (A) Sur chaque plante, la guttation est récoltée au niveau des hydathodes. La pré-guttation désigne le liquide qui sort des feuilles lorsque les hydathodes sont macro-disséqués. Enfin la sève du xylème est récoltée une heure après décapitation des plants, sur la tige au-dessus des cotylédons. (B) Concentration des métabolites (en log(unité arbitraire par mL)) de la sève du xylème et de la guttation de *Brassica oleracea* var. *botrytis* cv. Clovis. Chaque fluide est récolté sur la deuxième feuille de 12 plantes de 4 semaines, après une nuit dans des conditions induisant la guttation. Les métabolites ont été mesurés par GC-MS (Gilles Clément, IJPB Versailles). Les résultats sont issus de 4 réplicats biologiques indépendants. Les différentes lettres indiquent les groupes statistiques selon le test de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,01$).

1. 3. Les hydathodes jouent un rôle important dans la capture des solutés du fluide de guttation

Contexte

Les ions et les minéraux sont absorbés par les racines des plantes et sont transloqués dans le reste de la plante par les vaisseaux du xylème. Ainsi la concentration de la sève de xylème est de plus en plus faible en remontant dans la tige et les feuilles (Nagai et al., 2013). Le fluide de guttation, qui s'échappe des feuilles par les hydathodes, est vraisemblablement un dérivé de la sève de xylème, puisque l'épithème des hydathodes est directement connecté à des vaisseaux du xylème. La question qui se pose est : est-ce que l'épithème (ici du chou-fleur) est capable de capturer ou re-larger des nutriments dans le fluide de guttation ? Par exemple, l'unique hydathode apical de l'orge est capable d'absorber le phosphate inorganique présent dans le fluide de guttation pour le re-transloquer vers le reste de la feuille (Nagai et al., 2013). À l'inverse, cet hydathode extrude des ions chlorure dans le fluide de guttation. Cela suggère une implication active des hydathodes dans la composition du fluide de guttation.

Composition de la guttation chez le chou-fleur

J'ai mis au point les conditions de guttation chez le chou-fleur cv. Clovis, pour améliorer la reproductibilité et permettre des analyses métabolomiques reproductibles par GC-MS. Dans cette expérience, les concentrations sont données en unité arbitraire car la mesure de certains composés de la sève du xylème est saturée par leur très forte concentration (**Figure 3.1**). Le fluide de « pré-guttation », récolté avant les hydathodes macro-disséqués (**Figure 3.1A**), a une concentration totale 5,6 fois moins élevée que la sève de xylème, mais 1,7 fois plus élevée que le fluide de guttation. Les concentrations les plus élevées ont été mesurées dans la sève de xylème récoltée à la base de la tige (**Figure 3.1B**). La concentration des métabolites suit donc un gradient de la base de la tige à la bordure des feuilles et les hydathodes semblent capables de capturer une partie de ces métabolites. Les fluides de guttation et de pré-guttation contiennent différents acides aminés, des sucres et des acides organiques listés dans le **Tableau 3.1**. Une partie des composés mesurés est significativement moins concentrée dans la guttation que dans la pré-guttation (en gras dans le **Tableau 3.1**, d'après le test de Student unilatéral et apparié, p -value <0.05), comme c'est le cas pour la majorité des sucres, pour le citrate, le malate, le succinate et le fumarate, ou encore certains acides aminés comme la valine et la leucine. 93 composés non identifiés ne sont pas présentés.

Tableau 3.1. Composition du fluide de guttation, de pré-guttation et de la sève du xylème du chou-fleur, déterminée par GC-MS.

Les composés indiqués en gras dans la colonne guttation sont significativement moins concentrés que dans la pré-guttation, selon le test de Student unilatéral et apparié (p-values <0.05).

^a Classe des métabolites. AA : acides aminés, SUG : sucres, OA : acides organiques, MA : acides minéraux, PHOSPHO : composés phosphatés, OTHER : autres.

^b Moyenne de la concentration (UA) des métabolites de quatre réplicats biologiques indépendants.

Name	Class ^a	Guttation ^b	Pre-guttation ^b	Xylem sap ^b
Amino acids				
Serine	AA	1,72E-04	1,45E-04	1,93E-03
Glycine	AA	8,11E-05	6,53E-05	3,06E-04
Threonine	AA	5,18E-05	4,50E-05	5,04E-03
Arginine	AA	4,79E-05	2,93E-05	2,97E-03
Valine	AA	2,01E-05	2,78E-05	5,95E-03
Leucine	AA	1,61E-05	2,72E-05	1,66E-03
Phenylalanine	AA	1,57E-05	3,95E-05	5,48E-04
Aspartate	AA	1,57E-05	5,34E-05	7,94E-03
Tyrosine	AA	1,09E-05	1,73E-05	2,70E-03
Alanine	AA	1,03E-05	6,72E-06	1,18E-03
Proline	AA	9,18E-06	1,01E-05	1,46E-04
Lysine	AA	9,00E-06	5,62E-05	8,54E-03
Isoleucine	AA	4,62E-06	3,20E-08	5,12E-03
Glutamate	AA	2,18E-06	5,99E-06	9,97E-04
GABA	AA	1,34E-06	9,54E-05	2,02E-03
Cystein	AA	3,20E-08	8,97E-07	7,62E-05
Glutamine	AA	3,20E-08	3,20E-08	4,97E-02
Asparagine	AA	3,20E-08	3,20E-08	5,63E-03
beta-Alanine	AA	3,20E-08	3,20E-08	6,51E-04
Methionine	AA	3,20E-08	3,20E-08	4,28E-04
Tryptophan	AA	3,20E-08	3,20E-08	3,00E-04
O-Acetyl-serine	AA	3,20E-08	3,20E-08	2,66E-04
trans-3-hydroxy-Proline	AA	3,20E-08	3,20E-08	2,47E-04
S-Methyl-L-cysteine	AA	3,20E-08	3,20E-08	7,95E-05
Methionine sulfoxide	AA	3,20E-08	3,20E-08	3,04E-05
Homoserine	AA	3,20E-08	3,20E-08	2,35E-05
a-Aminoadipate	AA	3,20E-08	3,20E-08	2,19E-05
alphaaminobutyrate	AA	3,20E-08	3,20E-08	1,31E-05
b-aminoisobutyrate	AA	3,20E-08	3,20E-08	9,29E-06
Sugars				
2-desoxypentitol	SUG	2,63E-04	3,51E-04	1,28E-07
Sucrose	SUG	2,58E-04	3,96E-04	2,96E-03
Arabinose	SUG	1,66E-04	1,46E-04	1,13E-04
Fructose	SUG	1,07E-04	2,15E-04	1,95E-03
Galactose	SUG	1,02E-04	1,92E-04	2,51E-04
anhydroglucose	SUG	7,31E-05	1,05E-04	1,28E-07

Glucose	SUG	6,35E-05	1,04E-04	2,54E-03
Xylulose	SUG	5,70E-05	7,56E-05	1,28E-07
Ribose	SUG	3,97E-05	5,19E-04	5,85E-05
fucose	SUG	2,02E-05	1,93E-05	6,53E-06
Galactosylglycerol	SUG	1,54E-05	1,29E-03	2,77E-05
Rhamnose	SUG	7,97E-06	8,84E-06	2,93E-06
Digalactosylglycerol	SUG	6,55E-06	7,23E-04	1,24E-05
Gentiobiose	SUG	2,20E-06	2,23E-06	1,28E-07
pentofuranose	SUG	1,45E-06	1,89E-06	1,28E-07
Xylose	SUG	1,01E-06	3,30E-06	6,40E-06
Glucopyranose	SUG	8,12E-07	5,24E-06	7,87E-05
Cellobiose	SUG	3,20E-08	3,92E-06	3,52E-05
Organic acids				
Citrate	OA	6,25E-04	3,96E-03	2,91E-03
Lactate	OA	5,71E-04	4,62E-04	1,75E-04
Lyxonate	OA	5,64E-05	4,59E-05	1,28E-07
Pentonatelactone-1	OA	1,83E-05	4,72E-05	1,28E-07
Galactaric acid	OA	9,28E-06	9,50E-06	1,28E-07
Succinate	OA	6,70E-06	2,24E-05	1,37E-03
Glycolate	OA	5,44E-06	6,62E-06	3,74E-05
Malate	OA	5,28E-06	6,01E-05	9,78E-03
2-Hydroxysuccinamate	OA	5,08E-06	9,14E-06	1,28E-07
Fumarate	OA	2,08E-06	1,68E-05	1,26E-04
Glycerate	OA	1,45E-06	4,50E-06	5,64E-05
Aconitate	OA	1,13E-06	1,91E-05	9,02E-06
Galactaric acid lactone	OA	1,13E-06	9,37E-07	1,28E-07
Threonate	OA	9,94E-07	3,24E-05	1,56E-05
Benzoate	OA	7,67E-07	3,20E-08	8,69E-06
Quinate	OA	6,47E-07	1,08E-06	1,28E-07
Shikimate	OA	4,58E-07	3,20E-08	2,86E-05
Galactonate	OA	3,20E-08	7,41E-05	1,28E-07
Gluconate	OA	3,20E-08	1,20E-05	3,19E-07
Galacturonate	OA	3,20E-08	1,94E-06	2,23E-05
Thiazolidine-4-carboxylate	OA	3,20E-08	3,20E-08	1,05E-03
2-Oxoglutarate	OA	3,20E-08	3,20E-08	2,73E-04
Maleate	OA	3,20E-08	3,20E-08	1,74E-04
Pyruvate	OA	3,20E-08	3,20E-08	1,09E-05
Pantothenate	OA	3,20E-08	3,20E-08	5,86E-06
Nicotinate	OA	3,20E-08	3,20E-08	2,93E-06
Pipecolate	OA	3,20E-08	3,20E-08	2,77E-06
Pyrrole-2-carboxylate	OA	3,20E-08	3,20E-08	7,91E-07
Glucuronate	OA	3,20E-08	3,20E-08	6,93E-07
Mineral acids				
Borate	MA	1,20E-03	1,74E-03	2,23E-04
Phosphorylated compounds				
Phosphate	PHOSPHO	1,31E-03	1,90E-03	1,18E-02
Glycerol-3-P	PHOSPHO	3,20E-08	3,20E-08	5,83E-05
Glucose-6-P	PHOSPHO	3,20E-08	3,20E-08	3,31E-06
Ethanolamine-P	PHOSPHO	3,20E-08	3,20E-08	2,27E-06

Fructose-6-P	PHOSPHO	3,20E-08	3,20E-08	7,23E-07
Others				
Glycerol	OTHER	8,90E-04	1,00E-03	2,37E-04
1-(4-hydroxyphenyl)ethane-1,2-diol	OTHER	4,21E-04	5,87E-04	2,43E-06
Erythritol	OTHER	2,43E-04	3,51E-04	1,28E-07
myo-Inositol	OTHER	1,44E-04	5,01E-04	7,86E-04
Urea1	OTHER	1,21E-04	1,24E-04	3,38E-05
Galactitol	OTHER	8,31E-05	1,04E-04	1,28E-07
butanetriol2	OTHER	8,23E-05	1,13E-04	1,28E-07
1,2,3-Propanetriol, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)	OTHER	8,04E-05	3,06E-05	6,54E-07
Threitol	OTHER	7,01E-05	1,17E-04	1,15E-06
Triethylamine	OTHER	4,33E-05	7,69E-05	2,02E-05
Mannitol	OTHER	3,63E-05	4,46E-05	2,04E-06
Urea2	OTHER	3,49E-05	3,40E-05	2,12E-05
butanetriol	OTHER	3,24E-05	4,75E-05	1,28E-07
Allantoin	OTHER	2,20E-05	7,88E-05	1,41E-05
Inositol-1	OTHER	1,61E-05	2,70E-05	1,28E-07
Sorbitol	OTHER	1,35E-05	1,02E-05	1,28E-07
pentitoldesoxy	OTHER	1,35E-05	1,42E-05	1,28E-07
Pinitol	OTHER	1,10E-05	5,30E-06	1,28E-07
Deoxy-Pentitol	OTHER	8,38E-06	1,33E-05	1,28E-07
Ethanolamine	OTHER	3,58E-06	6,77E-06	9,52E-05
Adenine-1	OTHER	3,20E-08	5,14E-06	5,60E-06
Uracil	OTHER	3,20E-08	4,40E-06	7,78E-06
Putrescine	OTHER	3,20E-08	3,20E-08	2,32E-05
Spermidine	OTHER	3,20E-08	3,20E-08	7,12E-06
N-acetylhexosamine	OTHER	3,20E-08	3,20E-08	1,40E-06
Phenylethylamine	OTHER	3,20E-08	3,20E-08	3,77E-07

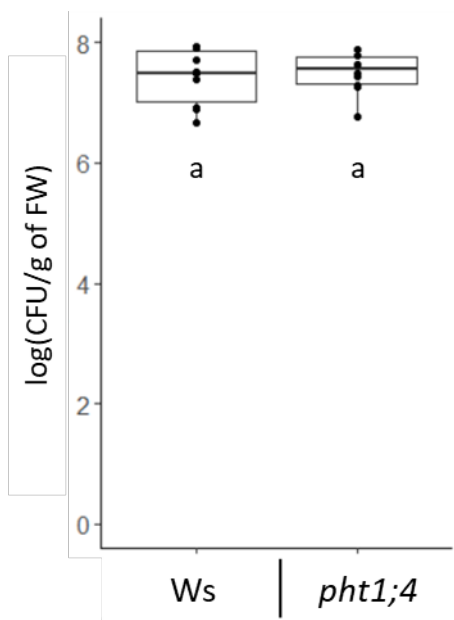


Figure 3.2. Le transporteur de phosphate PHT1;4, spécifique des hydathodes, n'impacte pas la croissance de *Xcc* chez *A. thaliana*. Population bactérienne (en CFU/g de matière fraîche) de la souche *Xcc* 8004 Δ *xopAC* dans les plantes entières d'*Arabidopsis thaliana* de l'accession Ws sauvage et le mutant *pht1;4* 8 jours après inoculation. L'inoculation a été effectuée par pulvérisation d'une suspension bactérienne à 10^7 CFU/mL. Deux expériences indépendantes ont été effectuées sur 4 et 6 plantes de chaque accession. Aucune différence statistique significative n'a été observée entre les deux groupes (Test non paramétrique de Kruskal-Wallis, $\alpha = 0,05$).

Discussion

Une grande majorité des métabolites du chou-fleur sont plus concentrés dans la sève de xylème que dans la (pré-)guttation. En traversant la feuille, ces différents composés sont distribués dans les cellules du limbe pour contribuer au métabolisme des cellules.

Cette expérience montre la présence de sucres, acide aminés, acides organiques et autres dans la guttation de chou-fleur, comme il avait été précédemment observé dans d'autres espèces végétales comme le blé, le maïs, l'orge, l'avoine, le seigle ou encore *A. thaliana* (Goatley and Lewis, 1966; Perrin, 1972; Mizuno et al., 2002; Pilot et al., 2004). Malgré l'impossibilité de mesurer les concentrations absolues des métabolites du fluide de guttation, ces autres études permettent d'estimer leur ordre de grandeur : les sucres sont mesurés à 1-10mg/L. La concentration des ions est très variable selon celui que l'on considère : cela varie de quelques dizaines de mg/L pour le potassium à environ 1mg/L pour le calcium et le fer, ou encore des centièmes de mg/L pour le cuivre, l'aluminium ou le bore.

Dans le contexte des interactions entre *Xcc* et les Brassicacées, cette expérience nous permet de lister les composés qui peuvent être potentiellement utilisés par la bactérie dans l'épithème. Plus tôt dans l'interaction, ce sont aussi des candidats de chimiotactisme qui pourraient attirer *Xcc* vers le fluide de guttation. Sachant que l'accès au phosphate inorganique (Pi) dans les hydathodes pourrait être un facteur limitant pour la multiplication des bactéries (Luneau et al., 2022b), il pourrait y avoir une compétition entre *Xcc* et la plante pour le Pi durant l'infection. Dans l'hypothèse où la plante pourrait affecter la virulence de *Xcc* en modulant la concentration en Pi dans le fluide de guttation, j'ai comparé la multiplication de *Xcc* dans les rosettes d'*A. thaliana* sauvage et dans un mutant *pht1;4*. Ce gène code pour un importeur haute affinité du Pi, qui est spécifiquement induit dans les hydathodes (Misson et al., 2004). Les résultats de deux expériences indépendantes montrent qu'il n'y a pas de différences de croissance de *Xcc* entre les deux lignées de plantes (**Figure 3.2**). Il est à noter que d'après les résultats de l'**Annexe I (Figure 5)**, le fluide de guttation de l'accession sauvage d'*A. thaliana* contient 4ng de Pi/ μ L, alors que la guttation du mutant *pht1;4* en contient environ 11ng/ μ L. La différence entre les deux étant statistiquement significative, *PHT1;4* sert bien à capturer du Pi dans les hydathodes. Cependant, il est probable que la différence de concentration entre l'accession sauvage et le mutant soit insuffisante pour affecter la croissance de *Xcc*. Pour qu'*A. thaliana* puisse gagner la compétition pour le Pi contre *Xcc*, il lui faudrait un contrôle plus strict de la teneur en Pi du fluide de guttation.

D'autre part, cette analyse de la composition des différents fluides de chou-fleur va dans le sens des résultats de l'**Annexe I** : chez *A. thaliana* aussi, le fluide de guttation est moins concentré que la pré-guttation, elle-même moins concentrée que la sève du xylème. Chez le chou-fleur et *A. thaliana*, une partie des acides aminés, des sucres et des acides organiques mesurés sont en commun. Dans les deux cas l'aspartate, le GABA, la leucine, le fructose et le galactose font partie des composés les plus abondants dans le fluide de guttation, et sont significativement moins concentrés que dans la pré-guttation. Il y a aussi des variations d'abondance et de composition qui soulignent la spécificité des espèces. Il serait intéressant d'étudier la spécificité d'hôte via le prisme du fluide de guttation. Est-ce que les différences entre *A. thaliana* et le chou-fleur sont suffisantes pour affecter l'attraction de *Xcc* vers les hydathodes, ou sa multiplication dans le fluide de guttation ? Est-ce qu'étendu à d'autres espèces végétales et d'autres agents pathogènes cela pourrait expliquer, au moins en partie, le faible nombre d'agents pathogènes capable d'infecter les plantes par leurs hydathodes ?

Comme il est souligné par les résultats des **Annexes I et II**, les hydathodes de chou-fleur (et d'*A. thaliana*) sont des organes renfermant une activité de nombreux transporteurs dont le rôle est certainement lié à la capture des métabolites du fluide de guttation. Et en effet, l'expérience présentée précédemment a montré que les hydathodes ont bien un rôle de réabsorption de certains métabolites, puisque nous avons vu que la concentration totale du fluide de guttation est plus concentrée que la pré-guttation, avec une comparaison en détail de chaque métabolite mesuré. Aucun métabolite mesuré n'était plus concentré dans la pré-guttation par rapport à la guttation. Si c'est le cas pour certains métabolites, soient les variations biologiques entre les échantillons étaient trop fortes pour détecter une différence, soit notre méthode de mesure ne détectait pas ce type de métabolites.

À présent, il reste à comprendre le rôle biologique de cette capture des métabolites dans les hydathodes. Est-ce que cela permet d'éviter que les nutriments de la sève du xylème soient perdus dans la guttation ? Cela a-t-il un rôle dans l'immunité des hydathodes ? Il faut aussi se demander ce qu'il advient de ces métabolites. Il est possible qu'ils soient utilisés par l'épithème pour ses propres besoins métaboliques ou bien qu'ils soient remobilisés vers le reste de la feuille.

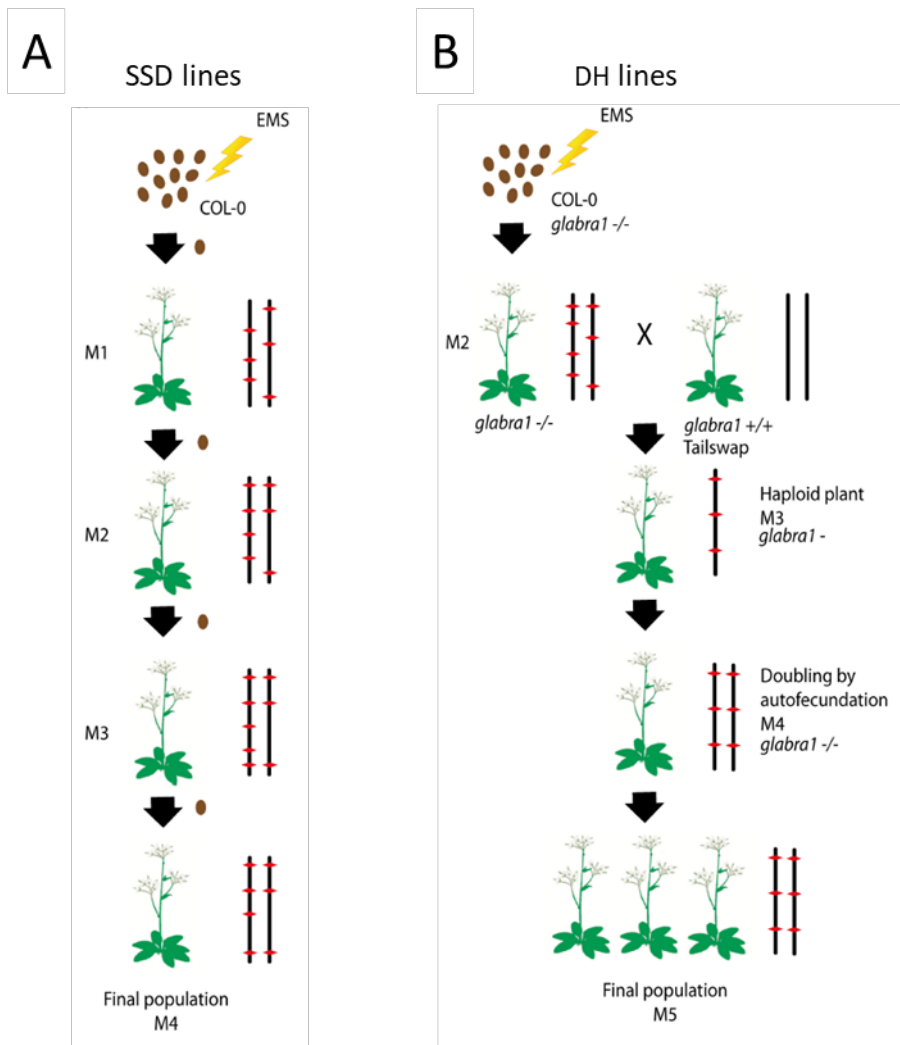


Figure 3.3. Schéma explicatif des deux méthodes de génération des lignées HEM (Homozygous EMS Mutants). (A) Après mutation de graines de l'accession d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 à l'EMS, 698 graines ont été germées et les plantes obtenues auto-fécondées. Quatre générations sont ainsi obtenues en utilisant une seule graine par lignée. Ce sont les lignées SSD (Single Seed Descents). (B) Des graines de Col-0 portant une mutation dans le gène *GLABRA1*, ont été mutagénisées à l'EMS. Les plantes cultivées à partir de ces graines sont glabres à cause de la mutation *glabra1*. Ces plantes ont été croisées avec une lignée induisant l'haploïdie (Tailswap) dans la génération suivante. Les plantes de la génération M3 haploïdes sont identifiées par leur absence de poils. L'autofécondation des plantes M3 permet d'obtenir des plantes diploïdes, qui sont à leur tour autofécondées pour obtenir la génération finale. Ce sont les lignées DH (Doubled Haploid). Pour chaque génération, les chromosomes sont représentés avec un trait. Le rouge indique les mutations causées par l'EMS. Capilla-Perez *et al.*, 2018.

Partie 2 : Identification de gènes impliqués dans l'immunité des hydathodes et du système vasculaire d'*Arabidopsis thaliana*

2. 1. Contexte

Dans ce second chapitre, central pour mon projet de thèse, l'objectif est d'identifier les gènes impliqués dans l'immunité des hydathodes, ainsi que du système vasculaire d'*A. thaliana* en réponse à *Xcc*. En effet, en dehors d'une étude sur l'immunité pré-invasive des hydathodes (Cerutti et al., 2017), il n'y a pas eu d'analyse de l'immunité post-invasive des hydathodes. Une approche classique pour identifier des gènes liés à un phénotype chez *A. thaliana* est de cribler une population de quelques dizaines de milliers de mutants, chacun portant des mutations en ségrégation pour une partie des gènes. Un frein important à ce type d'expérience existe dans notre système : l'étude des hydathodes est difficile. Les méthodes d'inoculation des plantes par blessure ne sont pas envisageables ici car elles passent à côté de l'immunité des hydathodes. De plus, le trempage (Hugouvieux et al., 1998) ou l'inoculation de chaque hydathode individuel (Robeson et al., 1989) sont des techniques très laborieuses à mettre en œuvre dans le cadre d'un criblage. Cela signifie que nous avons besoin (i) d'une population de mutants plus petite, mais qui permet tout de même de tester un maximum de gènes, et (ii) d'une méthode de crible adaptée à l'infection à grande échelle des hydathodes d'*A. thaliana*. Ce sont les solutions à ces deux problèmes qui sont présentés ici, suivies des résultats du crible.

2. 2. Les lignées HEM : outils pour un criblage à moyen débit

Cette partie de ma thèse tente de répondre à une question : comment identifier les bases génétiques de l'immunité des hydathodes d'*Arabidopsis thaliana* face à *Xcc* ? Pour être le plus exhaustif possible, nous avons choisi de procéder à un crible direct de mutants. Grâce à notre collaboration avec les chercheurs de l'IJPB de Versailles (Patrick Laufs), nous avons eu accès à une collection de mutants d'*Arabidopsis* de l'accession Colombia-0 (Col-0) : les lignées HEM (Homozygous EMS Mutants, (Capilla-Perez et al., 2018)). Chacune des 897 lignées HEM possède en moyenne 900 mutations, qui sont homozygotes grâce à une des deux méthodes suivantes (**Figure 3.3**).

La première méthode, utilisée pour générer la série de lignées SSD (Single Seed Descents), consiste en l'application de méthanesulfonate d'éthyle (EMS, composé mutagène qui produit dans le génome des mutations aléatoires, par substitution des bases azotées) sur des graines Col-0 pour les mutagéniser. Ensuite, quatre générations successives sont obtenues par

Tableau 3.2. Nombre de mutations détectées dans les lignées HEM (Homozygous EMS Mutants) séquencées et dans les sous-ensembles SSD (Single Seed Descents) et DH (Doubled Haploid). *Cette catégorie inclue les stops, les décalages du cadre de lecture et les modifications des sites d'épissage. Capilla-Perez et al. 2018.

	HEM (n = 47)	SSD (n = 25)	DH (n = 22)
All Mutations	897	1,003	776
Homozygous mutations	696 (81%)	676 (70%)	720 (94%)
Homozygous mutations that change protein sequences	195	193	199
Homozygous non synonymous coding mutations	179	177	182
Homozygous mutations that may affect protein function*	14	15	14



Figure 3.4. Echelle de notation des symptômes d'*Arabidopsis thaliana* provoqués par *Xcc* lors d'une infection par les hydathodes.

0 : pas de symptômes. 1 : chlorose jaune au niveau d'un hydathodes. 2. Chlorose sur plusieurs hydathodes. 3. Chlorose étendue avec début de nécrose. 4. Nécrose étendue. 5. Nécrose de la feuille entière.

autofécondation d'une seule graine par génération. Dans la seconde méthode, qui permet d'obtenir les lignées DH (Doubled Haploid), les graines mutées avec de l'EMS possèdent une mutation homozygote dans le gène *GLABRA1*. Les plantes portant cette mutation sont glabres. Ces plantes sont croisées avec une lignée qui induit l'haploïdie (lignée CENH3 Tailswap (Ravi and Chan, 2010)) afin d'obtenir des descendants haploïdes. Parmi la troisième génération, les plantes haploïdes peuvent alors être repérées par leur absence de poils. Ces plantes sont autofécondées, ce qui donne des graines spontanément diploïdes. La nouvelle génération est de nouveau autofécondée pour obtenir la génération finale de lignées DH.

La collection HEM contient 698 lignées SSD et 199 lignées DH. Les auteurs ont séquencé et analysé le génome nucléaire d'une vingtaine de lignées des deux types. Ils estiment que sur la moyenne de 897 mutations ponctuelles aléatoires (transitions G >A et C >T) par lignée, 80% ont été rendues homozygotes (**Tableau 3.2**). Parmi ces mutations, 195 en moyenne ont un effet sur la séquence des protéines. Sur toute la collection cela représente plus de 170 000 mutations. Sachant qu'il y a environ 30 000 gènes dans le génome d'*A. thaliana*, il y a en théorie 5,7 mutations par gène. Cela signifie qu'un crible des lignées HEM permet de phénotyper plusieurs mutants pour un même gène. Ceci a été confirmé par un crible ciblant des défauts durant le processus de méiose, où cinq lignées HEM distinctes sont mutantes du même gène et présentent le même phénotype (Capilla-Perez et al., 2018).

Cette collection représente donc pour nous un bon outil de criblage pour inspecter les réponses d'*A. thaliana* à l'infection des hydathodes par *Xcc* : sa taille restreinte par rapport à une collection de mutants EMS classiques est plus accommodante, en permettant tout de même de cribler l'ensemble du génome d'*A. thaliana*. Il se pose alors la question de comment procéder à ce crible.

2. 3. Développement et optimisation de la méthode de criblage

Dans l'équipe où j'ai réalisé ma thèse, plusieurs tests d'infection d'*Arabidopsis thaliana* par *Xcc* ont été mis au point au fil des années. Notamment, Aude Cerutti, la précédente doctorante qui a démarré le sujet des hydathodes, a développé une méthode d'infection par trempage des plantes dans une suspension de bactéries. Contrairement à d'autres techniques comme la piqûre (Meyer et al., 2005) ou la coupure (Kauffman et al., 1973; Yang and Bogdanove, 2013), communément utilisées pour évaluer la résistance ou la sensibilité des plantes face à une bactérie phytopathogène vasculaire, cette méthode permet à *Xcc* d'entrer par les hydathodes, son mode d'infection naturel. Comme je souhaite étudier le rôle et la réponse

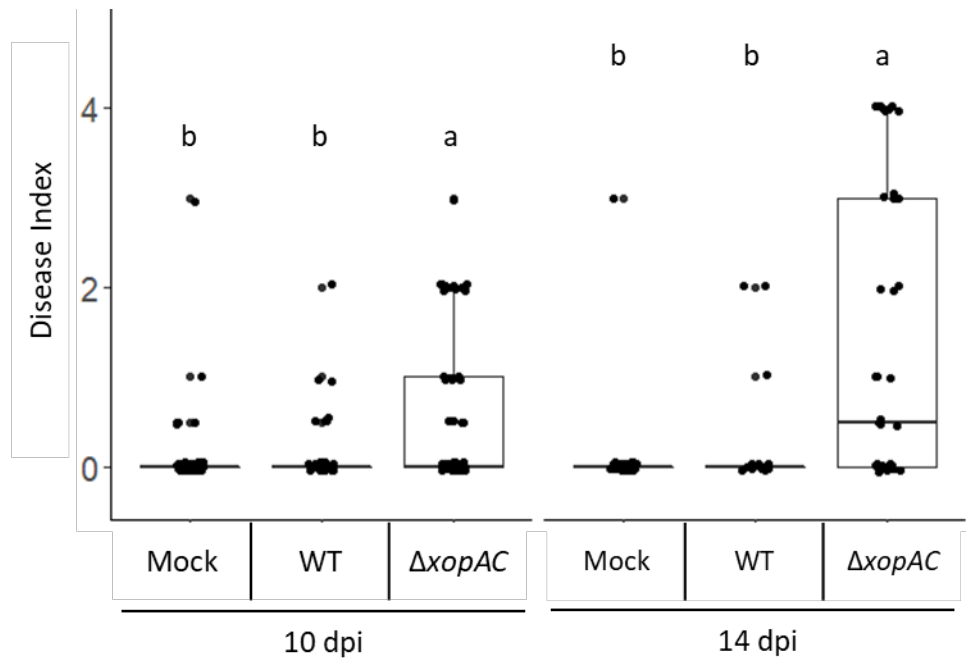


Figure 3.5. L'annotation des symptômes permet de distinguer des phénotypes de résistance et de sensibilité chez *Arabidopsis thaliana*, mais la variabilité est très forte. L'accension sauvage Ws (sensible) a été inoculée par trempage dans une suspension de bactéries virulentes *Xcc* 8004 sauvage (WT), avec le mutant virulent *Xcc* 8004Δ*xopAC* (*ΔxopAC*) bactérienne à 10^8 CFU/mL ou une solution mock. Les symptômes de 4 feuilles par plante ont été annotés à 10 et 14 dpi en suivant l'échelle de la Figure 3.4. A 10dpi, trois expériences indépendantes ont été effectuées sur 4 plantes dans chaque condition et les résultats ont été combinés. A 14dpi, les résultats de deux expériences indépendantes faites sur 4 plantes par condition ont été combinés. Les lettres indiquent les groupes statistiquement différents selon le test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$).

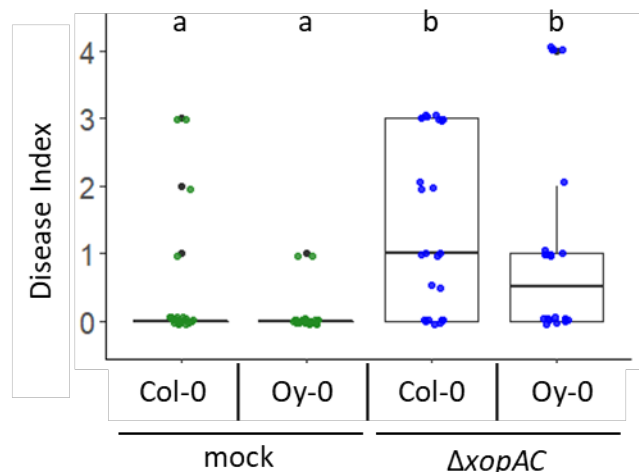


Figure 3.6. L'annotation des symptômes ne permet pas de distinguer des différences de sensibilité à *Xcc* des accessions Col-0 et Oy-0. Les accessions Col-0 (sensible) et Oy-0 (très sensible) ont été inoculées par trempage dans une suspension de bactéries *Xcc* 8004Δ*xopAC* bactérienne à 10^8 CFU/mL ou une solution mock. Les symptômes de 4 feuilles par plante ont été annotés à 14 dpi en suivant l'échelle de la Figure 3.4. Deux expériences indépendantes ont été effectuées sur 4 plantes de chaque accession. Les lettres indiquent les groupes statistiquement différents selon le test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$).

des hydathodes dans l'infection, il est nécessaire d'utiliser ce type d'inoculation. Toutefois, elle implique de manipuler et d'inoculer les plantes une par une, ce qui n'est pas adapté au criblage (rapide) d'un grand nombre de plantes. De plus, la manipulation risque de blesser les feuilles et de favoriser l'entrée des bactéries par les blessures au lieu des hydathodes. Les protocoles d'infection des hydathodes existant dans mon équipe d'accueil sont peu efficaces : par feuille, 0 à 50% seulement des hydathodes sont infectés lors d'inoculation par trempage. J'ai donc mis au point un nouveau protocole d'infection.

2. 3. 1. La notation des symptômes et la coloration GUS ne sont pas adaptées au phénotypage

Dans un premier temps, j'ai commencé par prendre en main le protocole de trempage afin d'estimer quels sont les paramètres qui nécessitent de la mise au point ou de l'optimisation pour mettre en place un criblage sur *A. thaliana* à moyen débit. La méthode de phénotypage de l'infection que j'ai utilisée est la notation visuelle des symptômes (**Figure 3.4**). J'ai comparé les accessions Col-0 et Oyestes (Oy-0) en les inoculant avec la souche virulente *Xcc* 8004 Δ *xopAC*::GUS-GFP (**Figure 3.5**). Col-0 est résistant à *Xcc* 8004 car cette accession reconnaît le produit du gène d'avirulence *xopAC*, il faut donc utiliser une souche mutée pour ce gène pour qu'elle soit virulente. Oy-0 est une accession naturellement plus sensible à *Xcc* 8004 que Col-0 (Harrold van der Burg, Université d'Amsterdam, van Hulten et al., 2019). J'ai aussi comparé la réaction de l'accession Wassilewskija (Ws) aux souches *Xcc* 8004::GUS-GFP et *Xcc* 8004 Δ *xopAC*::GUS-GFP (**Figure 3.6**). Dans les deux cas, quatre feuilles par plante sont marquées avant l'inoculation, afin de suivre l'évolution de leurs symptômes tout au long de l'expérience, selon l'échelle de la **Figure 3.4**. Il est possible de distinguer des différences de réaction des plantes inoculées avec *Xcc* et avec une solution mock, et aussi de distinguer les réactions à *Xcc* 8004::GUS-GFP et *Xcc* 8004 Δ *xopAC*::GUS-GFP. Toutefois, il existe une trop forte variabilité des symptômes sur les plantes d'une même condition (**Figures 3.5 et 3.6**), notamment pour les plantes infectées avec une bactérie virulente. Même au sein d'une même plante, à 14 jours après infection par *Xcc* 8004 Δ *xopAC*::GUS-GFP, une feuille peut être asymptomatique, totalement nécrosée ou avoir un symptôme intermédiaire de chlorose.

Il y a une telle variabilité qu'il est difficile voire impossible de distinguer des petites différences de réponses. Il n'a pas été possible de voir de différence de niveau de symptômes entre Col-0 et Oy-0 (**Figure 3.6**), dont la différence de sensibilité a pourtant été prouvée dans la littérature (van Hulten et al., 2019). Pour comprendre d'où peut provenir cette si grande variabilité des symptômes, j'ai effectué des colorations GUS des feuilles infectées, ce qui permet de localiser *in situ* les bactéries *Xcc* inoculées. L'intérêt de tester une autre méthode de

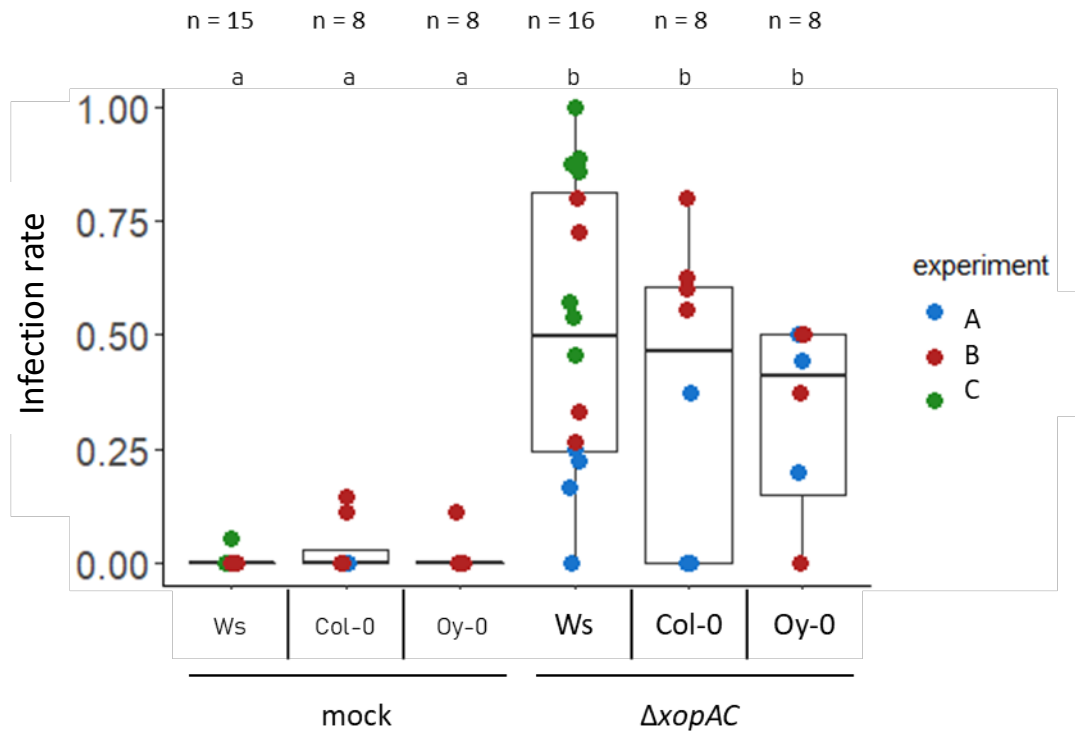


Figure 3.7. Taux d'infection des hydathodes d'*Arabidopsis thaliana* par *Xcc* lors d'une inoculation par trempage. Les accessions Ws (sensible), Col-0 (sensible) et Oy-0 (très sensible) ont été inoculées par trempage dans une suspension de bactéries *Xcc* 8004 $\Delta xopAC::GUS-GFP$ bactérienne à 10^8 CFU/mL ou une solution mock. Après coloration GUS de deux feuilles sur deux plantes, les hydathodes sont observés à la loupe binoculaire à 14 dpi pour dénombrer combien sont colorés par le GUS. Le taux d'infection est calculé avec le nombre d'hydathodes bleus sur le nombre total d'hydathodes par feuille. Trois expériences indépendantes ont été effectuées à 14 dpi (A, B et C). Le nombre total de feuilles examinée est indiqué par le chiffre n dans chaque condition. Les lettres indiquent les groupes statistiquement différents selon le test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$).

phénotypage est d'autant plus grand que la notation des symptômes est sujette à la subjectivité de l'annotateur, et dans l'optique d'un criblage à grande échelle, il est bienvenu d'écarter les méthodes qui apportent de la variabilité technique, en plus de la variabilité biologique. Si cela est possible, il serait aussi préférable d'effectuer le phénotypage plus tôt (avant 10 ou 14 dpi), afin d'accélérer le criblage, qui nécessiterait aussi moins de place.

Le principe de ce type de coloration GUS est de localiser les bactéries exprimant l'enzyme β -glucuronidase (GUS). Les feuilles infectées sont infiltrées avec un tampon contenant du X-gluc, le substrat de la GUS, qu'elle dégrade en un produit bleu indigo. Il est alors possible de dénombrer les hydathodes colonisés par la bactérie, puisqu'ils apparaissent en bleu, et de déterminer ainsi le taux d'infection de chaque feuille.

Avec cette seconde méthode aussi, la variabilité de réponse est très importante : le taux d'infection des feuilles peut osciller entre 0 et 100% dans une même condition (**Figure 3.7**), que ce soit entre plantes, entre les feuilles d'une plante, et même entre réplicats biologiques. J'ai traité ici la présence de bactéries GUS dans les hydathodes comme une information binaire (présence ou absence). En réalité il y a aussi une grande variabilité de niveau d'infection des hydathodes (**Figure 3.8**). En effet, certains présentent une légère coloration bleue (**Figure 3.8F**), alors d'autres sont bleu indigo (**Figure 3.8D, 3.8E**) et que les vaisseaux du xylème peuvent aussi être plus ou moins colonisés (**Figure 3.8A, 3.8B**). Cette simplification de l'information peut expliquer une partie de la variabilité observée. J'ai quand même pu observer qu'en moyenne, seulement ~ 50% des hydathodes de chaque feuille sont infectés par *Xcc* lors de l'inoculation par trempage. Cela atteste de la difficulté à étudier l'infection des hydathodes.

La notation des symptômes et la coloration GUS sont donc deux méthodes d'évaluation de la maladie qui, dans mon système, donnent des résultats trop variables. Ces deux méthodes ne sont pas non plus adaptées à un crible moyen débit, car elles prennent beaucoup de temps, particulièrement les colorations GUS qui en plus requièrent des réactifs coûteux. L'inoculation par trempage n'est pas non plus optimale (manipulation et temps). Il faut aussi noter que les plantes non inoculées « mock » présentent parfois des symptômes (**Figures 3.5 et 3.6**) ou quelques hydathodes bleus (**Figure 3.7**). Dans le premier cas, la notation des symptômes ne permet pas de distinguer les symptômes causés par *Xcc* de ceux provenant d'un stress abiotique. Dans le second cas, cela montre qu'il y a une légère contamination entre les plantes « mock » et les plantes inoculées avec *Xcc*. Cela renforce l'idée qu'il faut développer une autre méthode de phénotypage. J'ai donc besoin d'une méthode d'inoculation plus rapide, qui demande moins

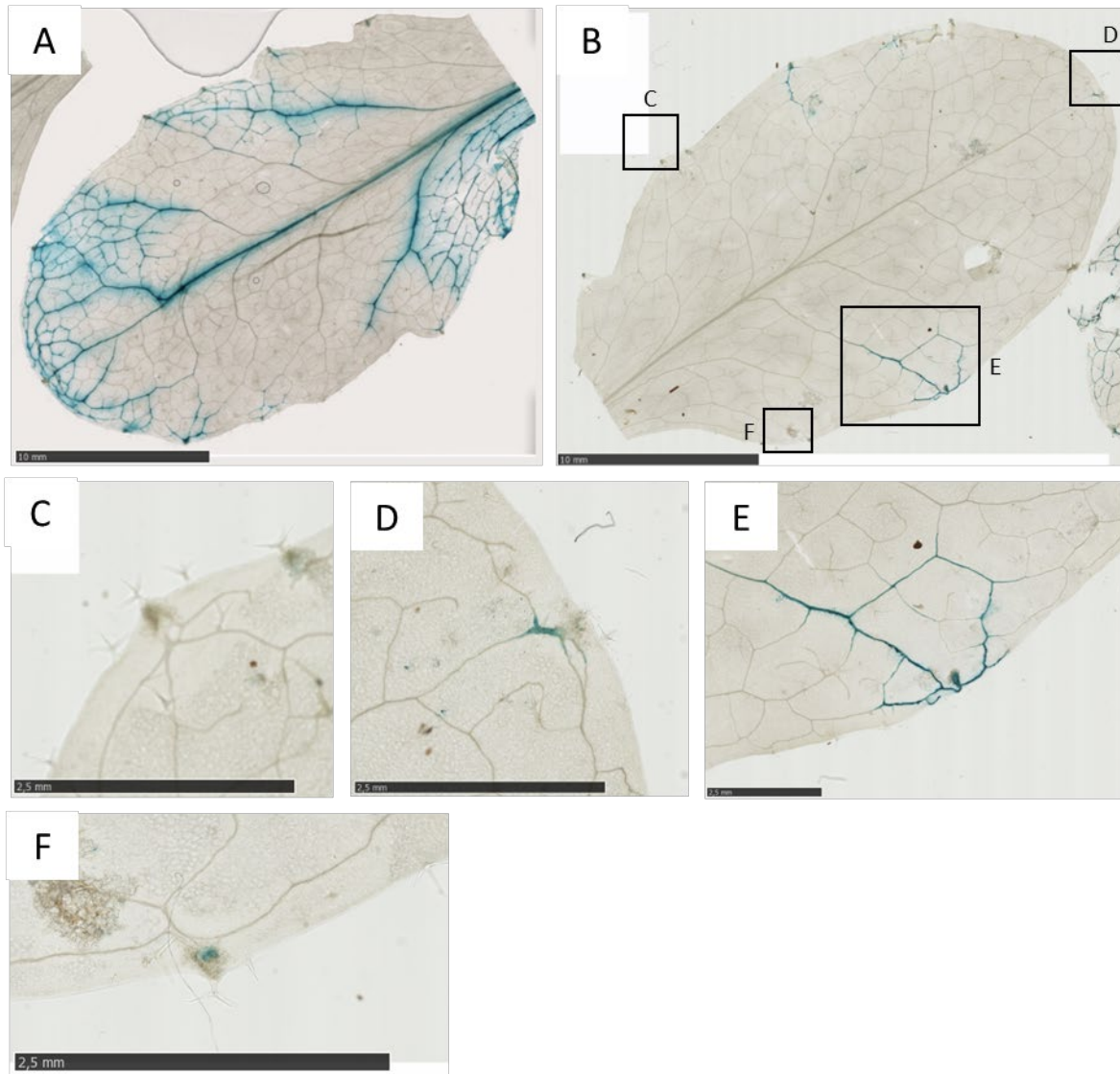


Figure 3.8. Forte variabilité de taille de population de *Xcc* entre feuilles et entre les hydathodes d'une même feuille d'*A. thaliana*. L'accession Col-0 a été inoculée par trempage dans une suspension de bactéries *Xcc* 8004 $\Delta xopAC::GUS-GFP$ bactérienne à 10^8 CFU/mL. Après coloration GUS des feuilles, les hydathodes sont observés à la loupe binoculaire à 10 dpi. (A) et (B) deux feuilles au profil contrasté d'infection par *Xcc*. Barre d'échelle = 10 μ m. (C), (D), (E) et (F) agrandissement des hydathodes de (B), montrant l'hétérogénéité d'infection des hydathodes d'une même feuille. Barre d'échelle = 2,5 μ m.

de manipulation des plantes, qui donneraient des résultats plus homogènes et/ou qui augmenterait le taux d'infection des hydathodes. Pour le phénotypage, il faut qu'il soit adapté au moyen débit, qu'il limite la variabilité inter- et intra- échantillons, qu'il soit le plus objectif et quantitatif possible, et qu'il demande le moins de temps de travail et d'analyse possible tout en étant peu onéreux.

2. 3. 2. Vaporisation et dénombrement bactérien in planta : pour une infection homogène d'un grand nombre d'*Arabidopsis* et un phénotypage quantitatif.

D'abord, pour améliorer la méthode d'inoculation qui permettra d'étudier l'immunité des hydathodes, il faut impérativement que *Xcc* entre par les hydathodes des plantes. Afin de diminuer les manutentions et d'augmenter le rendement (inoculer le plus de plantes possible dans un même laps de temps), la solution choisie est de vaporiser une suspension de bactéries sur les plantes. Comme c'est une technique équivalente au trempage pour l'entrée des bactéries par les hydathodes, il reste à jouer sur l'optimisation des paramètres environnementaux pour améliorer la reproductibilité.

L'humidité joue un rôle important dans le développement de la pourriture noire (Williams, 1980; Vicente and Holub, 2013). Au cours de l'expérience, les plantes sont maintenues à 100% d'humidité relative un jour avant et un jour après l'inoculation. Ainsi, la guttation est observée lors de l'inoculation. L'objectif est de s'assurer que les bactéries entrent en contact avec le fluide de guttation, ce qui favorise leur entrée dans la plante. De la même manière, l'état de guttation des plantules est maintenu 24h après l'inoculation, afin que les bactéries soient en contact avec la plante pendant un cycle de guttation entier. Les bactéries peuvent alors entrer soit par diffusion, soit par déplacement actif de leur part lors de la réabsorption/évaporation de la guttation. Utiliser les cycles de guttation d'*A. thaliana* pour infecter la plante est une méthode qui a fait ses preuves : par exemple van Hulst et al. (2019) procèdent à deux infections successives, chacune suivie d'un cycle de guttation (10h d'obscurité, 95% d'humidité relative). La maîtrise du taux d'humidité est donc primordiale pour que les infections soient reproductibles d'une expérience à une autre. En l'absence d'accès à des chambres à point de rosée qui permettent de bien maîtriser les conditions d'humidité, j'ai dû trouver des alternatives.

Lors des inoculations par trempage, nous espacions les plantes (principalement pour ne pas mélanger les souches et ne pas abîmer les plantes en les manipulant) de manière à avoir une densité d'une plante dans 100 cm² (24 plantes dans un plateau de 40 x 60 cm). Pour conserver



Figure 3.9. Effet du sol sur la croissance d'*Arabidopsis thaliana*. Les accessions d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 et Oy-0 ont été cultivées 4 semaines sur du terreau (gauche), du terreau mélangé à du sable (2:1, milieu), ou de la tourbe provenant de pastilles de Jiffy7® (droite).



Figure 3.10. Plateau de 104 lignées HEM semées sur des pastilles Jiffy-7®. Les lignées HEM ont 4 semaines et 3 jours. La photographie a été prise le matin avant une inoculation.

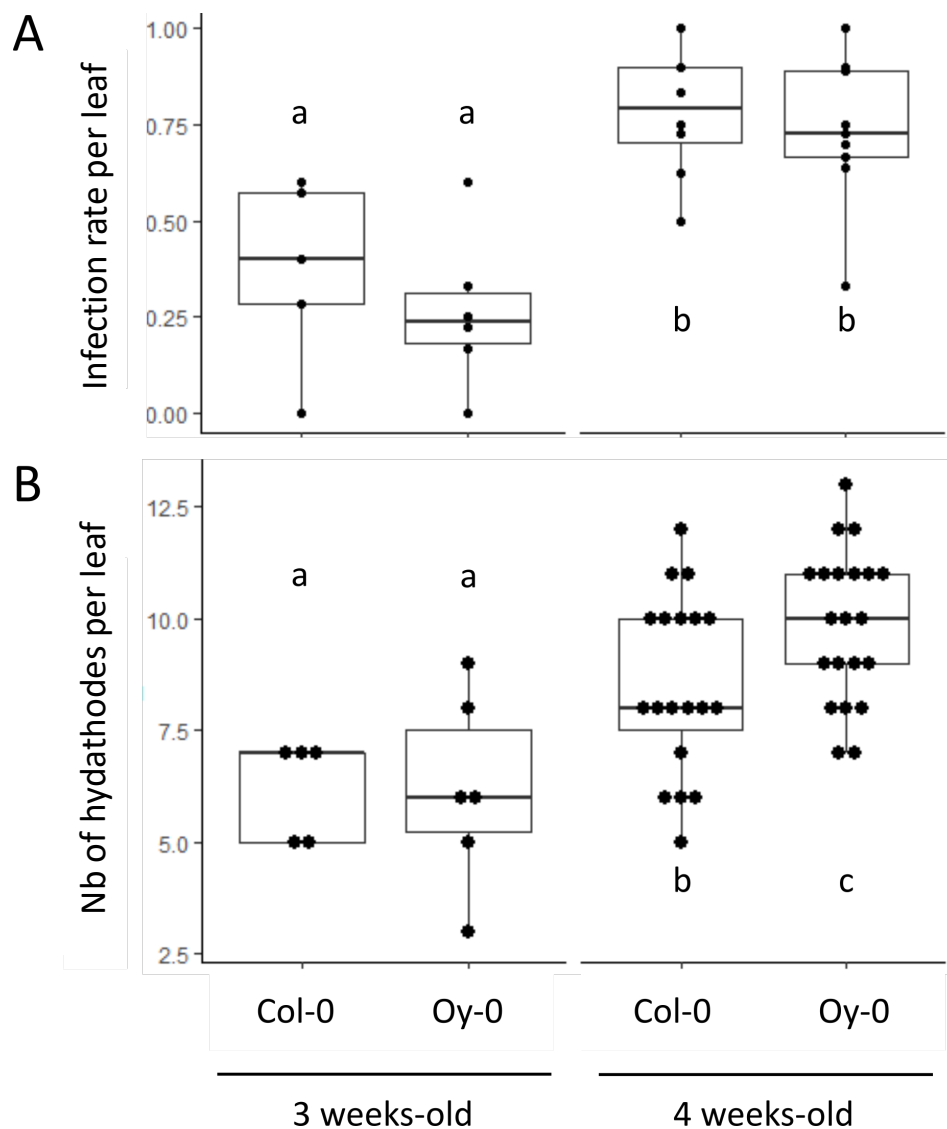


Figure 3.11. Effet de l'âge des plantes d'*Arabidopsis thaliana* sur le taux d'infection et le nombre d'hydathodes par feuille. Des plantes des accessions Col-0 et Oy-0 d'*Arabidopsis thaliana* de 3 ou 4 semaines ont été inoculées par trempage dans une suspension de *Xcc* 8004 Δ *xopAC* à 10^8 CFU/mL. À 7dpi une coloration GUS des feuilles (2 à 3 feuilles de plantes de 3 semaines, 4 feuilles de plantes de 4 semaines) a été faite. Les hydathodes ont été dénombrés et la présence de GUS a été notée. Le taux d'infection représente le nombre d'hydathodes bleus sur le nombre total d'hydathodes par feuille. L'expérience a été effectuée sur 2 plantes de 3 semaines et 3 plantes de 4 semaines par accession. Les lettres indiquent les groupes statistiquement différents selon le test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$).

l'humidité, j'ai augmenté la densité de plantes à environ une plante dans 23cm² (100 plantes dans la même surface de 40 x 60 cm). Cette densité est suffisamment élevée pour créer un petit couvert végétal avec les rosettes d'*A. thaliana*, ce qui aide à maintenir une humidité plus stable au cours du temps, et améliorer la reproductibilité de la guttation des plantes. Lors des premiers essais, j'ai semé les plantes dans des plaques de semis alvéolées remplies de terreau (Proveen®). Par curiosité, j'ai aussi utilisé du terreau de Jiffy®, car dans l'équipe nous utilisons classiquement les pastilles Jiffy-7® pour toutes les expériences avec *A. thaliana*. Les plateaux alvéolés remplis de terreau sont plus pratiques à préparer, car les Jiffy® sont conditionnés individuellement et il faut les décortiquer pour remplir les alvéoles. Comme le montre la **Figure 3.9**, sans apport d'engrais, le substrat a un impact très important pour la croissance des plantes. Les plantes poussent plus lentement sur terreau (Proveen®) que sur Jiffy® et après 4 semaines, les plantes présentent des symptômes de stress abiotique comme de la chlorose et des colorations violettes d'anthocyanes. Pour éviter d'avoir à arroser les plantes semées sur terreau avec un engrais (car sur un plateau contenant une centaine de plantes, l'arrosage a de fortes chances d'être hétérogène), j'ai préféré utiliser les pastilles Jiffy® telles quelles, sans utiliser de plaques alvéolées (**Figure 3.10**). La principale critique de cette configuration est qu'il n'est possible d'inoculer qu'une souche par plateau. Pour tester plusieurs souches bactériennes par expérience, il faut séparer les plantes selon la souche inoculée, ce qui introduit de la variabilité par un effet de bloc.

2. 3. 3. Dénombrer les bactéries pour phénotyper quantitativement la maladie

Parmi les options de méthode de phénotypage quantitative de la maladie, une possibilité est de faire de l'imagerie, pour analyser informatiquement les symptômes. Cependant, avec la nouvelle densité de semis des plantes, elles se superposent entre elles. S'est donc posée la question de l'âge optimal des plantes pour faire les inoculations. Dans l'équipe, les inoculations se font classiquement sur des plantes de 4 semaines. J'ai donc comparé l'efficacité de l'infection entre des plantes de 3 et 4 semaines, en dénombrant les hydathodes infectés par coloration GUS (**Figure 3.11**). Le taux d'infection par feuille augmente du simple au double entre les plantes de 3 et 4 semaines : à 3 semaines, la médiane du taux d'infection des accessions Col-0 et Oy-0 est de 40 et 25% respectivement, alors qu'à 4 semaines, elle est de 75% pour les deux accessions. Ce résultat est lié soit au stade de développement des plantes, puisque le nombre d'hydathodes augmente avec l'âge des plantes (**Figure 3.11**) soit parce que des plantes plus jeunes, donc plus petites, se superposent moins et l'humidité est diminuée. Même si cela limite les possibilités d'utilisation de phénotypage par imagerie, il est donc préférable d'utiliser des plantes d'au moins quatre semaines pour conserver un taux d'infection des plantes élevé.

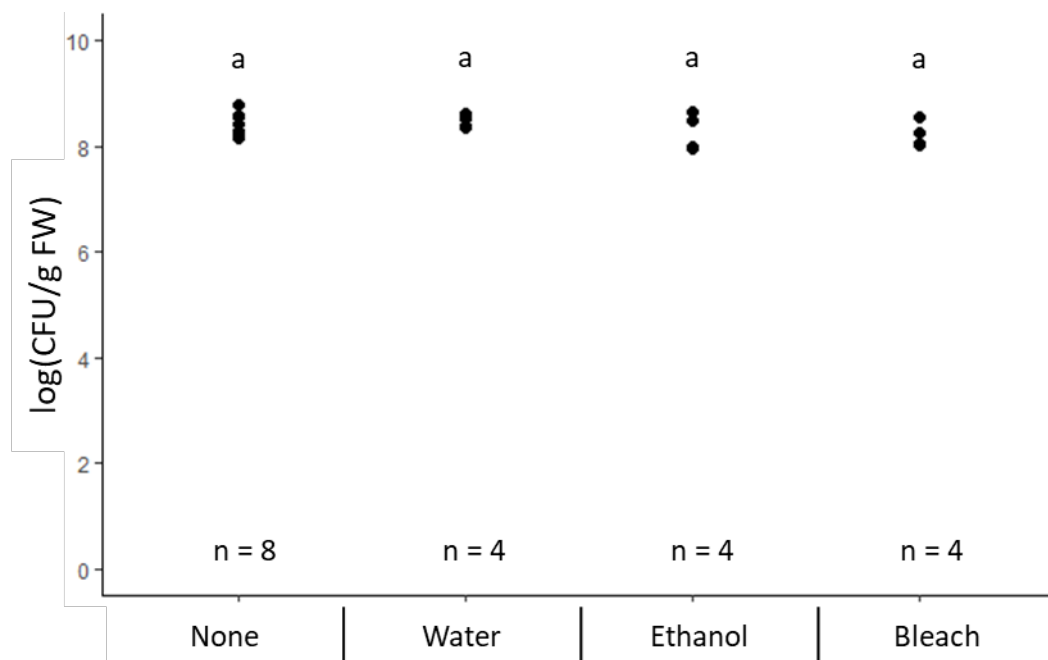


Figure 3.12. Effet de la stérilisation de surface sur la population de bactéries dans les tissus d'*Arabidopsis*, après inoculation par pulvérisation. Multiplication bactérienne de la souche *Xcc* 8004 Δ *xopAC* dans les plantes entières d'*Arabidopsis thaliana* accession Col-0 8 jours après inoculation, en fonction du type de stérilisation de surface, en CFU/g de matière fraîche. L'inoculation a été effectuée par pulvérisation d'une suspension bactérienne à 10^7 CFU/mL. Avant le dénombrement, la surface des plantes est stérilisée par trempage dans un bain d'éthanol (ethanol), de javel (bleach), d'eau stérile (water), ou bien les plantes ne sont pas stérilisées (None). Une expérience a été effectuée sur 4 ou 8 plantes (n) par type de traitement. Aucune différence statistique significative n'a été observée entre les groupes 4 (Test non paramétrique de Kruskal-Wallis, $\alpha = 0,05$).

Pour phénotyper les infections sur *A. thaliana* de manière quantitative, j'ai choisi de développer le dénombrement de la population bactérienne totale *in planta*. Dans l'équipe, ce protocole existe déjà : quatre feuilles par plante sont scannées pour déterminer leur surface, puis elles sont broyées et les suspensions sont diluées et étalées sur milieu riche pour dénombrer les bactéries. On obtient un nombre de colonie formant unité (CFU) par unité de surface. J'ai décidé de ne pas faire le dénombrement par feuille, mais par plante entière pour moyenniser les variations entre feuilles, ce qui implique de normaliser les résultats sur le poids frais des plantes, faute de pouvoir déterminer leur surface.

Parce que les plantes sont inoculées par aspersion, et que ce sont les bactéries *in planta* qui sont dénombrées, il est important de s'assurer que les bactéries épiphytes ne sont pas comptées en même temps ou que leur présence ne risque pas de fausser les résultats. J'ai donc comparé plusieurs types de stérilisation de surface (rinçages à l'eau, à l'eau de Javel ou à l'éthanol) entre elles et fait la même expérience sans stérilisation (mais les plantes sont tout de même épongées en surface). Aucune différence significative n'est observée entre les différentes méthodes (**Figure 3.12**). Par la suite, la surface des plantes ne sera donc pas stérilisée, allégeant d'autant le protocole.

Pour résumer toutes ces expériences, voici les conditions et le protocole choisis pour effectuer le criblage d'*A. thaliana* par infection des hydathodes : Les graines sont semées sur des Jiffy® avec une densité élevée. Après 4 semaines de croissance dans une chambre de culture, les plantes sont mises dans des conditions induisant la guttation durant une nuit (100% humidité). Le matin, les plantes sont inoculées par aspersion avec une suspension bactérienne à 10^7 CFU/mL. Les plantes sont remises en condition de guttation durant un jour et demi. Huit jours après l'inoculation, les plantes sont prélevées, essuyées et pesées, puis elles sont broyées. Les CFU sont dénombrées dans le broyat dilué. Le protocole détaillé est disponible dans le **Chapitre 5 Matériels et Méthodes**.

2. 4. Le crible de 358 des lignées HEM révèle que 63 d'entre elles ont un phénotype mutant lors de l'infection par un *Xcc* virulent

Dès lors que le protocole de criblage a été mis au point, j'ai pu démarrer le criblage des lignées HEM pour déterminer les bases génétiques de la résistance ou de la sensibilité à *Xcc* 8004 $\Delta xopAC$. Ensuite, les lignées qui ont des phénotypes mutants comparés à Col-0 seront utilisées pour identifier les bases génétiques de ces phénotypes.

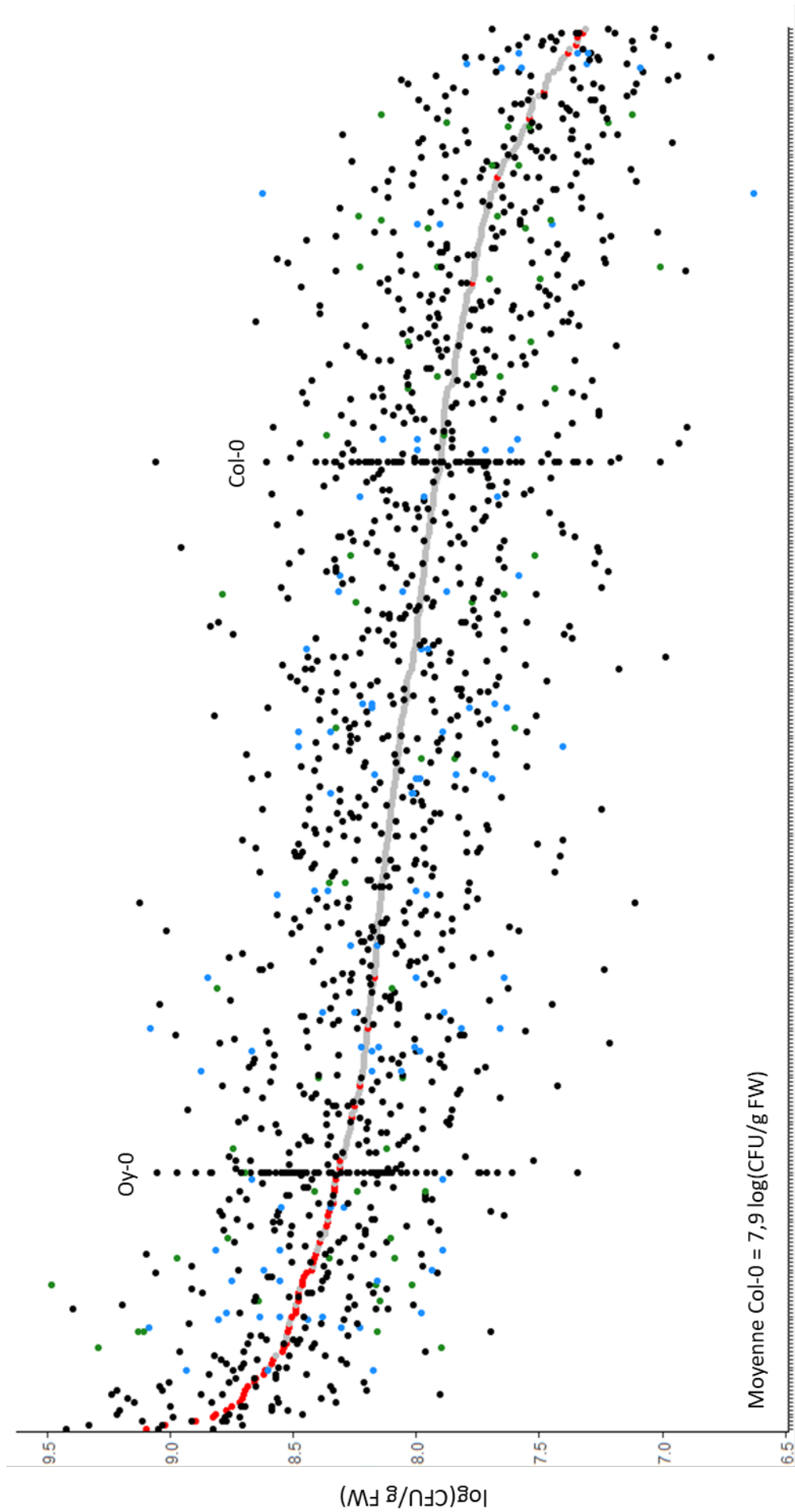


Figure 3.13. Population de *Xcc* dans les 358 lignées HEM testées. Populations bactériennes (en CFU/g de matière fraîche) à 8dpi dans les rosettes des mutants HEM après inoculation par aspersion d'une suspension de *Xcc* 8004Δ*xopAC* à 10⁷ CFU/mL. Les points noirs représentent les données obtenues pour une plante dans trois réplicats biologiques, qui n'ont pas de phénotype de nombre d'hydathodes. Les lignées qui ont moins d'hydathodes que Col-0 sont indiquées en bleu. Les lignées qui ont plus d'hydathodes sont indiquées par des points verts. Les lignées sont classées par moyenne décroissante des trois réplicats, indiqué en gris. Les 63 lignées qui ont un phénotype mutant d'après le test anova (p-value <0,01) sont indiqués en rouge. Les références internes sont présentées aux côtés des lignées HEM : Col-0 (sensible à *Xcc* 8004Δ*xopAC*) et Oy-0 (très sensible).

Avec la méthode de criblage que j'ai développée, un plateau de culture compte 104 plantes (**Figure 3.10**), dont quatre plantes Col-0 et quatre Oy-0 comme contrôle sauvage et contrôle plus sensible, respectivement, et 96 lignées HEM différentes. Sur les 884 lignées HEM disponibles au Versailles Arabidopsis Stock Center de l'Institut Jean-Pierre Bourgoïn, j'ai criblé 358 lignées. Chaque lignée a été testée dans trois répétitions biologiques, avec à chaque fois une seule répétition technique : j'ai donc analysé trois plantes par lignée au total. La puissance statistique ne sera pas très élevée, mais suffisante pour détecter les phénotypes les plus prononcés, le but ici étant de faire un premier crible pour réduire les lignées d'intérêt à quelques dizaines.

Pour savoir si chaque lignée est différente des plantes sauvages en terme de nombre de bactéries quantifiées *in planta*, nous avons appliqué à chaque triplicat de lignées mutantes et aux plantes sauvages correspondantes le modèle décrit dans Zhu et al. (2021). Dans ce modèle, la variable à expliquer, le nombre de CFU/g de matière fraîche, est décrite notamment par le génotype des lignées, les blocs expérimentaux et les interactions entre le génotype et les blocs (**Matériels et Méthodes**).

Le résultat du criblage des 358 lignées est présenté dans la **Figure 3.13**. Les lignées sont classées selon la moyenne décroissante du $\log(\text{CFU/g de matière fraîche})$ et les valeurs des mesures de chacun des trois réplicats sont indiquées. Pour référence, les contrôles Col-0 (sensible) et Oy-0 (très sensible) sont aussi montrés dans la figure. Il y a une variabilité de réponse entre les trois réplicats biologiques, l'écart-type pouvant varier de 1 à 0,02 $\log(\text{CFU/g de matière fraîche})$ (**Annexe III**, médiane à 0,3 log). Sur les 358 lignées criblées, 17,6 % ont un phénotype distinct du contrôle (63 sur 358, $p\text{-value} < 0,01$, **Figure 3.14**). Sur ces lignées au phénotype mutant, 54 sont plus sensibles que Col-0, c'est-à-dire que les populations bactériennes présentes dans les rosettes sont plus grandes que dans les plantes contrôles. Seules 9 lignées HEM présentent le phénotype inverse. Il est possible que les mutations, quelles qu'elles soient, augmentent plus souvent la sensibilité d'*A. thaliana* à *Xcc* qu'elles ne la baissent. Autrement dit, *A. thaliana* pourrait posséder plus de gènes impliqués dans la résistance que dans la sensibilité à *Xcc*.

Ainsi, cette méthode de criblage permet de détecter des phénotypes mutants parmi les plantes testées. Le criblage des lignées HEM en réponse à *Xcc* a été comparé à un criblage de ces mêmes lignées sur le critère du nombre d'hydathodes, comme il est décrit dans le paragraphe suivant.

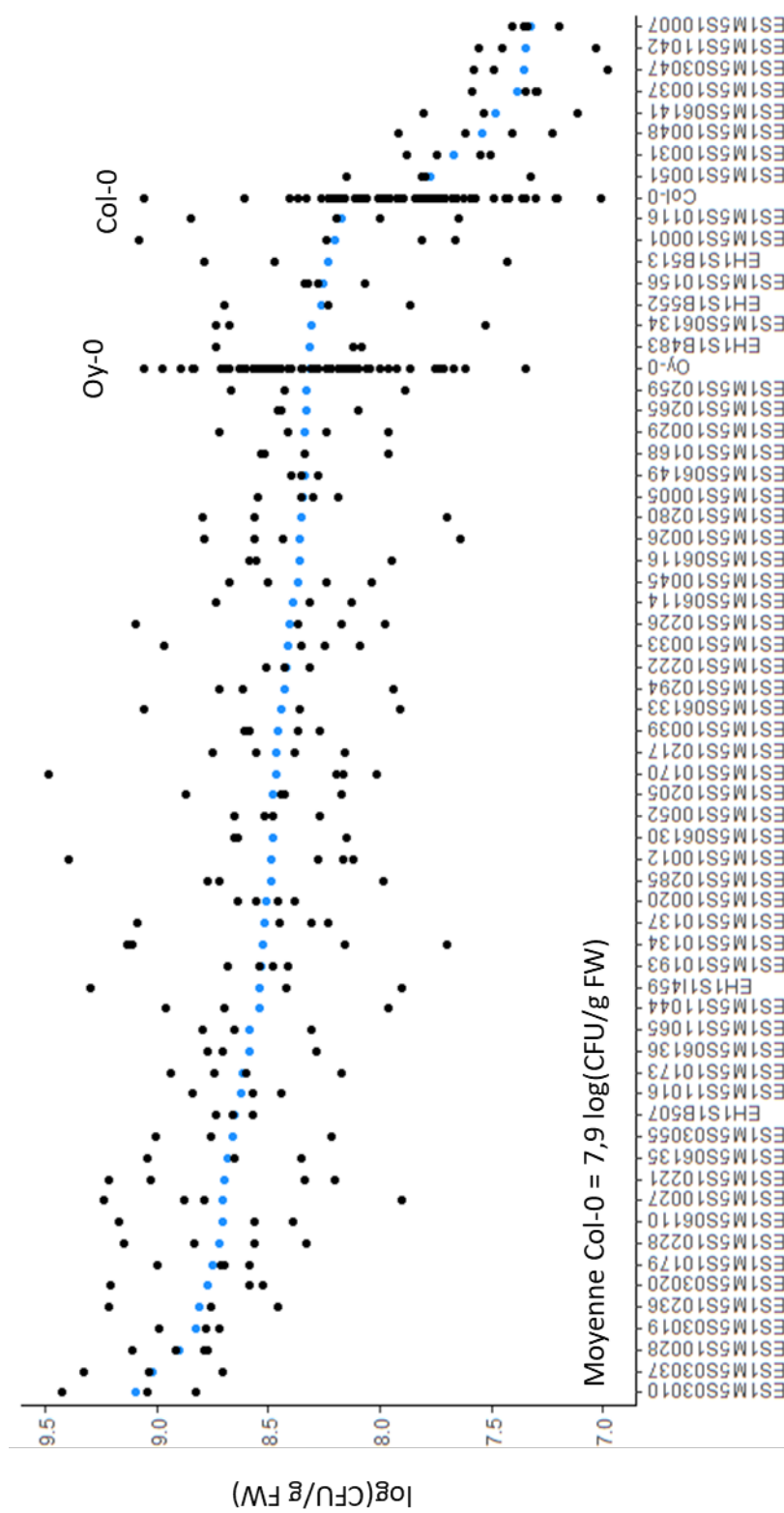


Figure 3.14. Le phénotype de la collection de mutant HEM a permis de détecter 63 lignées HEM présentant une modification de leur sensibilité à *Xcc*. Populations bactériennes (CFU/f de matière fraîche) à 8dpi dans les rosettes des mutants HEM après inoculation par aspersion d'une suspension de *Xcc* 8004Δ*xopAC* à 10⁷ CFU/mL. Les points représentent les données obtenues pour une plante dans trois réplicats biologiques, la moyenne des réplicats est indiquée en bleu. Les 63 lignées présentées ont un phénotype différent de la lignée sauvage Col-0 d'après le test anova (p-value <0,01). Oy-0 est une accession plus sensible à *Xcc* que Col-0.

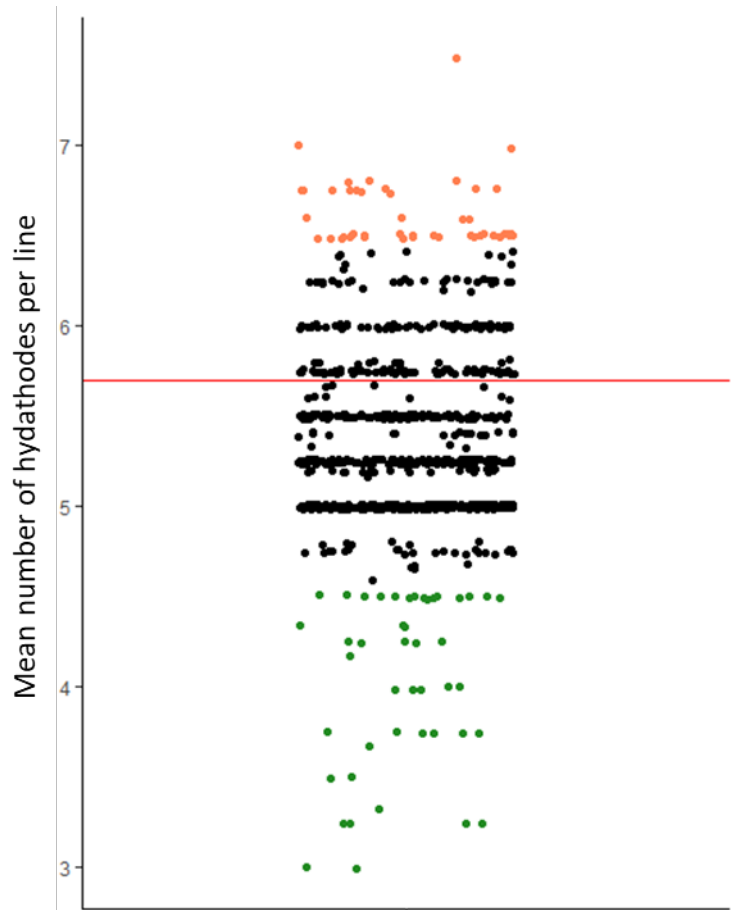


Figure 3.15. Lignées HEM possédant un nombre d’hydathodes différent de Col-0. Sur des plantules de 18 jours cultivées en serre, les feuilles de rang 3 ont été décolorées à l’éthanol et observées au microscope optique afin de dénombrer les hydathodes. Le contrôle Col-0 (ligne rouge) possède en moyenne 5,7 hydathodes sur sa feuille 3. D’après ce chiffre, des seuils ont été établis : lorsque les lignées HEM possèdent en moyenne moins de 4,5 hydathodes (vert) ou plus de 6,5 hydathodes (orange), nous considérons qu’elles ont un phénotype mutant pour le nombre d’hydathode. Une expérience à été réalisée sur 2 à 6 feuilles par lignée, chaque point représente la moyenne du nombre d’hydathodes dénombré par lignée. (Communication personnelle, D. Vasselon & P. Laufs, IJPB).

Table 3.3. Répartition des lignées HEM criblées, selon leur phénotype de multiplication de *Xcc* et leur nombre d'hydathodes par rapport à Col-0.

Pour le test du χ^2 : H0 = il n'y a pas de différence de proportion entre les deux groupes considérés.

Lignées HEM considérées	Phénotype mutant de multiplication de <i>Xcc</i>	Sans phénotype de multiplication de <i>Xcc</i>	Proportion de lignées HEM avec un phénotype mutant de multiplication de <i>Xcc</i>	P-value du test χ^2 par rapport aux lignées HEM sans phénotype hydathode
Pas de phénotype hydathodes	44	244	15,3 %	-
Phénotype : plus ou moins d'hydathodes que Col-0	19	51	27,1 %	0,0305
Phénotype : moins d'hydathodes que Col-0	13	27	32,5 %	0,0135
Phénotype : plus d'hydathode que Col-0	6	24	20,0 %	0,6207

2. 5. Chez les lignées HEM, il n’y a pas de corrélation entre multiplication bactérienne et nombre d’hydathodes

En parallèle de la mise en place du criblage sur la résistance/sensibilité à *Xcc*, un de nos partenaires du projet NEPHRON (D. Vasselon et P. Laufs, IJPB, Versailles) a entrepris de cribler la même population de mutants sur le critère du nombre d’hydathodes. Les comptages ont été effectués sur 2 à 6 feuilles de rang 3 de plantules de 18 jours, à la loupe binoculaire sur des feuilles décolorées à l’éthanol. Les Col-0 WT ont en moyenne 5,7 hydathodes. Les seuils décidés pour estimer que les mutants ont un nombre d’hydathodes différents de Col-0 sont des moyennes de 4,5 hydathodes ou moins et 6,5 hydathodes ou plus. Les résultats de cette expérience préliminaire indiquent que sur les 884 lignées HEM testées, une centaine d’entre elles ont un nombre d’hydathodes différent du Col-0 sauvage : la moitié possède plus d’hydathodes, et l’autre moitié moins (**Figure 3.15**).

Avec ces résultats, j’ai cherché une corrélation entre le nombre d’hydathodes et les populations bactériennes *in planta*. Pour cela, j’ai effectué un test de conformité des distributions (test du χ^2 , est-ce que les différences de distribution observées peuvent être attribuées au hasard, avec l’hypothèse H_0 : il n’y a pas de différence entre la répartition des deux groupes). Parmi les lignées HEM que j’ai phénotypées, la proportion de lignées ayant un phénotype de multiplication des bactéries est-elle la même entre le groupe de lignées HEM qui ont un phénotype de nombre d’hydathodes et celles qui n’en ont pas (**Table 3.3**) ? Le test donne une P-value de 0,0305. Autrement dit, la probabilité d’obtenir une différence entre ces proportions par hasard est de 3 %. Avec le seuil d’erreur α de 5%, les différences observées ne sont pas significatives. Le fait d’avoir plus ou moins d’hydathodes semble avoir un effet sur la multiplication des bactéries. En faisant le même test, mais en séparant les lignées HEM ayant un phénotype sur leur nombre d’hydathodes en deux groupes, celles qui ont plus d’hydathodes que Col-0 et celles qui en ont moins (**Table 3.3**) : la P-value est de 0,6207 pour les lignées qui ont moins d’hydathodes (attention les effectifs sont faibles, donc le résultat peu fiable), et de 0,0135 pour les lignées ayant plus d’hydathodes que Col-0. Avec le seuil d’erreur α de 5%, les différences observées sont significatives. Par ailleurs, le test statistique est plus significatif si l’on considère uniquement les lignées HEM qui possèdent moins d’hydathodes que Col-0. Au vu des résultats actuels, une réduction du nombre d’hydathodes chez *A. thaliana* semble donc avoir d’effet sur la multiplication de *Xcc in planta*.

2. 6. Discussion

Le nouveau protocole de criblage de la sensibilité/résistance d'*A. thaliana* à *Xcc* que j'ai mis en place est plus fiable que ce qui était utilisé jusqu'à présent dans l'équipe. Au-delà de l'optimisation technique qui a permis de rendre le criblage des lignées HEM faisable, le paramètre le plus important du protocole était d'assurer l'infection optimale des hydathodes, en maîtrisant le plus finement possible les conditions d'humidité. Jusqu'à présent, pour évaluer la sévérité de la maladie sur *A. thaliana*, nous utilisons une échelle de notation des symptômes. Cependant, cette méthode est subjective et dépend de l'observateur. Un autre point important, qui est commun à plusieurs autres types de phénotypage, est le fait que l'infection des feuilles d'*A. thaliana* est très hétérogène. Avec une souche virulente ($\Delta xopAC$) sur une plante sensible (Col-0 WT), il y aura des feuilles asymptomatiques et d'autres symptomatiques. C'est un phénomène que nous avons aussi observé en suivant la progression de *Xcc* à l'aide d'un marqueur GUS. Grâce à ce marqueur, il est possible d'observer la colonisation des hydathodes individuellement, et le constat est identique : que ce soit entre feuilles ou sur une même feuille, il y a des hydathodes fortement infectés, d'autres pas du tout, et il y a même des hydathodes à des stades intermédiaires d'infection. Il semble que chez les accessions d'*A. thaliana* Col-0 qui ont été testées, l'infection d'hydathodes inoculés au même moment soit asynchrone. Une des raisons de ce phénomène pourrait être que c'est une quantité différente de bactéries qui entre dans chaque hydathode, ce qui est curieux car durant l'inoculation, la quantité de bactéries appliquée sur les feuilles est assez élevée pour ne pas être limitante (Robeson et al., 1989). Par ailleurs, sur chou-fleur, nous avons montré qu'il était possible d'infecter tous les hydathodes d'une feuille (**Chapitre 3 Partie 1.2**) et chez cette espèce, l'entrée dans les hydathodes ne représente pas un goulot d'étranglement important à l'infection, même si le niveau d'infection varie d'un hydathode à un autre (Luneau et al., 2022a). Il est probable que la capacité de *Xcc* à infecter plus ou moins d'hydathodes soit dépendante de l'hôte. Un ensemble de paramètres pourrait expliquer les différences de taux d'infection entre ces deux espèces hôtes. Cela pourrait être une différence de composition ou de concentration du fluide de guttation, qui fait que *Xcc* est plus ou moins attiré (par chimiotactisme) dans les hydathodes, ou que les nutriments présents affectent différemment la croissance de *Xcc* selon l'espèce. La composition de la cuticule pourrait aussi influencer l'attachement de *Xcc* ou des gouttes de guttation contenant *Xcc* (ou les gouttes d'inoculum) à la surface des feuilles. De même, l'immunité post-invasive diffère certainement entre les hydathodes d'*A. thaliana* et du chou-fleur. Cette dernière hypothèse serait plus compliquée à vérifier, car dans le cadre d'une étude de transcriptomique

des hydathodes d'*A. thaliana* comme il a été fait dans le **Chapitre 1 Partie 1.2**, il serait impossible d'assurer l'infection de tous les hydathodes. C'est d'ailleurs l'une des raisons pour lesquelles nous avons choisi de faire l'étude sur chou-fleur et non *A. thaliana*.

Grâce au protocole développé durant ce projet, j'ai pu cribler près de la moitié des lignées HEM et identifier 63 lignées ayant un phénotype mutant en termes de multiplication de *Xcc* 8004 Δ *xopAC* *in planta* par rapport à Col-0. Il convient de rester prudent vis à vis de ces lignées HEM : une seule plante a pu être testée par réplicat biologique. Le criblage des lignées HEM permet d'effectuer un débroussaillage pour sélectionner quelques dizaines de lignées d'intérêt. En raison du faible pouvoir statistique d'un petit échantillon et de la forte variabilité observée, il est prévu de tester à nouveau toutes les lignées présentant un phénotype mutant en utilisant plus de plantes par réplicat, afin de valider ou non leur phénotype.

Pour pouvoir relier les phénotypes plus facilement, il serait intéressant d'utiliser les mêmes tests statistiques entre les différents criblages. Notons aussi que les hydathodes ont été comptés sur des plantes de 18 jours alors j'ai effectué le crible avec *Xcc* sur des plantes de 4 semaines. La vitesse de croissance n'étant certainement pas la même pour toutes les lignées HEM, le nombre d'hydathodes à 18 jours peut ne pas être représentatif du nombre d'hydathodes à 4 semaines. De plus, le nombre d'hydathodes varie peut-être entre feuilles de différents rangs : j'ai analysé les plantes entières alors que les hydathodes ont été comptés uniquement sur les feuilles de rang 3. Les résultats de corrélation en séparant les lignées ayant plus d'hydathodes et moins d'hydathodes sont malgré cela très intéressants. Le premier test n'est pas du tout significatif (p-value = 0,6207), alors que le second est inférieur au seuil des 5% (p-value = 0,0135). Toutefois, il reste à phénotyper la moitié des lignées HEM pour la multiplication des bactéries *in planta*. Avec ces nouveaux effectifs, les résultats de la corrélation entre le nombre d'hydathodes et la quantité de bactéries pourraient changer. On peut spéculer que s'il y a bien un lien entre le nombre d'hydathodes et la multiplication des bactéries, une fois que le crible HEM sera fini, il est bien plus probable que ce soit un nombre réduit d'hydathodes qui impacte la multiplication des bactéries, et non un nombre plus grand d'hydathodes.

En attendant, nous avons poursuivi cette question en étudiant des mutants d'*A. thaliana* au phénotype bien plus prononcé : les mutants *cuc2-1*, avec leur unique hydathode apical. Ces expériences sont décrites dans la partie suivante.

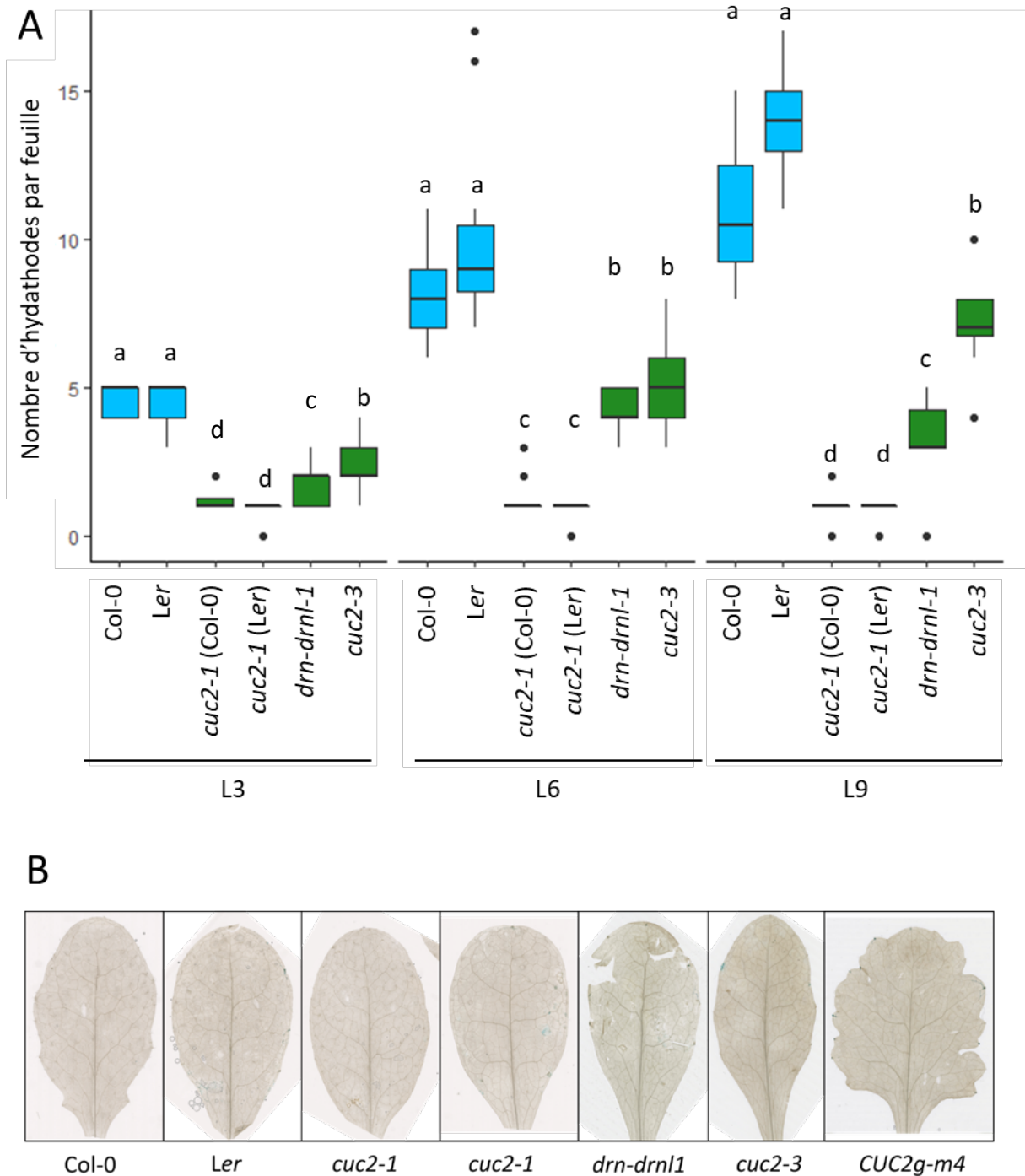


Figure 3.16. Observation de la serration et dénombrement des hydathodes des mutants d'*Arabidopsis thaliana* de *CUC2* et *DRN-DRNL*. (A) Les accessions sauvages Col-0 et *Ler*, et 5 mutants des gènes *CUC2* et *DRN-DRNL1* ont été phénotypées sur le nombre d'hydathodes présents par feuille. Pour chaque lignée, les feuilles ont été observées au microscope optique après éclaircissement des tissus à l'éthanol, après 6 semaines de culture en serre, en jours longs (16h jours, 8h nuit). Sur 9 à 12 plantes, les hydathodes des feuilles de rang 3 (L3), 6 (L6) et 9 (L9) ont été dénombrés. Résultats obtenus par P. Savorat et P. Laufs (IJPB). Les lettres indiquent les groupes statistiquement différents selon le test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$). (B) Observation de la serration des accessions sauvages et mutantes des gènes *CUC2* et *DRN-DRNL1*. Pour chaque lignée, les feuilles ont été observées au microscope optique après éclaircissement des tissus à l'éthanol, après 5 environ semaines de culture en chambre de culture, en jours courts (8h jours, 16h nuit).

Partie 3 : L'étude de mutants possédant moins d'hydathodes révèle l'importance de l'humidité pour la multiplication de *Xcc* dans la feuille

3. 1. Contexte

Nos partenaires à l'IJPB de Versailles étudient la morphogenèse des feuilles. Depuis plusieurs années, ils caractérisent le gène *CUC2*, impliqué dans la formation de la dentelure des feuilles d'*A. thaliana* (Nikovics et al., 2006; Bilsborough et al., 2011; Hasson et al., 2011). Dans le cadre du projet NEPHRON, ils étudient le développement des hydathodes. Suite au criblage des lignées HEM sur leur nombre d'hydathodes, ils ont criblé leurs propres mutants d'*A. thaliana*. Le mutant *cuc2-1* est un allèle nul de *CUC2* dans le fond génétique Landsberg *erecta* (*Ler*). Cet allèle a également été introgressé dans Col-0 et stabilisé par cinq back-cross. *cuc2-3* est un allèle faible de *CUC2* dans le fond génétique Col-0. *CUC2g-m4* est une lignée mutante de Col-0 qui surexprime le gène *CUC2*. Enfin, le mutant *drn-drnl1* est un double mutant de deux facteurs de transcription phylogénétiquement proches et redondants (Kirch et al., 2003), exprimés dans les *primordia* des organes, dans les hydathodes et qui sont liés à la signalisation de l'auxine (Chandler et al., 2007; Chandler and Werr, 2017; Glowa et al., 2021).

3. 2. Le triple phénotype des mutants *cuc2*

3. 2. 1. CUC2 régule le nombre d'hydathodes

Lors du crible des mutants *cuc2*, nos partenaires ont fait les observations suivantes : sur les feuilles de rang 3, à six semaines, les plantes sauvages de Col-0 et *Ler* ont 5 à 6 hydathodes par feuille (**Figure 3.16A**, communications personnelles Pauline Savourat, M2 IJPB). Il est intéressant de noter que les deux accessions sauvages ont le même nombre d'hydathodes, mais que la morphologie de leurs feuilles est différente : les feuilles de Col-0 sont dentelées et la majorité des hydathodes sont situés au bout d'une dent, alors que la dentelure des feuilles de *Ler* est absente ou peu marquée (**Figures 3.16A, 3.18A et 3.18C et 3.19**). Les plantes mutantes de l'accession *Ler* qui possèdent l'allèle nul *cuc2-1* ne possèdent pas de dentelure et elles n'ont qu'un hydathode par feuille, situé au sommet (**Figure 3.16B**). Lorsque le même allèle est introgressé dans Col-0, les plantes ont le même phénotype. Les feuilles de *cuc2-1* (Col-0) ont un phénotype de feuilles à bordure lisse d'autant plus prononcé que les plantes sauvages de Col-0 ont une dentelure plus prononcée que *Ler*. Les doubles mutants *drn-drnl-1* ont aussi un unique hydathode au sommet de leurs feuilles et leur dentelure est réduite. Dans le cas de la

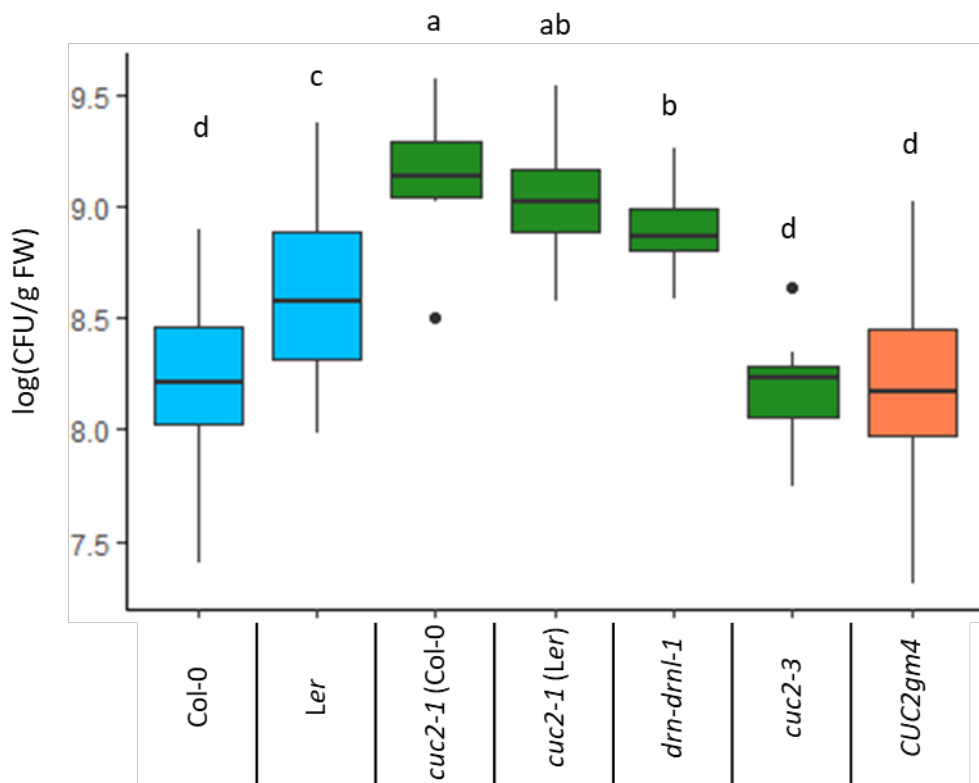


Figure 3.17. Le nombre d'hydathodes n'est pas corrélé au niveau d'infection. Les populations bactériennes (données en CFU/g de matière fraîche) ont été dénombrées 8 dpi après inoculation par aspersion à 10^7 CFU *Xcc* 8004 Δ *xopAC*/mL dans les plantes entières de Col-0, *Ler* ainsi que 5 mutants qui ont plus (rouge) ou moins d'hydathodes (vert) que les plantes sauvages (bleu). Les mutants *cuc2-1* et *drn-drn1-1* contiennent une plus grande quantité de bactéries que les plantes sauvages correspondantes. Quatre à sept plantes par lignée ont été inoculées et trois répétitions indépendantes ont été réalisées. Les groupes statistiques sont déterminés avec le test statistique non paramétrique de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$) et sont indiqués par des lettres différentes.

mutation *cuc2-3*, les plantes ont en moyenne deux hydathodes par feuille. À l'inverse, le mutant de surexpression *CUC2g-m4* est plus dentelé que Col-0 et possède plus de 10 hydathodes (données préliminaires sur feuille de rang 3 de 18 jours, communications personnelles, Damien Vasselon, IJPB). Les feuilles de rangs 6 et 9 ont plus d'hydathodes que les feuilles de rang 3 et les phénotypes des mutants restent équivalents (**Figure 3.16A**). Les feuilles de rang 6 de Col-0 et *Ler* ont en moyenne 6 et 7 hydathodes. Les mutants *cuc2-1* ont un seul hydathode, et les mutants *drn-drnl1* et *cuc2-3* ont en moyenne 4 à 5 hydathodes.

Ces mutants d'*A. thaliana* avec un nombre d'hydathodes différent des plantes sauvages sont intéressants pour explorer l'impact de la densité des points d'entrée sur la population globale de *Xcc*. Autrement dit, est-ce que le nombre d'hydathodes par feuille a un impact sur la sensibilité des plantes à *Xcc* ? L'hypothèse de travail est que moins une feuille a d'hydathodes, moins *Xcc* a de chance de pénétrer les tissus et de démarrer une infection. À l'inverse plus une plante a d'hydathodes, plus *Xcc* a de probabilité d'entrer dans la plante.

3. 2. 2. Contre intuitivement, les mutants *cuc2-1* sont plus sensibles à *Xcc*

Avec la méthode d'inoculation des hydathodes par spray que nous avons mise au point, nous sommes en mesure d'étudier efficacement la sensibilité des mutants à l'infection pour tester notre hypothèse. Pour ce faire, nous avons inoculé les différents mutants *cuc2* et *drn-drnl-1* avec la souche virulente de *Xcc* 8004*ΔxopAC*. De façon surprenante, la quantité de bactérie par plante n'est pas corrélée au nombre d'hydathodes (**Figure 3.17**). En effet, les mutants *cuc2-1* contiennent un plus grand nombre de bactéries par gramme de plante comparés aux plantes sauvages, que ce soit dans le fond Col-0 ou *Ler*, tout comme le double mutant *drn-drnl1*. En revanche, le mutant *cuc2g-m4*, qui a plus d'hydathodes que les accessions sauvages, contient autant de bactéries que les plantes sauvages.

Ces résultats sont très surprenants. Cependant, deux observations parallèles - l'une faite par nos collaborateurs, l'autre lors des expériences décrites ci-dessus - convergent vers une même hypothèse.

3. 2. 3. Les mutants *cuc2-1* développent des lésions aqueuses en condition de guttation

Dans nos conditions, lors de l'infection par spray d'*Arabidopsis thaliana* avec la bactérie *Xcc*, les symptômes sont habituellement observés après environ sept jours. Il s'agit de chloroses qui démarrent au bord des feuilles et suivent les nervures, puis évoluent en nécrose. Dans le cas des mutants *cuc2-1* et *drn-drnl-1*, l'apparition des symptômes de chlorose est plus rapide (environ 3-4 jours après infection). De plus, le jour de la récolte des échantillons pour le

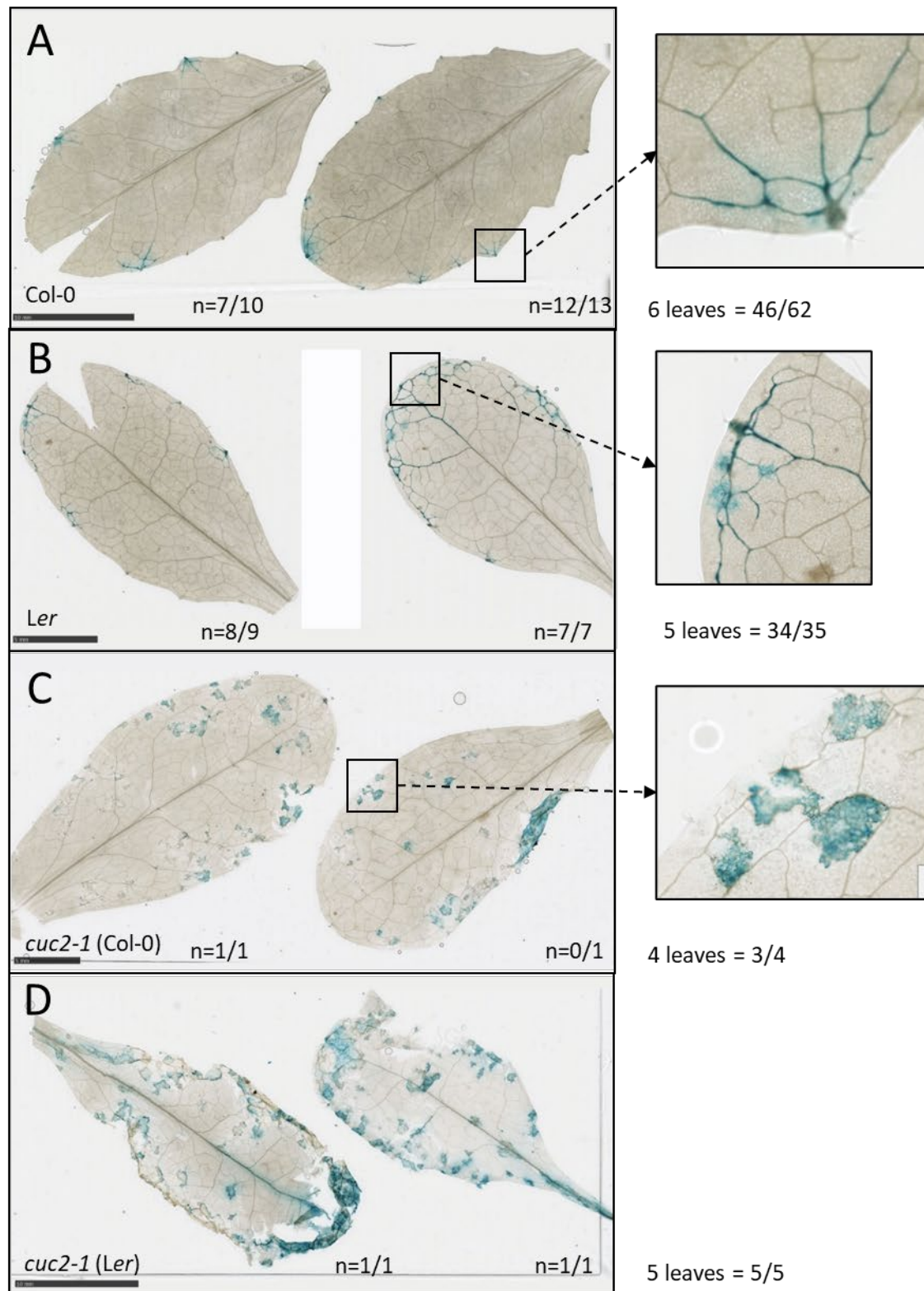


Figure 3.18 (1/2). Localisation histochemique du rapporteur GUS porté par *Xcc AxopAC::GUS-GFP* dans des mutants d'*Arabidopsis thaliana* au nombre d'hydathodes différent de Col-0. Différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* ont été inoculées par aspersion de *Xcc* 8004 Δ *xopAC::GUS-GFP* à 10^7 CFU/mL. Une coloration GUS a été effectuée 8 jours après inoculation sur 2 feuilles par plante. Les feuilles ont été décolorées à l'éthanol, montées entre lame et lamelle et scannées. (A) Col-0, (B) Ler, (C) *cuc2-1* (Col-0), (D) *cuc2-1* (Ler), (E) *drn-drnl-1*, (F) *cuc2-3* et (G) *CUC2g-m4*. Une unique expérience a été réalisée sur deux ou trois plantes par accession. n = nombre d'hydathodes bleu sur nombre total d'hydathodes par feuille. En bas à droite, nombre total de feuilles observées = total d'hydathodes bleus sur total d'hydathodes. (A) et (D), barres d'échelle = 10mm. (B), (C), (E), (F), (G), barres d'échelle = 5mm.

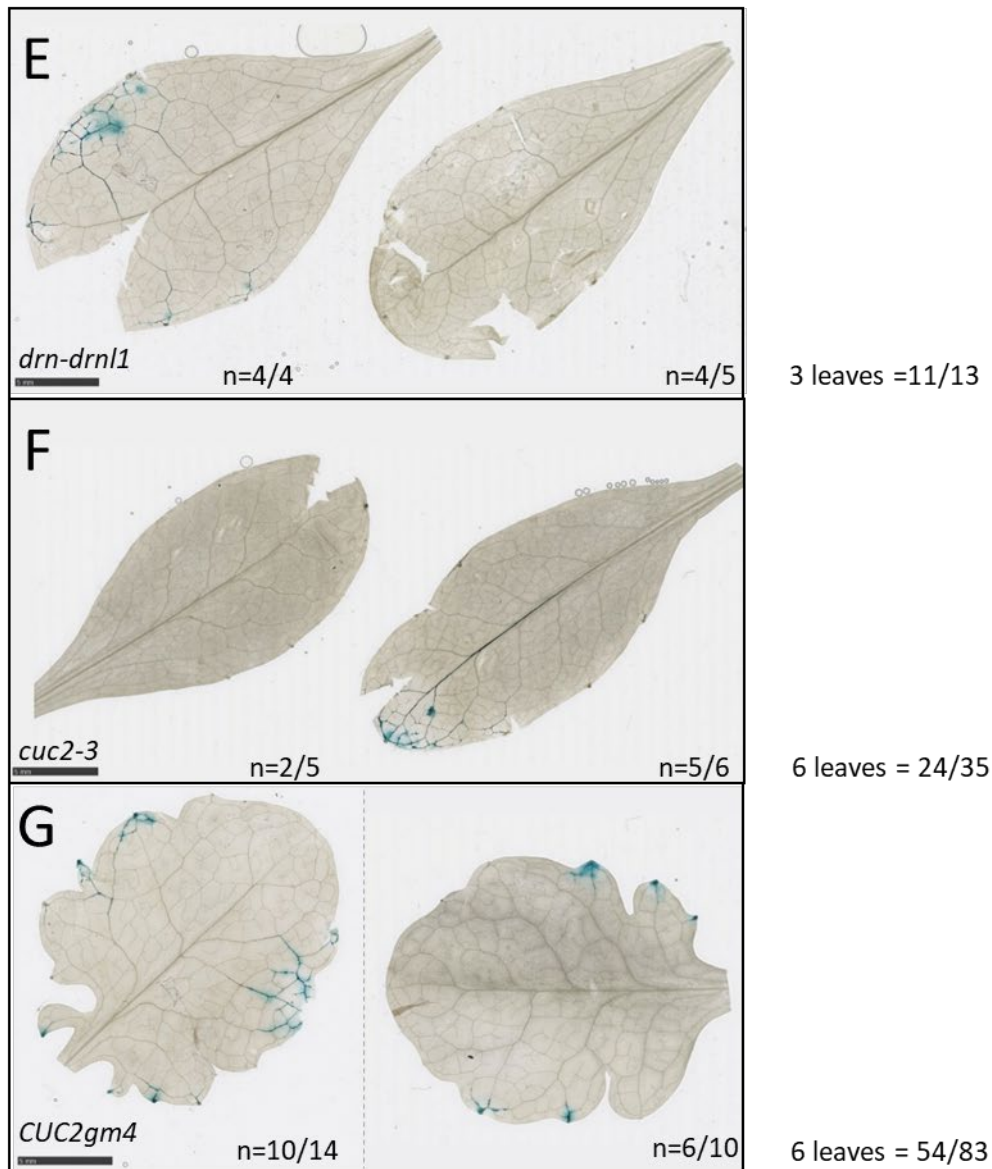


Figure 3.18 (2/2). Localisation histochimique du rapporteur GUS porté par *Xcc AxopAC::GUS-GFP* dans des mutants d'*Arabidopsis thaliana* au nombre d'hydathodes différent de Col-0. Différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* ont été inoculées par aspersion de *Xcc* 8004 Δ *xopAC::GUS-GFP* à 10^7 CFU/mL. Une coloration GUS a été effectuée 8 jours après inoculation sur 2 feuilles par plante. Les feuilles ont été décolorées à l'éthanol, montées entre lame et lamelle et scannées. (A) Col-0, (B) Ler, (C) *cuc2-1* (Col-0), (D) *cuc2-1* (Ler), (E) *drn-drnl-1*, (F) *cuc2-3* et (G) *CUC2g-m4*. Une unique expérience a été réalisée sur deux ou trois plantes par accession. n = nombre d'hydathodes bleu sur nombre total d'hydathodes par feuille. En bas à droite, nombre total de feuilles observées = total d'hydathodes bleus sur total d'hydathodes. (A) et (D), barres d'échelle = 10mm. (B), (C), (E), (F), (G), barres d'échelle = 5mm.

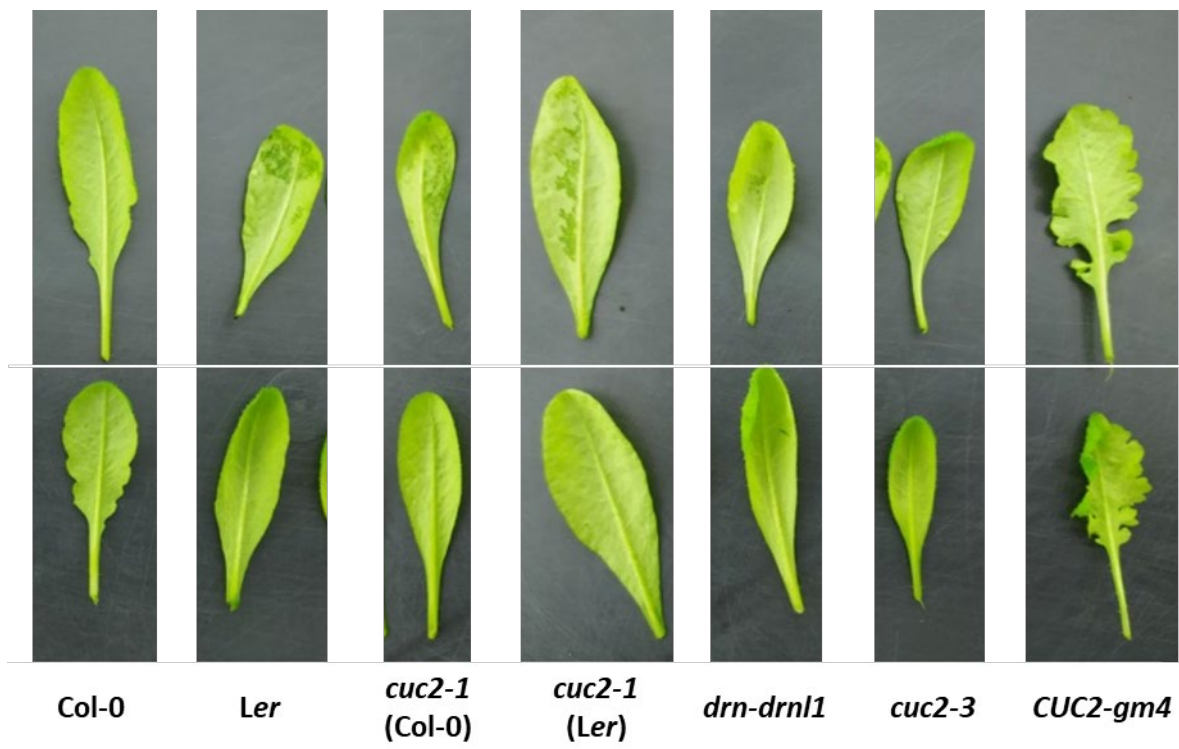


Figure 3.19. Illustration du rôle des hydathodes dans la protection des tissus contre les lésions aqueuses. Les différents mutants d'*A. thaliana* de *CUC2* et *DRN-DRNL1*, âgés de 6 semaines, sont placés durant 4 nuits dans des conditions induisant la guttation (en haut, 100% d'humidité) ou non (en bas). Lorsque des lésions aqueuses sont observées, elles sont réversibles en 3h si les plantes sont retirées des conditions induisant la guttation. Résultats obtenus par D. Vasselon et P. Laufs (IJPB).

dénombrement bactérien, les symptômes n'étaient pas des nécroses mais de la macération des tissus localisée dans le mésophylle plutôt que sur la bordure du limbe. La souche de *Xcc* utilisée portant les gènes GUS et GFP en intégration génomique, nous avons procédé à des colorations GUS des feuilles infectées pour mieux comprendre le phénomène. Alors que les accessions *Ler* et *Col-0* présentent une colonisation par *Xcc* d'une majorité de leurs hydathodes (**Figure 3.18**) et des vaisseaux du xylème adjacents, nous observons chez les mutants *cuc2-1* des zones d'accumulation de *Xcc* dans le mésophylle, qui ne sont liées ni aux hydathodes ni au réseau vasculaire. Au contraire, les zones bleues semblent contenues ou délimitées par les vaisseaux vasculaires. Dans les mutants *cuc2-1*, *Xcc* ne serait donc pas entré par les hydathodes.

Par ailleurs, nos partenaires IJPB ont vu qu'en condition de guttation, les tissus du mésophylle des mutants *cuc2-1* (et *drn-drnl1*) se retrouvent imbibés d'eau (symptômes de *water soaking* = lésion aqueuse) (**Figure 3.19**). C'est aussi parfois le cas chez l'accession sauvage *Ler*. Ces lésions aqueuses sont réversibles en quelques heures. En revanche, *Col-0* et le mutant *CUC2g-m4* ne présentent jamais de lésions aqueuses. J'ai fait la même observation lors des infections. La nuit avant de faire l'expérience, les plantes sont placées dans des conditions qui induisent la guttation, et le matin lors de l'inoculation j'ai pu observer que la grande majorité des mutants *cuc2-1* et *drn-drnl-1* présentent des lésions aqueuses, contrairement aux autres lignées (données non montrées).

3. 2. 4. Discussion

Les études de *CUC2* et *DRN-DRNL1* nous ont montré que ces gènes étaient impliqués dans la formation de la dentelure des feuilles. À travers nos expériences, nous avons vu que ces gènes codant des facteurs de transcription, régulent effectivement la morphologie de la denture des feuilles, mais aussi le nombre d'hydathodes qui se forment par feuille. Reste à découvrir si ces facteurs de transcription sont impliqués directement ou indirectement dans la formation des hydathodes. Comme les hydathodes sont très souvent associés aux dents des feuilles (Perrin, 1972; Lersten and Curtis, 1985; Belin-Depoux, 1989; Rios et al., 2020), il peut y avoir des voies de signalisation communes, ou une interaction entre les mécanismes de formation des hydathodes et des dents. Une autre possibilité serait un lien plus indirect avec l'auxine, qui joue un rôle dans la formation des dents, mais aussi du système vasculaire, et donc peut-être du xylème hypertrophié des hydathodes.

D'autre part, il est intéressant de noter que les plantes sauvages de *Col-0* et *Ler* n'ont pas la même morphologie : *Col-0* est plus dentelé que *Ler*. Cependant, les deux accessions

possèdent le même nombre d'hydathodes. Donc, malgré une dentelure moins prononcée que Col-0, la formation des hydathodes de *Ler* n'est pas impactée. Comparer ces deux lignées, et comparer une collection d'accessions avec des dentelures et des nombres d'hydathodes variables sera un bon moyen d'étudier les mécanismes de développement et de formation des hydathodes.

Les lésions aqueuses observées chez les mutants *cuc2-1* et *drm-drnl-1* en condition de guttation sont très probablement provoquées par le faible nombre d'hydathodes de ces mutants. D'après la littérature, la guttation est provoquée par la pression racinaire et permet de maintenir un flux d'eau ascendant dans la plante lorsque la transpiration est limitée (Cerutti et al., 2019). Les pores des hydathodes sont le chemin de moindre résistance par lequel le flux d'eau (de sève brute) s'échappe. Dans le cas des mutants qui ne possèdent qu'un ou deux hydathodes, il n'y aurait pas assez de voies pour relâcher la pression et la sève brute s'épancherait dans l'apoplaste, provoquant les lésions aqueuses. Le lien entre les hydathodes et les lésions aqueuses a déjà été établi (Feild et al., 2005), puisqu'un des rôles suggérés pour les hydathodes est en effet de protéger les tissus contre les lésions aqueuses.

Le troisième phénotype des mutants *cuc2-1* est une sensibilité plus élevée à *Xcc* que les plantes sauvages, puisque la population de bactéries dans la rosette est plus importante que celle des plantes sauvages.

Un autre indice est apporté par les colorations GUS : avec les mutants possédant un seul hydathode, la majorité des bactéries présentes dans les feuilles ne sont pas entrées par l'hydathode. Elles ont directement commencé à se multiplier dans le mésophylle. Il est fort probable que dans ce cas, elles soient entrées par les stomates (ou par des lésions de la cuticule dues à l'accumulation d'eau entre les cellules ?) et se soient installées dans l'apoplaste. Peut-être que *Xcc* entre toujours par les pores des hydathodes et par les stomates. Toutefois, dans les conditions « habituelles » de développement de la nervature noire, au champ comme en laboratoire, aucune colonisation directe du mésophylle n'est observée. Avec les lésions aqueuses, les chambres sous-stomatiques et l'apoplaste seraient remplis d'eau liquide : les bactéries peuvent s'y multiplier et infecter la plante. Il est aussi possible qu'il y ait une différence de défenses des plantes entre les hydathodes et l'apoplaste contre *Xcc* ? Dans tous les cas, l'accès à l'eau semble être un facteur déterminant de la virulence de *Xcc*. Les expériences décrites dans l'introduction (**Chapitre 1 Partie 3**) vont dans ce sens.



Figure 3.20. Effet du scellage des hydathodes avec divers matériaux. Six jours après scellage des hydathodes, les plantes d'*Arabidopsis thaliana* col-0 ont été exposées pendant une nuit à des conditions induisant la guttation. Les feuilles ont été détachées pour observation. Les hydathodes n'ont pas été scellés (A). Les hydathodes ont été scellés avec du latex (gomme de masquage pour aquarelle Pébéo®, (B)) ou de la graisse de silicone (C). Les lésions aqueuses de l'apoplaste se produit lorsque les hydathodes sont scellés avec de la graisse de silicone et que la guttation est induite. Les lésions aqueuses se résorbe lorsque la guttation n'est plus induite.

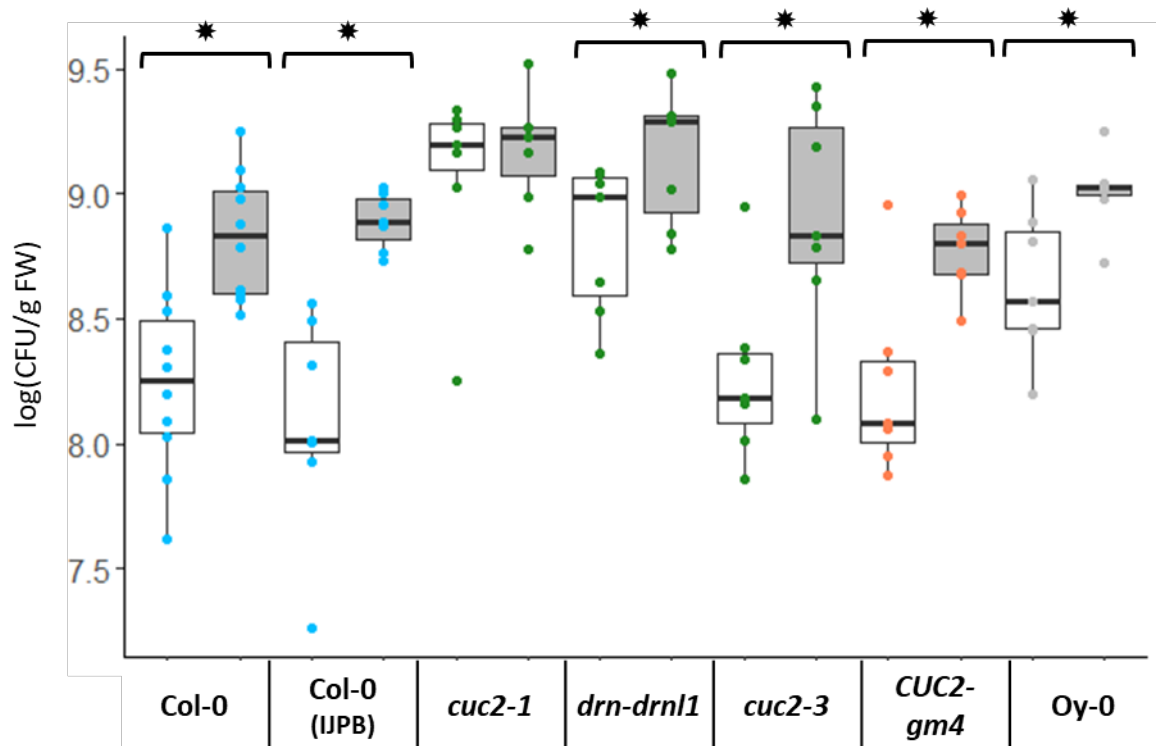


Figure 3.21. L'absence de guttation modifie la multiplication de *Xcc in planta*. Populations bactériennes (en CFU/g de matière fraîche) à 8dpi dans les rosettes de mutants d'*Arabidopsis thaliana* qui ont plus (rouge) ou moins d'hydathodes (vert) que les plantes sauvages (bleu), après inoculation par aspersion à 10^7 CFU *Xcc* 8004 Δ *xopAC*/mL. Les boxplots représentent les données obtenues dans un réplicat biologique avec 6 plantes par lignée, et 10 plantes pour Col-0. Par plante, 4 feuilles ont les hydathodes scellés à la graisse de silicone (gris) ou non (blanc). * = pour une lignée donnée, différence significative entre les plantes scellées et non scellées (Test de Kruskal-Wallis, $\alpha = 0,05$)

Faute de lignées complémentées de *cuc2-1* et *drn-drnl-1*, et de temps pour les générer et valider le lien entre nombre d'hydathodes, lésions aqueuses dans l'apoplaste et niveau d'infection, j'ai mis en place une autre approche, décrite dans la section suivante.

3. 3. Validation du lien entre lésions aqueuses et niveau d'infection

3. 3. 1. Reproduction des lésions aqueuses sur *A. thaliana*

Afin de reproduire un phénotype de lésions aqueuses sur Col-0, j'ai souhaité « fabriquer » un mutant qui n'aurait plus aucun hydathode. Inspirée par (Feild et al., 2005) qui scelle les hydathodes de *Chloranthus japonicus* avec du pansement liquide, j'ai testé trois produits hydrophobes et que j'espère sans effet toxique sur les tissus : de l'huile de paraffine, de la graisse de silicone et du latex liquide. J'ai écarté l'huile de paraffine, car elle diffuse dans l'apoplaste dès son application sur la bordure des feuilles. En condition de guttation, la graisse de silicone provoque des lésions aqueuses (**Figure 3.20C**), qui se résorbent en quelques heures quand les plantes ne sont plus exposées à 100% d'humidité. Après six jours sans provoquer de guttation, les feuilles traitées à la graisse de silicone n'ont pas de signe apparent de stress. En revanche, les bordures des feuilles dont les hydathodes sont scellés au latex liquide se recroquevillent et s'assèchent (**Figure 3.20B**) et ce latex ne semble pas boucher les hydathodes, car il n'y a pas signe de lésions aqueuses. J'ai donc poursuivi les expériences avec la graisse de silicone pour sceller les hydathodes, ce qui permet de reproduire le phénotype de *cuc2-1*.

Si les hydathodes sont scellés, il y a une augmentation significative de la multiplication bactérienne par rapport aux plantes non scellées chez les Col-0 et Oy-0 sauvages, les mutants *cuc2-3*, *drn-drnl1* et *CUC2g-m4* mais pas pour *cuc2-1*(Col-0) (**Figure 3.21**). Toutes les feuilles scellées ont des lésions aqueuses juste avant l'inoculation, quand la guttation a été induite pendant la nuit (non montré), et après huit jours, ces mêmes feuilles sont à des stades plus ou moins avancés de macération (non montré). Que le scellage des hydathodes ait un effet sur toutes les lignées testées sauf *cuc2-1* montre bien que c'est la fermeture des hydathodes qui est responsable de l'apparition des lésions aqueuses et que ces lésions sont corrélées à l'augmentation des populations de *Xcc in planta*.

Cependant, sans accès aux hydathodes, *Xcc* entre à l'intérieur des tissus par un autre chemin, probablement les stomates. Dans les lésions aqueuses, l'apoplaste rempli d'eau serait alors un milieu plus favorable à la multiplication de *Xcc*. Pour aller plus loin, il envisageable de tester cette hypothèse chez une autre plante hôte de *Xcc*, comme le chou-fleur.

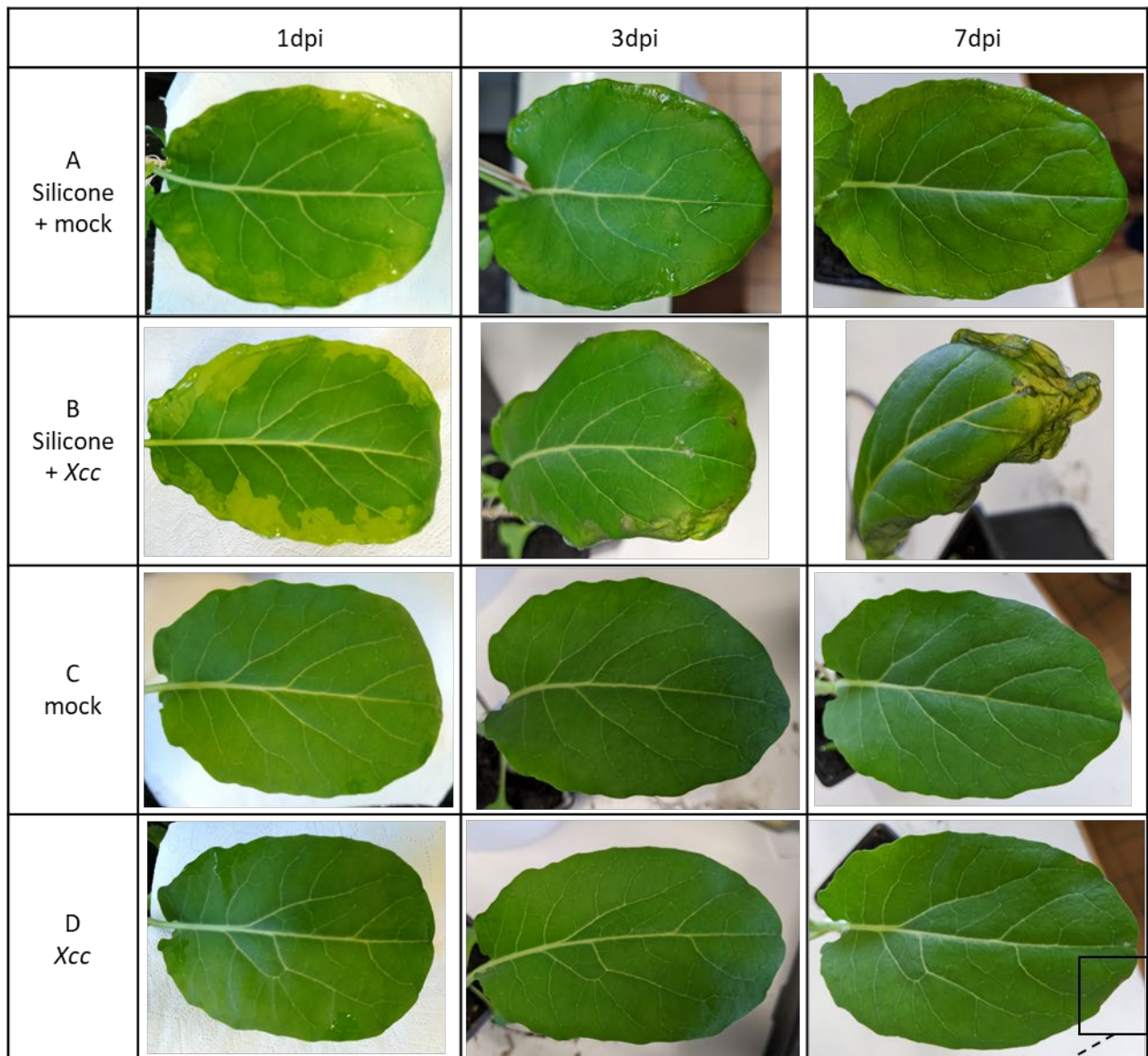
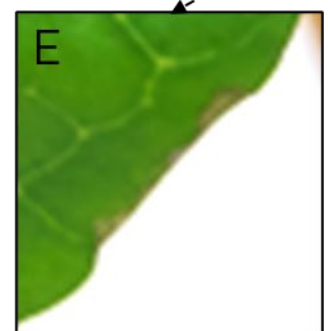


Figure 3.22. Le blocage de la guttation est corrélé à des symptômes accrus chez le chou-fleur Clovis infecté par *Xcc* 8004 (Données préliminaires). La deuxième feuille vraie du chou-fleur *B. oleracea* var. *botrytis* cv. Clovis a été infectée par trempage dans une suspension de *Xcc* 8004 sauvage (10^8 CFU/mL + 0,5% Tween80), ou dans une solution “mock” de $MgCl_2$ à 1mM, avant ou après que les hydathodes aient été scellés avec de la graisse de silicone. Chronologiquement, les plantes sont scellées (ou non), passent une nuit dans des conditions induisant la guttation (100% humidité), puis sont inoculées et passent une deuxième nuit à 100% d’humidité. (A) silicone + Mock, (B) silicone + *Xcc* 8004, (C) Mock, (D) *Xcc* 8004, (E) agrandissement de (D) 7dpi, contraste et luminosité augmentés. Les symptômes sont observés à 0, 1, 3 et 7 dpi. L’expérience a été réalisée par A. Boulanger, LIPME-UT3, sur une ou deux plantes par condition.



3. 3. 2. Test préliminaire de l'effet des lésions aqueuses l'infection du chou-fleur par *Xcc*

Lors d'infection par trempage du chou-fleur var. Clovis, les premiers symptômes apparaissent vers 6 jours. La nécrose de certains hydathodes (Cerutti et al., 2017) est visible à 7dpi (**Figure 3.22D**). Les symptômes évoluent ensuite en chlorose et nécroses qui remontent le long des nervures.

Comme *A. thaliana* Col-0, le chou-fleur Clovis produit de la guttation lorsque l'hygrométrie est élevée (100%), sans présenter de lésions aqueuses dans ses tissus (**Figure 3.22C**). En condition de guttation, l'application de graisse de silicone sur les hydathodes de la deuxième feuille du chou-fleur Clovis provoque des lésions aqueuses dans le mésophylle, localisées sur tout le pourtour de la feuille (**Figure 3.22A, B**). Lorsque la feuille est inoculée par trempage dans une suspension de *Xcc* 8004, des symptômes de macération apparaissent dès 3dpi et s'accroissent à 7dpi (**Figure 3.22B**). Si les hydathodes sont scellés à la graisse de silicone, et la feuille trempée dans une solution mock (MgCl₂ 1mM), après les lésions aqueuses de 1dpi, la feuille ne porte aucun symptôme, même après 7 jours (**Figure 3.22A**). La présence de silicone est bien responsable de l'apparition des lésions aqueuses. D'autre part, comme pour *A. thaliana*, malgré les hydathodes bouchés, *Xcc* est tout de même capable d'entrer dans les tissus. Chez Clovis, les symptômes qui dénotent de la présence de *Xcc* sont superposés aux zones de lésions aqueuses (**Figure 3.22B**), ce qui souligne bien l'intérêt de la présence d'eau dans l'apoplaste pour la colonisation par *Xcc* et sa multiplication. Par un souci de lisibilité de la **Figure 3.22**, les résultats de l'expérience sont résumés dans le **Tableau 3.4**.

3. 3. 3. Discussion

Les hydathodes représentent un continuum aqueux du milieu extérieur vers le système vasculaire. Avec les lésions aqueuses, les stomates reproduisent ce continuum aqueux vers l'apoplaste et *Xcc* semble pouvoir s'y installer pour démarrer l'infection. L'accès à l'eau serait donc un facteur critique de la virulence de *Xcc*, qui détermine la biologie de l'interaction et l'aspect des symptômes.

En tous cas, comme vu dans d'autres études décrites dans le **Chapitre 1 Partie 3**, l'apoplaste humide permet aux bactéries de s'approprier une nouvelle niche. Il serait intéressant de voir si des *Xanthomonas* non pathogènes des Brassicacées, ou non pathogènes des hydathodes, peuvent le devenir dans l'apoplaste imbibé d'eau d'*A. thaliana* ou de Clovis. Pour tester cela, le mutant *cuc2-1* et la technique du scellage des hydathodes à la graisse de silicone sont équivalentes.

Tableau 3.4. Le blocage de la guttation est corrélé à des symptômes accrus chez le chou-fleur Clovis infecté par *Xcc* 8004 (Données préliminaires).

La deuxième feuille vraie du chou-fleur *B. oleracea* var. *botrytis* cv. Clovis a été infectée par trempage dans une suspension de *Xcc* 8004 sauvage (10^8 CFU/mL + 0,5% Tween80), ou dans une solution “mock” de $MgCl_2$ à 1mM, avant ou après que les hydathodes aient été scellés avec de la graisse de silicone. Chronologiquement, les plantes sont scellées (ou non), passent une nuit dans des conditions induisant la guttation (100% humidité), puis sont inoculées et passent une deuxième nuit à 100% d’humidité. (A) silicone + Mock, (B) silicone + *Xcc* 8004, (C) Mock, (D) *Xcc* 8004. Les symptômes sont observés à 0, 1, 3 et 7 dpi. L’expérience a été réalisée par A. Boulanger, LIPME-UT3, sur une ou deux plantes par condition.

	0 dpi	1 dpi	3 dpi	7 dpi
A (Silicone + mock)	Flooding	Flooding	-	-
B (Silicone + Xcc)	Flooding	Flooding	Rot	Rot
C (mock)	-	-	-	-
D (Xcc)	-	-	Necrosis	Necrosis

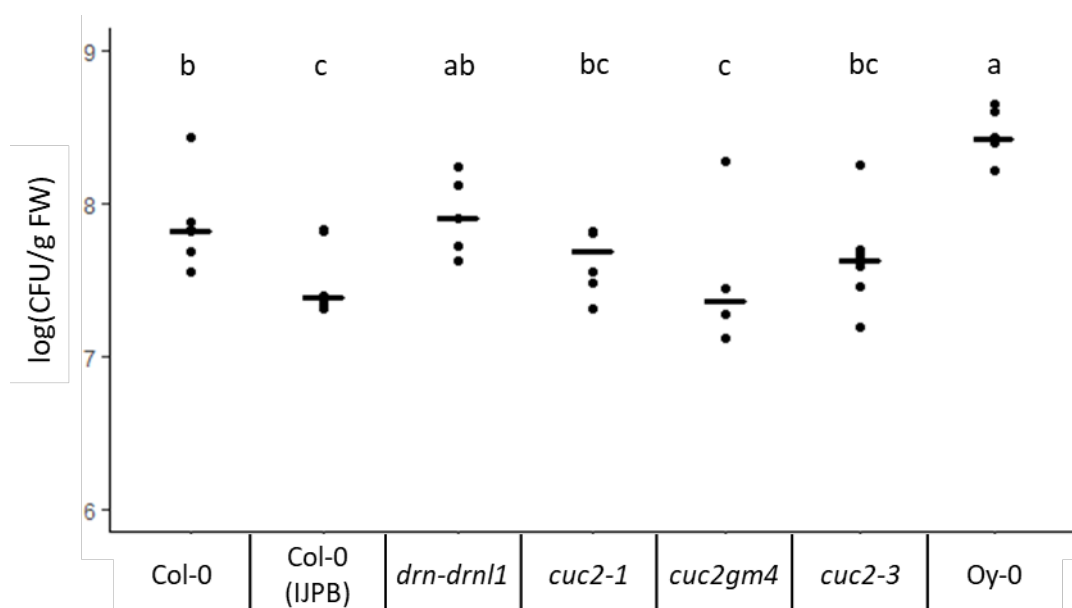


Figure 3.23. Les mutations *cuc2* et *drn-drn1* ne semblent pas avoir d’effet sur la multiplication de *Xcc* dans le mésophylle d’*A. thaliana*. Populations bactériennes (en CFU/g de matière fraîche) dans les feuilles de mutants d’*A. thaliana*, 3 jours après inoculation par infiltration de *Xcc* 8004 $\Delta xopAC$ dans le mésophylle à une concentration de 10^6 CFU/mL ($DO_{600nm} = 0,001$). Quatre feuilles ont été infiltrées par plante et 6 plantes ont été testées par lignée. Chaque point représente la moyenne des 4 feuilles par plante. Une seule expérience a été effectuée. Les lettres indiquent les groupes statistiquement différents selon le test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$).

3. 4. Les mutations *cuc2* n'ont pas effet sur la croissance de *Xcc* au stade post-invasif

Afin d'examiner si la mutation de *CUC2* ou *DRN-DRNL1* a un effet au stade post-invasif lors de l'infection d'*A. thaliana*, j'ai effectué une expérience préliminaire, en infiltrant *Xcc* 8004 Δ *xopAC* dans le mésophylle des différents mutants de *CUC2* et *DRN-DRNL1*. Il n'y a pas de différence significative, les plantes contiennent toutes entre 7,8 et 8 log(CFU/g de matière fraîche) (**Figure 3.23**). Il y a seulement une différence entre les populations de *Xcc* dans Col-0 et Oy-0, l'accession hyper-sensible (**Figure 3.23**). Il semble qu'il n'y a pas d'effet post-invasif de ces gènes dans le mésophylle, ou si effet il y a, il est restreint aux hydathodes. Il est possible que ce soit l'effet « mécanique » d'avoir un unique hydathode qui provoquent des lésions aqueuses, qui elles-mêmes modifient la sensibilité des lignées mutantes à *Xcc*.

3. 5. L'ouverture des stomates n'affecte pas la croissance de *Xcc in planta*

Comme il a été discuté précédemment, lorsqu'il n'y a plus d'hydathodes sur les feuilles d'*A. thaliana*, des lésions aqueuses apparaissent et les plantes sont alors plus sensibles à l'infection par *Xcc*. Cependant, il semble que dans ce cas, *Xcc* n'entre pas par les hydathodes, ou s'y multiplie moins rapidement que dans l'apoplaste. Notre hypothèse est que grâce aux lésions aqueuses, *Xcc* peut se multiplier dans l'apoplaste à partir des chambres sous-somatiques, alors que sans lésions aqueuses, la bactérie, si elle est capable d'entrer dans les stomates, ne s'y multiplie pas ou très peu. Afin d'étudier les rôles des stomates dans cette interaction, j'ai appliqué le protocole d'infection par aspersion sur les mutants *ost2-2D* (Open STomata) dont les pores des stomates sont constitutivement ouverts, et *foc11-1*, dont les stomates sont fermés par la fusion de la cuticule des cellules de gardes (Hunt et al., 2017). Une seule expérience a été réalisée sur 12 plantes par accession, les résultats sont donc préliminaires. Il n'y a pas de différence significative en terme de populations bactériennes entre le contrôle et les mutants, ni entre les mutants (**Figure 3.24**). De plus, aucun des deux mutants ne présentait de lésions aqueuses lors de l'induction de la guttation.

Premièrement, le mutant *ost2-2D* montre que malgré des stomates constitutivement ouverts, *Xcc* n'a pas l'air de se multiplier mieux que dans Col-0. Ceci indiquerait que *Xcc* n'a pas de problème d'accès à l'apoplaste par les stomates, mais que le facteur limitant sa croissance dans l'apoplaste est post-invasif et, dans notre hypothèse, lié à la présence d'eau. Ensuite, le mutant *foc11-1* montrerait que les hydathodes suffisent à relâcher la pression du flux d'eau par guttation, malgré les stomates fermés. Il est aussi possible que les hydathodes fermés de *foc11-*

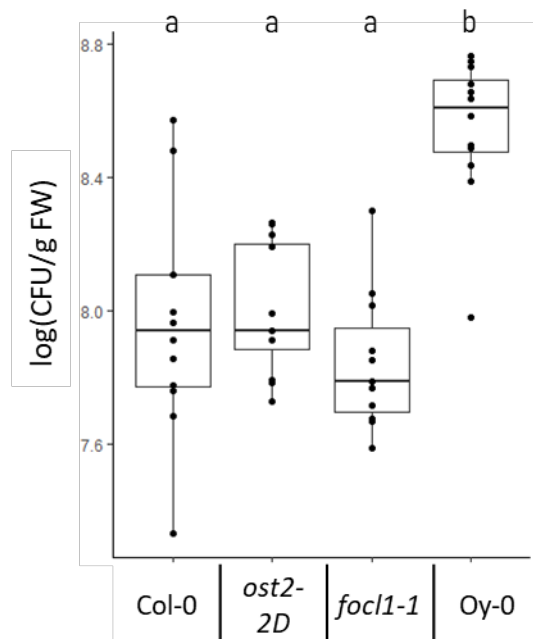


Figure 3.24. La modification de l'ouverture des stomates ne semble pas affecter pas la croissance de *Xcc in planta*. Populations bactériennes (en CFU/g de matière fraîche) à 7 dpi dans les rosettes d'*Arabidopsis thaliana* après inoculation par aspersion de *Xcc* 8004 Δ *xopAC* à 10^7 CFU/mL. Les boxplots représentent les données obtenues dans un réplicat biologique avec 12 plantes par lignée (11 pour *focl1-1*). Les groupes statistiques sont déterminés avec le test statistique non paramétrique de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$) et sont indiqués par des lettres différentes.

I soient assez perméables pour laisser circuler les flux d'eau gazeuse. En plus d'effectuer d'autres réplicats biologiques pour valider ou non ces résultats, une expérience qui pourrait apporter d'autres réponses sur l'entrée de *Xcc* par les stomates serait de sceller les hydathodes de *focl1-1*. Dans ce cas, les feuilles présenteraient des lésions aqueuses, mais *Xcc* n'aurait pas accès à l'apoplaste par les stomates constitutivement fermés. Si les bactéries se multiplient tout de même mieux que dans le contrôle, cela signifie qu'elles accèdent à l'apoplaste par d'autres voies d'entrées, comme des blessures dans la cuticule provoquées par les lésions aqueuses. Si ce n'est pas le cas, *Xcc* entre en effet dans les feuilles par les stomates et sa capacité à s'y multiplier dépend de la présence d'eau liquide.

Chapitre 4 : Discussion générale

Qu'est ce qui fait d'un hydathode un hydathode ? Cette question regroupe toutes les interrogations auxquelles ces travaux de thèse ont tenté de répondre. Pour l'aborder, nous avons étudié les particularités génétiques et physiologiques des hydathodes, exploré l'immunité de cet organe qui sert de lieu d'entrée à *Xcc* et enfin sondé les liens entre la virulence de *Xcc*, les hydathodes et l'eau, puisqu'après tout, l'eau *hūdōr*, est centrale dans les *hydathodes*. Les résultats obtenus autour de ces questions durant ma thèse ont été discutés à la fin des parties où ils sont présentés. Ici, je vais reprendre les résultats principaux de ce projet de thèse et proposer des pistes pour poursuivre ces travaux.

Conclusions

Nous avons commencé par étudier les spécificités physiologiques des hydathodes par des approches de transcriptomique et de métabolomique (**Chapitre 3 - partie 1**). La comparaison des tissus des hydathodes et du mésophylle d'*A. thaliana* et du chou-fleur a permis de montrer que les hydathodes sont des organes possédant une signature transcriptomique propre. Les nombreux transporteurs exprimés spécifiquement dans les hydathodes semblent capables de capturer une partie des métaboliques de la sève du xylème avant sa sortie sous forme de guttation. Dans cette partie, pour étudier les bases génétiques de l'immunité des hydathodes, nous avons également mis en parallèle la réponse transcriptionnelle des hydathodes de chou-fleur en réponse à une souche de *Xcc* virulente (8004) et avirulente (8004 Δ *hrcV*) à deux étapes de l'infection précoces : 1 et 3 dpi. Ceci est la première description transcriptomique de la réponse immunitaire mise en place dans les hydathodes. L'hypothèse qui ressort de ces résultats est que la réponse à 1 dpi n'est pas liée à la virulence ou l'avirulence de la bactérie : il semble que les cellules des hydathodes perçoivent les deux souches et y réagissent de la même manière. Plus tard dans l'interaction, à 3 dpi, les réponses immunitaires instaurées contre la souche avirulente de *Xcc* sont plus importantes que celles contre la souche virulente, qui est capable de supprimer l'immunité de la plante grâce à son système de sécrétion de type III et ses effecteurs de type III.

Après cela, nous avons poursuivi sur la question de l'immunité des hydathodes, ainsi que du système vasculaire, dans le pathosystème *A. thaliana* Col-0/*Xcc* 8004. La stratégie choisie pour cette partie était d'effectuer le crible d'une collection de plantes mutantes sur le critère de leur immunité à *Xcc* lors d'une infection par les hydathodes (**Chapitre 3 Partie 2**). Pour commencer, il a fallu mettre au point une méthode de phénotypage fiable et adaptée au criblage

de mutants à moyen débit. Nous sommes donc passé d'une méthode d'infection par trempage à une inoculation par pulvérisation d'une suspension de bactéries sur les plantes, ce qui diminue fortement le temps de manutention et permet d'effectuer l'expérience à grande échelle : 104 plantes peuvent être inoculées à la fois. Le taux d'infection des hydathodes a été amélioré en maîtrisant l'humidité et les cycles de guttation. Ensuite, le choix et l'optimisation du phénotypage s'est porté sur une méthode objective, quantitative et faisable rapidement sur une grande quantité de plantes : le dénombrement bactérien *in planta*. Tout ce protocole est maintenant utilisé pour d'autres projets dans notre équipe. Appliqué au criblage de la collection de lignées HEM, il a permis d'identifier 63 lignées ayant un phénotype mutant sur les 358 testées. Étonnamment, pour 54 de ces lignées, la multiplication de *Xcc* est plus élevée que dans le contrôle, alors qu'elle est plus faible dans seulement 9 lignées. Si effectivement les mutations augmentent plus souvent la sensibilité d'*A. thaliana* à *Xcc* qu'elles ne la baissent, alors *A. thaliana* possède plus de gènes impliqués dans la résistance à *Xcc* que dans la sensibilité. En parallèle, un partenaire du projet NEPRHON a criblé les lignées HEM sur le critère du nombre d'hydathode. Sur les presque 900 lignées, une centaine a un nombre d'hydathodes différent de Col-0. Ce critère morphologique semble corrélé au phénotype d'immunité. La tendance observée est la suivante : les mutants portant moins d'hydathodes ont plus souvent une immunité modifiée que les mutants avec un nombre d'hydathodes identique à Col-0.

La dernière partie du projet est liée à cette précédente observation, et s'articule autour du rôle de l'eau dans la pathogénie de *Xcc*, l'immunité végétale et la phénologie des symptômes. A l'aide de la méthode de criblage développée au cours de ce projet, nous avons exploré le lien potentiel entre le nombre d'hydathodes, la présence d'eau dans l'apoplaste et la stratégie infectieuse de *Xcc* (**Chapitre 3 partie 3**). Les mutants d'*A. thaliana* qui ne possèdent plus qu'un hydathode développent des lésions aqueuses lorsque les conditions sont propices à la guttation. En scellant les hydathodes de différentes lignées d'*A. thaliana*, il est possible de reproduire le phénotype de lésions aqueuses des feuilles, reliant ainsi la présence des hydathodes à la protection des tissus contre l'imprégnation de l'apoplaste. De plus, lors de l'infection par *Xcc* des mutants avec peu d'hydathodes, les bactéries se multiplient plus que dans les plantes sauvages et elles sont alors localisées non pas dans les hydathodes et le système vasculaire mais dans le mésophylle des feuilles. Les lésions aqueuses sont corrélées à la multiplication des bactéries, comme il a été démontré dans d'autres pathosystèmes (Johnson, 1937; Young, 1974; Xin et al., 2016). Il semble que la présence d'eau dans l'apoplaste permet à *Xcc* de se comporter comme une bactérie phytopathogène non vasculaire.

Perspectives

Mes travaux de thèse ont apporté une première description des réponses transcriptomiques des hydathodes au cours d'une infection par *Xcc*. Ils ont aussi posé la première pierre du crible d'une collection de mutants d'*A. thaliana* sur leur immunité lors de l'infection de *Xcc* par les hydathodes, et éclairé l'importance de l'accès à l'eau pour l'étiologie de *Xcc*. Néanmoins, la contrainte de temps de ce projet n'a pas permis la caractérisation de gènes impliqués dans l'immunité des hydathodes et du système vasculaire des Brassicacées, bien que plusieurs pistes aient été mises au jour.

Poursuivre l'étude de l'immunité post-invasive des hydathodes

L'étude des caractéristiques transcriptomiques et physiologiques des hydathodes nous permet de mieux comprendre leur rôle dans la plante. Il sera intéressant d'exploiter ces connaissances dans le cadre des interactions avec *Xcc*. Par exemple, si l'on mutagénise les gènes caractéristiques des parois et de la cuticule des hydathodes, est-ce que cela modifiera la sensibilité de la plante à *Xcc* ? Est-ce que cela va avoir un effet sur la guttation, ou la capacité d'accroche de *Xcc* aux tissus et, *in fine* sur la maladie ? Y-a-il des transporteurs, comme il a été testé avec *PHT1;4* qui ont un rôle majeur dans la composition du fluide de guttation et sont utilisés par les hydathodes ou *Xcc* pour modifier la disponibilité de certains nutriments ? Se pose aussi la question de l'auxine, une hormone dont les voies de synthèse, de signalisation et de transport sont importantes pour la physiologie de l'hydathode (**Annexe I et II**), mais aussi pour ses réactions immunitaires (**Chapitre 3 Partie 1.2**). Là aussi l'importance de l'auxine pourra être approfondie par l'étude de mutants chez *A. thaliana*.

Au préalable, une validation indépendante des résultats de transcriptomique des hydathodes infectés de chou-fleur sera effectuée par qRT-PCR, afin de lever un doute sur l'identité des échantillons. Les primers d'une dizaine de gènes ont déjà été synthétisés. Par ailleurs, les deux gènes candidats révélés dans le **Chapitre 3 Partie 1.2**, *PRX17* et *RLP54*, seront aussi validés par génétique inverse. Il sera important de mettre en parallèle les résultats de J. Luneau et A. Boulanger (Luneau et al., 2022a; Luneau et al., 2022b) avec ceux obtenus durant ce projet, puisque tous ont été obtenus dans les hydathodes du chou-fleur Clovis infectés par *Xcc* 8004. Ils apportent des informations sur le transcriptome de l'agent pathogène, ce qui permettra d'avoir une image globale de l'interaction entre le chou-fleur et *Xcc*.

Le criblage des lignées HEM va pouvoir être valorisé rapidement. En effet, toute la collection est en cours de séquençage, grâce à une collaboration entre notre équipe et l'un des

créateurs des lignées (R. Mercier, Max Planck Institute, Cologne). Une fois ceci fait, il sera possible de faire de la génétique d'association pour relier les phénotypes découverts aux mutations identifiées par le séquençage. Dans un premier temps, le crible va être terminé dans l'équipe. Les lignées qui présenteront un phénotype mutant seront validées par un crible secondaire, où de plus grands effectifs seront testés.

Un bon moyen de vérifier la validité du crible sera de voir si l'on retrouve parmi les gènes qui seront associés aux phénotypes des gènes déjà connus pour leur implication dans l'immunité d'*A. thaliana* à *Xcc*, comme BIK1 (Wang et al., 2015) ou *CUC2*, qui a été identifié durant cette étude. Plusieurs options sont envisageables pour valider la fonction de résistance/sensibilité des gènes qui seront identifiés. En effectuant des back-cross des lignées d'intérêt avec Col-0, il sera possible d'isoler la mutation responsable du phénotype mutant. Autrement, utiliser des mutants provenant de banques T-DNA ou mutagéniser les gènes candidats permettra aussi de vérifier le rôle des gènes candidats. D'autre part, il est possible que par ce crible nous identifions des gènes impliqués indirectement dans l'immunité : durant le criblage des premières lignées HEM, nous avons remarqué une grande diversité de morphologie des plantes, et de telles mutations peuvent influencer la multiplication des bactéries. À ce stade ce ne sont que des spéculations, mais certains mutants très petits par rapport à Col-0, ou avec des feuilles recourbées vers la face inférieure, pourraient conserver plus d'humidité que les autres en capturant les gouttes de guttation (et d'inoculum), ce qui favoriserait la croissance de *Xcc*.

De plus, le crible effectué par nos partenaires à l'IJPB sur le nombre d'hydathodes permettra d'identifier des gènes candidats impliqués dans la formation (directe ou indirecte) des hydathodes. En théorie nous devrions aussi retrouver *CUC2* parmi ces candidats. On peut s'attendre à ce qu'il s'agisse d'allèles faibles, car dans la collection HEM aucune lignée ne possède qu'un seul hydathode.

Au final, le séquençage de toutes les lignées HEM nous permettra de constituer une base de données, qui sera utilisable par l'ensemble de la communauté scientifique. Toutes les études de génétique classique et inverse qui utilisent ces lignées pourront disposer de cette base de données pour identifier les gènes responsables de phénotypes observés ou pour repérer les lignées possédant un gène d'intérêt muté.

Etudier l'impact de l'humidité sur le comportement infectieux de *Xcc*.

Pour aller plus loin sur l'étude de l'importance de l'humidité sur le comportement infectieux de *Xcc*, la première étape sera de valider les résultats obtenus avec les mutants *cuc2*-

l et *drn-drn11* par complémentation. De plus, les expériences effectuées sur chou-fleur et les mutants stomates (**Chapitre 3 parties 3.4. et 3.5**) seront poursuivies. De même, pour poursuivre sur le sujet de l'infection de *Xcc* par les stomates et pour savoir si ce comportement est limité par la disponibilité de l'eau dans le mésophylle, il sera intéressant de faire un croisement entre *cuc2-1* et *focl1-1* ainsi que *cuc2-1* et *ost2*. Cela permettra d'évaluer l'entrée de *Xcc* par les stomates en présence de lésions aqueuses, tout en s'affranchissant du scellage manuel des hydathodes à la graisse de silicone.

Différentes études (**Chapitre 1 Partie 3**) démontrent l'importance des effecteurs pour créer un environnement aqueux propice à la multiplication des bactéries. Notamment, les effecteurs HopM1 et AvrE suffisent à *Pst* DC3000 pour produire des lésions aqueuses et être virulent (Xin et al., 2016). Dans le pathosystème *Xcc*/Brassica, l'accès à l'eau n'est pas limitant au début de l'infection dans les hydathodes, ni dans le système vasculaire. Mais est-ce le cas dans les étapes avancées de l'infection, lorsque *Xcc* se multiplie dans le mésophylle ? Est-ce que certains effecteurs sont nécessaires à l'infection par les hydathodes ? Ou au contraire, y a-t-il des effecteurs (que ne possède pas *Xcc* 8004) qui peuvent changer le comportement infectieux de *Xcc*, notamment en lui permettant d'accéder à l'eau dans l'apoplaste pour se multiplier lors d'une entrée par les stomates et infecter le mésophylle ? Pour répondre à cette question, les effecteurs de *X. campestris* pv. *raphani* (*Xcr*), un agent pathogène du mésophylle de certaines Brassicacées (McCulloch, 1929; White, 1930; Fargier and Manceau, 2007) seront introduits dans un mutant de *Xcc* 8004 délété de tous ses effecteurs. Nous pourrions alors déterminer quels effecteurs de *Xcr* permettent à *Xcc* de manipuler son accès à l'eau pour devenir un agent pathogène du mésophylle. Nous pourrions aussi faire les mêmes essais avec les effecteurs HopM1 et AvrE de *Pst* (ou leur orthologue chez *Xcc*).

Toutes ces questions et hypothèses reviennent à se demander ce qui fait qu'un agent pathogène infecte préférentiellement les hydathodes et le système vasculaire ou le mésophylle des plantes. En effet, de façon intéressante, dans le genre *Xanthomonas*, des espèces proches d'agents pathogènes qui utilisent les pores des hydathodes pour infecter leurs hôtes ont un mode d'infection très différent. *X. oryzae* pv. *oryzicola* et *X. campestris* pv. *raphani* sont des agents pathogènes du mésophylle : ils ne sont pas capable de faire une infection vasculaire (ou bien cela se fait bien plus lentement que dans le mésophylle, et cela n'a donc pas été détecté), contrairement aux pathovars de la même espèce *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) et *Xcc*, respectivement (Gluck-Thaler et al., 2020). La différence entre ces pathovars aux modes d'infection différents est en partie due à CbsA, une cellobiohydrolase capable de dégrader les

parois des cellules végétales. Cette enzyme contribuerait à la propagation des bactéries dans le xylème, car elle est présente chez les *Xanthomonas* vasculaires et absente chez la majorité des espèces de *Xanthomonas* non-vasculaires (Gluck-Thaler et al., 2020). L'hypothèse avancée est que CbsA permet aux bactéries de dégrader la membrane des ponctuations du xylème et de se déplacer entre les vaisseaux du xylème, ou bien que CbsA apporte des nutriments aux bactéries en dégradant la cellulose en cellobiose. Chez les *Xanthomonas* non vasculaires, CbsA n'est pas nécessaire et a été perdue plusieurs fois au cours de l'évolution (Gluck-Thaler et al., 2020). Il est intéressant de noter que la délétion de CbsA n'est pas le même impact selon l'espèce de *Xanthomonas* concernée. Par exemple, sans CbsA, *Xoo* perd en virulence (Jha et al., 2007), alors que *X. translucens* pv. *translucens* conserve sa virulence, mais provoque en plus des lésions aqueuses typiques d'un pathovar voisin, l'agent pathogène non vasculaire *X. translucens* pv. *undulosa* (Gluck-Thaler et al., 2020). Il semble que même si CbsA fait partie des facteurs permettant aux bactéries de coloniser le xylème, ce n'est pas le seul. Par ailleurs, les *Xanthomonas* non-vasculaires n'ont pas besoin de CbsA pour être virulents : d'autres facteurs de virulence, comme des effecteurs, leur ont permis de s'adapter au mésophylle.

L'adaptation à différentes niches, ici le xylème et le mésophylle, dirige l'évolution des bactéries phytopathogènes. De plus, l'accès à l'eau est un élément central de leur virulence. Certaines sont capables d'accéder physiquement au système vasculaire, d'autres utilisent des effecteurs pour créer un environnement plus humide dans la plante hôte. Au cours de l'évolution, les bactéries ont donc développé différentes stratégies infectieuses liées à leur style de vie. Dans l'équipe, ce travail va ouvrir le champ d'étude de l'importance de l'accès à l'eau dans les interactions plantes-bactéries.

Chapitre 5 : Matériels et méthodes

Tableau 5.1 : Liste des espèces et lignées végétales utilisées durant ces travaux

Espèce	Accession	Désignation	Caractéristiques	Références
<i>Brassica oleracea</i> var <i>botrytis</i> L.	Cultivar Clovis	Clovis	Variété commerciale Hybride F1	http://www.vilmorin.fr/choux-fleurs/clovis-fl
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Col-0	Col-0	Sauvage	LIPME
	Ws	Ws	Sauvage	LIPME
	Ws	<i>pht1;4-1</i>	Mutant d'insertion T-DNA de <i>At2g38940</i>	L. Nussaume, (Misson et al., 2004)
	Oy-0	Oy-0	Sauvage	H. van den Burg, université d'Amsterdam
	Col-0	Lignées HEM	Mutants EMS homozygotes	(Capilla-Perez et al., 2018)
	Ler	Ler	Sauvage	P. Laufs, IJPB
	Col-0	Col-0 IJPB	Sauvage	P. Laufs, IJPB
	Ler	<i>cuc2-1</i>	3 ^e back-cross d'une lignée isolée de la descendance d'un mutant d'insertion de <i>At5g53950</i> x <i>Ler</i> sauvage	P. Laufs, IJPB (Aida et al., 1997)
	Col-0	<i>cuc2-1</i>	5 ^e back-cross de Col-0 sauvage x <i>Ler cuc2-1</i>	P. Laufs, IJPB
	Col-0	<i>cuc2-3</i>	Mutant d'insertion T-DNA de <i>At5g53950</i>	P. Laufs, IJPB (Sessions et al., 2002)
	Col-0	<i>CUC2g-m4</i>	(Laufs et al., 2004)	P. Laufs, IJPB (Nikovics et al., 2006)
	Col-0	<i>drn-drnl1</i>	Croisement des mutants d'insertion T-DNA <i>drn-1</i> (<i>At1g12980</i>) et <i>drnl-1</i> (<i>At1g24590</i>)	P. Laufs, IJPB (Chandler et al., 2007)
	Col-0	<i>ost2-2D</i>	Mutant EMS de <i>At2g18960</i>	N. Leonhardt, CEA (Merlot et al., 2007)
	Col-0	<i>focl1-1</i>	Mutant d'insertion T-DNA de <i>At2g16630</i>	N. Leonhardt, CEA (Hunt et al., 2017)

Tableau 5.2 : Liste des souches de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* utilisées durant ces travaux

Souche	Caractéristiques	Référence interne	Références
8004	Wild-type	AC60	(Daniels et al., 1984)
8004::GUS-GFP	Wild-type, expression constitutive de GUS et GFP, Rif ^R	AC133	(Cerutti et al., 2017)
8004Δ <i>hrcV</i>	Mutant de délétion de <i>hrcV</i> (XC 3013), Rif ^R	LNL1326	(Cerutti et al., 2017)
8004Δ <i>hrcV</i> ::GUS-GFP	Mutant de délétion de <i>hrcV</i> (XC 3013), expression constitutive de GUS et GFP, Rif ^R	AC10	(Cerutti et al., 2017)
8004Δ <i>xopAC</i> ::GUS-GFP	Mutant de délétion de <i>xopAC</i> (XC 1553), expression constitutive de GUS et GFP, Rif ^R	AC8	(Cerutti et al., 2017)

1. Matériel biologique & conditions de culture :

1. 1. Matériel végétal

Les deux espèces végétales que j'ai utilisées pour l'intégralité de mes travaux de thèse sont *Arabidopsis thaliana* et *Brassica oleracea* var. *botrytis*, le chou-fleur.

Brassica oleracea var. *botrytis* cv. Clovis F1. Pour les inoculations, les plantes ont été cultivées quatre semaines en serre conventionnelle (24-28°C le jour, 22-26°C la nuit, photopériode minimale de 14h), puis transférées dans une chambre de culture aux conditions contrôlées (température de 22-23°C, photopériode de 8h, 90 à 110µmol de photons/cm²/s, hygrométrie de 60% le jour et de 100% la nuit) 2-3 jours avant l'inoculation et pour le restant de l'expérience.

Arabidopsis thaliana a été utilisé durant mes travaux de thèse, car c'est une plante modèle et un hôte de *Xcc*, de la même famille phylogénétique que le chou-fleur Clovis. Les plantules sont cultivées quatre semaines en conditions de jours courts dans un phytotron (température de 22°C, photopériode de 8h, 190-200µmol de photons/m²/s, hygrométrie de 75% le jour et de 85 à 100% la nuit), sur des pastilles de fibre de coco compressée "jiffy7®" (44 mm de diamètre). L'ensemble des accessions d'*A. thaliana* utilisées durant ces travaux est décrit dans le **Tableau 5.1**.

1. 2. Souches de bactéries et milieux de culture.

Les souches bactériennes utilisées durant ce projet sont décrites dans le **Tableau 5.2**. Elles sont toutes dérivées de la souche *Xcc* 8004 (Daniels *et al.*,1984), qui est un mutant spontané résistant à la rifampicine de la souche NCPBB No. 1145. La souche a été isolée dans le comté du Sussex au Royaume-Uni en 1958 sur un chou-fleur. Toutes les souches de *Xcc* sont cultivées dans du MOKA liquide ou solide (extrait de levures 4g/L, casaminoacides 8g/L, K₂HPO₄ 2g/L, MgSO₄.7H₂O 0,3 g/L + 1,5% (w/v) d'agar pour un milieu solide) à 28°C. Les milieux sont sélectifs grâce à l'ajout de l'antibiotique rifampicine (50µg/mL) et de l'antifongique pimaricine (30mg/mL).

2. Méthodes d'inoculation et de phénotypage

2. 1. Inoculations par trempage et infiltration

Le soir avant l'inoculation, les plantes sont arrosées et couvertes pour obtenir une hygrométrie de 100% et favoriser un cycle de guttation durant la nuit. Les cultures qui ont

poussé durant la nuit sont lavées et leur concentration est ajustée à 10^8 CFU/mL ($DO_{600nm} = 0,1$) dans du $MgCl_2$ 1mM. Un surfactant est ajouté pour mouiller les feuilles. Avec *A. thaliana*, les plantes entières sont trempées 20 secondes dans la suspension de bactéries contenant du Silwett L-77 à 0,01%. Pour Clovis, la deuxième vraie feuille (deuxième après les deux cotylédons) est trempée dans la suspension contenant 0,5% de Tween® 80 (P1754 Sigma-Aldrich). Les plants de Clovis sont placés dans des mini-serres et les bacs d'*A. thaliana* sont couverts d'un film plastique transparent, pour que l'humidité relative soit de 100%. L'humidité est maintenue durant 1,5 jours. La sévérité de la maladie est évaluée par la notation des symptômes (**Figure 3.4**). Le taux d'infection des hydathodes est estimé par coloration GUS (**Section 2.4**). La multiplication *in planta* des bactéries est mesurée par dénombrement (voir **2.5 Protocole de criblage des lignées HEM**).

Pour effectuer des infiltrations, la suspension bactérienne est ajustée à 10^6 CFU/mL ($DO_{600nm} = 0,001$) dans du $MgCl_2$ 1mM et aucun détergeant n'est ajouté. La suspension est injectée dans la face inférieure des feuilles d'*A. thaliana* avec une seringue sans aiguille. Après 72h, les populations bactériennes sont dénombrées comme il est décrit dans la **section 2.5.3**. La seule différence avec ce protocole est que les populations bactériennes sont dénombrées dans chaque feuille inoculée séparément. Les feuilles sont donc récoltées, essuyées et pesées. Elles sont ensuite placées dans une plaque 96 puis de 1,2 mL avec 2-3 billes en verre et 400 μ L de $MgCl_2$ 1mM. Le broyage s'effectue à 30Hz, durant 3 x 1 min (broyeur à billes Retsch MM400).

2. 3. Scellage des hydathodes

Le scellage des hydathodes est effectué le soir avant l'inoculation par aspersion pour *A. thaliana* ou par trempage pour Clovis. De la graisse de silicone est appliquée une seule fois sur la bordure de quatre feuilles chez *A. thaliana* ou sur la bordure de la 2^e feuille de Clovis, afin de bloquer les hydathodes et empêcher la guttation.

2. 4. Coloration GUS

Pour observer l'entrée et la progression de *Xcc* 8004::*GUS-GFP* dans *A. thaliana*, quatre feuilles sont marquées en amont de l'inoculation. Elles sont ensuite récoltées et mises dans un tampon GUS (50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.2, 1 mM X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide), 0.2% Triton X-100 [v/v], 2 mM potassium ferricyanide [K_3FeCN_6], 2 mM potassium ferrocyanide [K_4FeCN_6])) qui est infiltré sous vide dans les tissus. Les échantillons sont incubés à 37°C durant la nuit, puis décolorés dans des bains successifs

d'éthanol 80%. Les échantillons sont scannés (NanoZoomer HT slide scanner, Hamamatsu Photonics) et observés après montage entre lame et lamelle dans du Mowiol® (1:1 eau).

2. 5. Protocole de criblage des lignées HEM

2. 5. 1. Culture et préparation des plantes

Les graines d'*A. thaliana* sont semées dans des plateaux (400 x 600 x 78mm) contenant 104 pastilles jiffy7, arrosées avec 4,5 L d'eau et 4 g de Vectobac (larvicide). Dans nos conditions, il faut saupoudrer les semis de terreau et le vaporiser d'eau, afin de limiter la propagation d'algues et de champignons. Après 4 semaines en phytotron, les plantes sont acclimatées 2 à 3 jours dans la chambre de culture.

Le soir avant l'inoculation, les plantes sont arrosées et les plateaux couverts d'un film plastique transparent pour obtenir une hygrométrie de 100% et produire un cycle de guttation durant la nuit.

2. 5. 2. Inoculation par aspersion

Les cultures de *Xcc* qui se sont multipliées durant la nuit sont lavées et leur concentration est ajustée à 10^7 CFU/mL ($DO_{600nm} = 0,01$) dans du $MgCl_2$ 1mM + 0,01% Silwett L-77 (100mL pour 104 plantes). La concentration est vérifiée par étalement de l'inoculum sur une boîte MOKA-rifampicine-pimaricine. Les suspensions bactériennes sont vaporisées sur les plantes à l'aide d'un flacon muni d'un pulvérisateur, jusqu'à ce que les gouttes d'inoculum qui se forment sur les feuilles ruissèlent. Les plantes sont à ensuite maintenues à 100% d'hygrométrie pendant un jour et demi pour un nouveau cycle de guttation, puis le film plastique est fendu pour que les plantes soient dans les conditions habituelles de la chambre de culture pour le reste de l'expérience.

2. 5. 3. Croissance *in planta* de *Xcc*

Pour mesurer la croissance de *Xcc in planta* 8 jours après infection, chaque plante est récoltée en la coupant sous la rosette. Les plantes sont essuyées et nettoyées sur du papier essuie-tout, pour enlever l'humidité et le terreau. Ensuite, les plantes sont pesées, puis placées dans des tubes de 15 mL contenant 3mL de $MgCl_2$ 1mM, 2 billes de céramique (6,35 mm, MP Biomedicals™, SKU:116540424-CF) et une cuillère de 25 g de sable de Fontainebleau. Le broyage s'effectue au FastPrep 96 durant 2 minutes à 1600 rpm ou au FastPrep Homogénéiseur (30s à 6m/s). Après des cascades de dilution dans de l'eau stérile, 3 x 5 μ L sont déposés sur des boîtes de pétri MOKA-rifampicine-pimaricine. Les boîtes de milieu sont au préalable séchées sous hotte durant 35 à 45 min. Après dépôt des gouttes, il faut attendre qu'elles sèchent. Ensuite

les boîtes peuvent être incubées 48h à 28°C. Avec un inoculum à 10^7 CFU/mL et 8 jours après inoculation, les bactéries extraites des accessions Col-0 et Oy-0 forment des colonies dénombrables dans les dilutions 10^{-4} à 10^{-5} . La moyenne du nombre de colonies sur trois dépôts rapportée aux dilutions et au poids des plantes permet d'estimer la multiplication des bactéries par gramme de matière fraîche.

2. 5. 4. Test statistique

Pour savoir si chaque lignée est différente des plantes sauvages en terme de nombre de bactéries quantifiées *in planta*, nous avons appliqué à chaque triplicat de lignées transgéniques et aux plantes sauvages correspondantes le modèle décrit dans Zhu et al. (2021). Dans ce modèle, le nombre de CFU/g (poids frais) = μ + bloc + génotype + bloc \times génotype + ε , où « μ » est la moyenne générale des données, « bloc » explique les différences entre les blocs expérimentaux, « génotype » correspond aux différences entre les lignées, « bloc \times génotype » explique la variation entre génotype dans chaque bloc, et « ε » est le résidu. Le modèle est implémenté grâce à la fonction `lm()` du logiciel R (Version 3.6.2).

Références

- Agreste** (2021) GRAPH'AGRI 2021: L'agriculture, la forêt, la pêche et les industries agroalimentaires. Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
- Ahuja I, Kissen R, Bones AM** (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* **17**: 73–90
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M** (1997) Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* **9**: 841–857
- 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
- Allègre M, Daire X, Héloir M-C, Trouvelot S, Mercier L, Adrian M, Pugin A** (2007) Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *New Phytol* **173**: 832–840
- Alvarez AM** (2000) Black Rot of Crucifers. *In* AJ Slusarenko, RSS Fraser, LC van Loon, eds, *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 21–52
- An S-Q, Potnis N, Dow M, Vorhölter F-J, He Y-Q, Becker A, Teper D, Li Y, Wang N, Bleris L, et al** (2020) Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews* **44**: 1–32
- Antonovics J, Boots M, Ebert D, Koskella B, Poss M, Sadd BM** (2013) The Origin of Specificity by Means of Natural Selection: Evolved and Nonhost Resistance in Host–Pathogen Interactions. *Evolution* **67**: 1–9
- Asai S, Furzer OJ, Cevik V, Kim DS, Ishaque N, Goritschnig S, Staskawicz BJ, Shirasu K, Jones JDG** (2018) A downy mildew effector evades recognition by polymorphism of expression and subcellular localization. *Nat Commun* **9**: 5192
- Asma M, Koenraad HMS, Politikou A** (2014) Chapter 7: Seed Health Testing Methods. Annexe 7-019b: Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp. disinfested/disinfected seed with grinding. *International Rules for Seed Testing*
- Aung K, Jiang Y, He SY** (2018) The role of water in plant–microbe interactions. *The Plant Journal* **93**: 771–780
- Balint-Kurti P** (2019) The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol Plant Pathol* **20**: 1163–1178
- Bari R, Jones JDG** (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* **69**: 473–488
- Beattie GA** (2011) Water Relations in the Interaction of Foliar Bacterial Pathogens with Plants. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 533–555

- Bednarek P, Piślewska-Bednarek M, Ver Loren van Themaat E, Maddula RK, Svatoš A, Schulze-Lefert P** (2011) Conservation and clade-specific diversification of pathogen-inducible tryptophan and indole glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana* relatives. *New Phytologist* **192**: 713–726
- Belin-Depoux M** (1989) Des hydathodes aux nectaires foliaires chez les plantes tropicales. *Bulletin de la Société Botanique de France Actualités Botaniques* **136**: 151–168
- Bhat NA, Syeed N, Bhat KA, Mir SA** (2010) PATHOGENICITY AND HOST RANGE OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS – INCITANT OF BLACK ROT OF CRUCIFERS. 5
- Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei Y, King J** (2009) Role of lignification in plant defense. *Plant Signal Behav* **4**: 158–159
- 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
- Bilgin DD, Zavala JA, Zhu J, Clough SJ, Ort DR, DeLUCIA EH** (2010) Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, Cell & Environment* **33**: 1597–1613
- Bilsborough GD, Runions A, Barkoulas M, Jenkins HW, Hasson A, Galinha C, Laufs P, Hay A, Prusinkiewicz P, Tsiantis M** (2011) Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 3424–3429
- Blanvillain S, Meyer D, Boulanger A, Lautier M, Guynet C, Denancé N, Vasse J, Lauber E, Arlat M** (2007) Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. *PLOS ONE* **2**: e224
- Bogdanove AJ, Schornack S, Lahaye T** (2010) TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 394–401
- Boller T, Felix G** (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 379–406
- Browne LM, Conn KL, Ayert WA, Tewari JP** (1991) The camalexins: New phytoalexins produced in the leaves of *camelina sativa* (cruciferae). *Tetrahedron* **47**: 3909–3914
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P** (2013) Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 807–838
- Bürkle L, Cedzich A, Döpke C, Stransky H, Okumoto S, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB** (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **34**: 13–26

- Büttner D, Bonas U** (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 107–133
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X** (1997) The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**: 57–63
- Capilla-Perez L, Solier V, Portemer V, Chambon A, Hurel A, Guillebaux A, Vezon D, Cromer L, Grelon M, Mercier R** (2018) The HEM Lines: A New Library of Homozygous Arabidopsis thaliana EMS Mutants and its Potential to Detect Meiotic Phenotypes. *Front Plant Sci* **9**: 1339
- Carlton WM, Braun EJ, Gleason ML** (1998) Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into Tomato Leaves Through Hydathodes. *Phytopathology* **88**: 525–529
- Cartea M, Lema M, Francisco M, Velasco P** (2011) Basic information on vegetables Brassica crops. pp 1–34
- Celetti M, Callow K** (2011) Black Rot Of Crucifer Crops.
- Cerutti A, Jauneau A, Auriac M-C, Lauber E, Martinez Y, Chiarenza S, Leonhardt N, Berthomé R, Noël LD** (2017) Immunity at Cauliflower Hydathodes Controls Systemic Infection by *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *Plant Physiol* **174**: 700–716
- Cerutti A, Jauneau A, Laufs P, Leonhardt N, Schattat M, Berthomé R, Routaboul J-M, Noël LD** (2019) Mangroves in the Leaves: Anatomy, Physiology, and Immunity of Epithelial Hydathodes. *Annu Rev Phytopathol* **57**: 91–116
- Chandler J, Werr W** (2017) DORNROSCHEN, DORNROSCHEN-LIKE, and PUCHI redundantly control floral meristem identity and organ initiation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **68**: 3457–3472
- Chandler JW, Cole M, Flier A, Grewe B, Werr W** (2007) The AP2 transcription factors DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE redundantly control Arabidopsis embryo patterning via interaction with PHAVOLUTA. *Development* **134**: 1653–1662
- Chang M, Chen H, Liu F, Fu ZQ** (2022) PTI and ETI: convergent pathways with diverse elicitors. *Trends in Plant Science* **27**: 113–115
- Chen C-C, Chen Y-R** (2005) Study on laminar hydathodes of *Ficus formosana* (Moraceae) I. Morphology and ultrastructure. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **46**: 11
- Cheng F, Sun R, Hou X, Zheng H, Zhang F, Zhang Y, Liu B, Liang J, Zhuang M, Liu Y, et al** (2016) Subgenome parallel selection is associated with morphotype diversification and convergent crop domestication in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Nat Genet* **48**: 1218–1224
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y** (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes Dev* **20**: 1790–1799

- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ** (2006) Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* **124**: 803–814
- Cipollini D** (2010) Costs and benefits of induced resistance to herbivores and pathogens in plants. *CAB Reviews*. doi: 10.1079/PAVSNR20105005
- Clayton EE** (1924) Investigations of cauliflower diseases on Long Island. New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, N.Y.
- Cohn M, Bart RS, Shybut M, Dahlbeck D, Gomez M, Morbitzer R, Hou B-H, Frommer WB, Lahaye T, Staskawicz BJ** (2014) Xanthomonas axonopodis virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Mol Plant Microbe Interact* **27**: 1186–1198
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman M-A, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, et al** (2006) Priming: Getting Ready for Battle. *MPMI* **19**: 1062–1071
- Cosio C, Ranocha P, Francoz E, Burlat V, Zheng Y, Perry SE, Ripoll J-J, Yanofsky M, Dunand C** (2017) The class III peroxidase PRX17 is a direct target of the MADS-box transcription factor AGAMOUS-LIKE15 (AGL15) and participates in lignified tissue formation. *New Phytologist* **213**: 250–263
- Couto D, Zipfel C** (2016) Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat Rev Immunol* **16**: 537–552
- Cox KL, Meng F, Wilkins KE, Li F, Wang P, Booher NJ, Carpenter SCD, Chen L-Q, Zheng H, Gao X, et al** (2017) TAL effector driven induction of a SWEET gene confers susceptibility to bacterial blight of cotton. *Nat Commun* **8**: 15588
- Daniels MJ, Barber CE, Turner PC, Sawczyc MK, Byrde RJW, Fielding AH** (1984) Cloning of genes involved in pathogenicity of Xanthomonas campestris pv. campestris using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J* **3**: 3323–3328
- Darvill AG, Albersheim P** (1984) Phytoalexins and their Elicitors-A Defense Against Microbial Infection in Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **35**: 243–275
- Daudi A, Cheng Z, O'Brien JA, Mammarella N, Khan S, Ausubel FM, Bolwell GP** (2012) The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a major component of pattern-triggered immunity. *Plant Cell* **24**: 275–287
- de Bary** (1877) Handbuch der physiologischen botanik; Comparative anatomy of the phanerogams and ferns.
- DeFalco TA, Zipfel C** (2021) Molecular mechanisms of early plant pattern-triggered immune signaling. *Molecular Cell* **81**: 3449–3467

- Dixon GR** (2006) Origins and diversity of Brassica and its relatives. *In* GR Dixon, ed, Vegetable brassicas and related crucifers. CABI, Wallingford, pp 1–33
- Dodds PN, Rathjen JP** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539–548
- Dow M, Newman M-A, von Roepenack E** (2000) The Induction and Modulation of Plant Defense Responses by Bacterial Lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol* **38**: 241–261
- Du Fall LA, Solomon PS** (2011) Role of Cereal Secondary Metabolites Involved in Mediating the Outcome of Plant-Pathogen Interactions. *Metabolites* **1**: 64–78
- Dutton C, Hōrak H, Hepworth C, Mitchell A, Ton J, Hunt L, Gray JE** (2019) Bacterial infection systemically suppresses stomatal density. *Plant Cell Environ* **42**: 2411–2421
- Fahn A** (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* **108**: 229–257
- FAOSTAT** (2020) FAOSTAT données “ Production : cultures et produits animaux.” <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/QCL/visualize>
- Fargier E, Manceau C** (2007) Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* **56**: 805–818
- Feild TS, Sage TL, Czerniak C, Iles WJD** (2005) Hydathodal leaf teeth of *Chloranthus japonicus* (Chloranthaceae) prevent guttation-induced flooding of the mesophyll. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1179–1190
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* **18**: 265–276
- Feng F, Yang F, Rong W, Wu X, Zhang J, Chen S, He C, Zhou J-M** (2012) A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* **485**: 114–118
- Flor H** (1955) Host-parasite interaction in flax rust - Its genetics and other implications. *Phytopathology* **45**: 680–685
- FranceAgriMer, ed** (2018) Les chiffres-clés de la filière Fruits & Légumes frais et transformés.
- Franceschi VR, Nakata PA** (2005) CALCIUM OXALATE IN PLANTS: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 41–71
- Fukui R, Fukui H, McElhaney R, Nelson SC, Alvarez AM** (1996a) Relationship between Symptom Development and Actual Sites of Infection in Leaves of *Anthurium* Inoculated with a Bioluminescent Strain of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. *Applied and environmental microbiology* **62**: 1021–1028
- Fukui R, Fukui H, McElhaney R, Nelson SC, Alvarez AM** (1996b) Relationship between Symptom Development and Actual Sites of Infection in Leaves of *Anthurium*

- Inoculated with a Bioluminescent Strain of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. *Applied and environmental microbiology* **62**: 1021–1028
- Gao Q-M, Zhu S, Kachroo P, Kachroo A** (2015) Signal regulators of systemic acquired resistance. *Front Plant Sci* **6**: 228
- Garman H** (1892) A Bacterial Disease of Cabbage.
- Gay PA, Tuzun S** (2000) Involvement of a novel peroxidase isozyme and lignification in hydathodes in resistance to black rot disease in cabbage. **78**: 6
- Gazdik F, Magnus S, Roberts SJ, Baranski R, Cechova J, Pokluda R, Eichmeier A, Grzebelus D, Baranek M** (2021) Persistence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Field Soil in Central Europe. *Microorganisms* **9**: 591
- Glazebrook J** (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205–227
- Glowa D, Comelli P, Chandler JW, Werr W** (2021) Clonal sector analysis and cell ablation confirm a function for DORNROESCHEN-LIKE in founder cells and the vasculature in *Arabidopsis*. *Planta* **253**: 27
- Gluck-Thaler E, Cerutti A, Perez-Quintero AL, Butchacas J, Roman-Reyna V, Madhavan VN, Shantharaj D, Merfa MV, Pesce C, Jauneau A, et al** (2020) Repeated gain and loss of a single gene modulates the evolution of vascular plant pathogen lifestyles. *Science Advances* **6**: eabc4516
- Goatley JL, Lewis RW** (1966) Composition of guttation fluid from rye, wheat, and barley seedlings. *Plant physiology* **41**: 373–375
- Goel AK, Lundberg D, Torres MA, Matthews R, Akimoto-Tomiyama C, Farmer L, Dangl JL, Grant SR** (2008) The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 361–370
- Goodman RN, Novacky AJ** (1994) The hypersensitive reaction in plants to pathogens. American Phytopathological Society, Saint Paul
- Grimmer MK, John Foulkes M, Paveley ND** (2012) Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. *Journal of Experimental Botany* **63**: 4321–4331
- Grunwald I, Rupprecht I, Schuster G, Kloppstech K** (2003) Identification of guttation fluid proteins: the presence of pathogenesis-related proteins in non-infected barley plants. *Physiologia Plantarum* **119**: 192–202
- Gu G, Cevallos-Cevallos JM, van Bruggen AHC** (2013) Ingress of *Salmonella enterica* Typhimurium into Tomato Leaves through Hydathodes. *PLoS ONE* **8**: e53470
- Gudesblat GE, Torres PS, Vojnov AA** (2009) *Xanthomonas campestris* Overcomes *Arabidopsis* Stomatal Innate Immunity through a DSF Cell-to-Cell Signal-Regulated Virulence Factor. *Plant Physiol* **149**: 1017–1027

- Guy E, Lautier M, Chabannes M, Roux B, Lauber E, Arlat M, Noël LD** (2013) xopAC-triggered Immunity against *Xanthomonas* Depends on Arabidopsis Receptor-Like Cytoplasmic Kinase Genes PBL2 and RIPK. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0073469
- Haberlandt G** (1895) Anatomisch-physiologische Untersuchungen über das tropische Laubblatt II. über wassersezernierende und -absorbierende Organe. *Math.-naturw. Klasse, Bd. CIV., Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften in Wien CIV*:
- Ham JH, Majerczak DR, Arroyo-Rodriguez AS, Mackey DM, Coplin DL** (2006) WtsE, an AvrE-family effector protein from *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, causes disease-associated cell death in corn and requires a chaperone protein for stability. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1092–1102
- Han G-Z** (2019) Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytologist* **222**: 70–83
- Hanley ME, Lamont BB, Fairbanks MM, Rafferty CM** (2007) Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **8**: 157–178
- Hasson A, Plessis A, Blein T, Adroher B, Grigg S, Tsiantis M, Boudaoud A, Damerval C, Laufs P** (2011) Evolution and Diverse Roles of the *CUP-SHAPED COTYLEDON* Genes in *Arabidopsis* Leaf Development. *The Plant Cell* **23**: 54–68
- Hu Y, Ding Y, Cai B, Qin X, Wu J, Yuan M, Wan S, Zhao Y, Xin X-F** (2022) Bacterial effectors manipulate plant abscisic acid signaling for creation of an aqueous apoplast. *Cell Host & Microbe*. doi: 10.1016/j.chom.2022.02.002
- Hugouvieux V, Barber CE, Daniels MJ** (1998) Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into Hydathodes of *Arabidopsis thaliana* Leaves: A System for Studying Early Infection Events in Bacterial Pathogenesis. *MPMI* **11**: 537–543
- van Hulten M, Chatterjee S, van den Burg HA** (2019) Infection Assay for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Arabidopsis thaliana* Mimicking Natural Entry via Hydathodes. *In* W Gassmann, ed, *Plant Innate Immunity: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY, pp 159–185
- Hunt L, Amsbury S, Baillie A, Movahedi M, Mitchell A, Afsharinafar M, Swarup K, Denyer T, Hobbs JK, Swarup R, et al** (2017) Formation of the Stomatal Outer Cuticular Ledge Requires a Guard Cell Wall Proline-Rich Protein. *Plant Physiology* **174**: 689–699
- 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
- Jauneau A, Cerutti A, Auriac M-C, Noël LD** (2020) Anatomy of leaf apical hydathodes in four monocotyledon plants of economic and academic relevance. *PLoS ONE* **15**: e0232566

- Jha G, Rajeshwari R, Sonti RV** (2007) Functional Interplay Between Two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Secretion Systems in Modulating Virulence on Rice. *MPMI* **20**: 31–40
- Jiang H, Song W, Li A, Yang X, Sun D** (2011) Identification of genes differentially expressed in cauliflower associated with resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Biol Rep* **38**: 621–629
- Johnson J** (1937) RELATION OF WATER-SOAKED TISSUES TO INFECTION BY BACTERIUM *ANGULATUM* AND BACT. *TABACUM* AND OTHER ORGANISMS '. *Journal of Agricultural Research* **55**: 599–618
- Jones JDG, Dangl JL** (2006a) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Jones JDG, Dangl JL** (2006b) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Kadota Y, Sklenar J, Derbyshire P, Stransfeld L, Asai S, Ntoukakis V, Jones JD, Shirasu K, Menke F, Jones A, et al** (2014) Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity. *Molecular Cell* **54**: 43–55
- Kauffman HE, Reddy APK, Hsieh SPY, Merca SD** (1973) Improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant disease reporter* **53**: 537–541
- Kazan K, Manners JM** (2009) Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **14**: 373–382
- Kirch T, Simon R, Grünwald M, Werr W** (2003) The DORNROSCHE/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 Gene of *Arabidopsis* Acts in the Control of Meristem Cell Fate and Lateral Organ Development. *Plant Cell* **15**: 694–705
- Kliebenstein DJ, Rowe HC, Denby KJ** (2005) Secondary metabolites influence *Arabidopsis*/Botrytis interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *The Plant Journal* **44**: 25–36
- Kocks CG, Ruissen MA, Zadoks JC, Duijkers MG** (1998) Survival and Extinction of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Soil. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 911–923
- Kondo Y, Tamaki T, Fukuda H** (2014) Regulation of xylem cell fate. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2014.00315
- Krauthausen H-J, Laun N, Wohanka W** (2011) Methods to reduce the spread of the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, in brassica transplants. *J Plant Dis Prot* **118**: 7–16
- Kunkel BN, Harper CP** (2018) The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. *J Exp Bot* **69**: 245–254
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G** (2004) The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in *Arabidopsis* Plants. *The Plant Cell* **16**: 3496–3507

- Labandeira CC, Prevec R** (2014) Plant paleopathology and the roles of pathogens and insects. *International Journal of Paleopathology* **4**: 1–16
- Lagarde D, Basset M, Lepetit M, Conejero G, Gaymard F, Astruc S, Grignon C** (1996) Tissue-specific expression of Arabidopsis AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *Plant J* **9**: 195–203
- Laufs P, Peaucelle A, Morin H, Traas J** (2004) MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* **131**: 4311–4322
- Lee S, Choi H, Suh S, Doo I-S, Oh K-Y, Jeong Choi E, Schroeder Taylor AT, Low PS, Lee Y** (1999) Oligogalacturonic Acid and Chitosan Reduce Stomatal Aperture by Inducing the Evolution of Reactive Oxygen Species from Guard Cells of Tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol* **121**: 147–152
- Lepeschkin WW** (1923) Über aktive und passive Wasserdrüsen und Wasserspalten. *Plant Biol* **41**: 298–300
- Lersten NR, Curtis JD** (1985) Distribution and Anatomy of Hydathodes in Asteraceae. *Botanical Gazette* **146**: 106–114
- Li L, Li M, Yu L, Zhou Z, Liang X, Liu Z, Cai G, Gao L, Zhang X, Wang Y, et al** (2014) The FLS2-Associated Kinase BIK1 Directly Phosphorylates the NADPH Oxidase RbohD to Control Plant Immunity. *Cell Host & Microbe* **15**: 329–338
- Li P, Zhang L, Mo X, Ji H, Bian H, Hu Y, Majid T, Long J, Pang H, Tao Y, et al** (2019) Rice aquaporin PIP1;3 and harpin Hpa1 of bacterial blight pathogen cooperate in a type III effector translocation. *J Exp Bot* **70**: 3057–3073
- Lionetti V, Cervone F, Bellincampi D** (2012) Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *J Plant Physiol* **169**: 1623–1630
- Liu Y, Huang X, Li M, He P, Zhang Y** (2016) Loss-of-function of Arabidopsis receptor-like kinase BIR1 activates cell death and defense responses mediated by BAK1 and SOBIR1. *New Phytologist* **212**: 637–645
- Loix C, Huybrechts M, Vangronsveld J, Gielen M, Keunen E, Cuypers A** (2017) Reciprocal Interactions between Cadmium-Induced Cell Wall Responses and Oxidative Stress in Plants. *Frontiers in Plant Science* **8**:
- Lu D, Wu S, Gao X, Zhang Y, Shan L, He P** (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 496–501
- Lu Y, Tsuda K** (2021) Intimate Association of PRR- and NLR-Mediated Signaling in Plant Immunity. *MPMI* **34**: 3–14
- Luneau JS, Baudin M, Quiroz-Monnens T, Carrère S, Bouchez O, Jardinaud M-F, Gris C, François J, Ray J, Torralba B, et al** (2022a) Genome-wide identification of fitness

determinants in the *Xanthomonas campestris* bacterial pathogen during early stages of plant infection. 2022.02.07.479439

- Luneau JS, Cerutti A, Roux B, Carrère S, Jardinaud M-F, Gaillac A, Gris C, Lauber E, Berthomé R, Arlat M, et al** (2022b) *Xanthomonas* transcriptome inside cauliflower hydathodes reveals bacterial virulence strategies and physiological adaptations at early infection stages. *Molecular Plant Pathology* **23**: 159–174
- Lutzoni F, Nowak MD, Alfaro ME, Reeb V, Miadlikowska J, Krug M, Arnold AE, Lewis LA, Swofford DL, Hibbett D, et al** (2018) Contemporaneous radiations of fungi and plants linked to symbiosis. *Nat Commun* **9**: 5451
- Lv H, Fang Z, Yang L, Zhang Y, Wang Y** (2020) An update on the arsenal: mining resistance genes for disease management of Brassica crops in the genomic era. *Hortic Res* **7**: 1–18
- Macho AP, Zipfel C** (2014) Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell* **54**: 263–272
- Malinovsky FG, Fangel JU, Willats WGT** (2014) The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science* **5**:
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, et al** (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**: 614–629
- Massey FP, Hartley SE** (2009) Physical defences wear you down: progressive and irreversible impacts of silica on insect herbivores. *J Anim Ecol* **78**: 281–291
- Massomo SMS, Mabagala RB, Swai IS, Hockenhull J, Mortensen CN** (2004) Evaluation of varietal resistance in cabbage against the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Tanzania. *Crop Protection* **23**: 315–325
- McCann HC** (2020) Skirmish or war: the emergence of agricultural plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* **56**: 147–152
- McCulloch L** (1929) A bacterial leaf spot of horseradish caused by *Bacterium campestris* var. *armoraciae*, n. var. *Journal of Agricultural Research* **38**: 269–287
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY** (2006) Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* **126**: 969–980
- Merlot S, Leonhardt N, Fenzi F, Valon C, Costa M, Piette L, Vavasseur A, Genty B, Boivin K, Müller A, et al** (2007) Constitutive activation of a plasma membrane H⁺-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *EMBO J* **26**: 3216–3226
- Meyer D, Lauber E, Roby D, Arlat M, Kroj T** (2005) Optimization of pathogenicity assays to study the *Arabidopsis thaliana*–*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathosystem. *Molecular Plant Pathology* **6**: 327–333
- Miedes E, Vanholme R, Boerjan W, Molina A** (2014) The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front Plant Sci* **5**: 358

- Miles WG, Dains RH, Rue JW** (1977) Presymptomatic Egress of *Xanthomonas pruni* from Infected Peach Leaves. *Phytopathology* **77**: 895–897
- Miller S, Rowe R, Ridel R** (1996) Bacterial spot, speck, and canker of tomatoes. Ohio State University Extension Fact Sheet HYG-3120- 96
- Mino Y, Matsushita Y, Sakai R** (1987) Effect of Coronatine on Stomatal Opening in Leaves of Broadbean and Italian Ryegrass. *Ann Phytopath Soc Japan* **53**: 53–55
- Misson J, Thibaud M-C, Bechtold N, Raghothama K, Nussaume L** (2004) Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht1;4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Molecular Biology* **55**: 727–741
- Mitchell C, Brennan RM, Graham J, Karley AJ** (2016) Plant Defense against Herbivorous Pests: Exploiting Resistance and Tolerance Traits for Sustainable Crop Protection. *Frontiers in Plant Science* **7**:
- Mizuno N, Takahashi A, Wagatsuma T, Mizuno T, Obata H** (2002) Chemical composition of guttation fluid and leaves of *Petasites japonicus* v. *giganteus* and *Polygonum cuspidatum* growing on ultramafic soil. *Soil Science and Plant Nutrition* **48**: 451–453
- Monier J-M, Lindow SE** (2003) Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15977–15982
- Monteiro F, Nishimura MT** (2018) Structural, Functional, and Genomic Diversity of Plant NLR Proteins: An Evolved Resource for Rational Engineering of Plant Immunity. *Annual Review of Phytopathology* **56**: 243–267
- Mott KA, Takemoto JY** (1989) Syringomycin, a Bacterial Phytotoxin, Closes Stomata 1. *Plant Physiol* **90**: 1435–1439
- Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW** (2002) Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **31**: 341–353
- Müller KO, Börger H** (1940) Experimentelle Untersuchungen über die Phythophthora-Resistenz der Kartoffel. Zugleich ein Beitrag zum Problem der ‘erworbenen Resistenz’ im Pflanzenreich. *Arbeiten der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft*. pp 189–231
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E** (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* **59**: 501–520
- Nagai M, Ohnishi M, Uehara T, Yamagami M, Miura E, Kamakura M, Kitamura A, Sakaguchi S-I, Sakamoto W, Shimmen T, et al** (2013) Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to tissue ion levels along primary leaves of barley. *Plant Cell Environ* **36**: 1826–1837

- Nakata M, Matsumoto N, Tsugeki R, Rikirsch E, Laux T, Okada K** (2012) Roles of the Middle Domain-Specific WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN Genes in Early Development of Leaves in Arabidopsis[W][OA]. *Plant Cell* **24**: 519–535
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG** (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436–439
- Nazoa P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Zhuo D, Glass ADM, Touraine B** (2003) Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in Arabidopsis thaliana: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Mol Biol* **52**: 689–703
- Niemeyer HM** (2009) Hydroxamic Acids Derived from 2-Hydroxy-2 H -1,4-Benzoxazin-3(4 H)-one: Key Defense Chemicals of Cereals. *J Agric Food Chem* **57**: 1677–1696
- Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M, Laufs P** (2006) The Balance between the MIR164A and CUC2 Genes Controls Leaf Margin Serration in Arabidopsis. *The Plant Cell* **18**: 2929–2945
- Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ** (2006) Xanthomonas oryzae pathovars: model pathogens of a model crop. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY* **23**
- Oerke E-C** (2006) Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* **144**: 31–43
- Pagán I, García-Arenal F** (2020) Tolerance of Plants to Pathogens: A Unifying View. *Annual Review of Phytopathology* **58**: 77–96
- Panstruga R, Moscou MJ** (2020) What is the Molecular Basis of Nonhost Resistance? *MPMI* **33**: 1253–1264
- Parkin IA, Koh C, Tang H, Robinson SJ, Kagale S, Clarke WE, Town CD, Nixon J, Krishnakumar V, Bidwell SL, et al** (2014) Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid Brassica oleracea. *Genome Biol* **15**: R77
- Paxton JD** (1981) Phytoalexins — A Working Redefinition. *Journal of Phytopathology* **101**: 106–109
- Pedras MSC, Yaya EE** (2015) Plant Chemical Defenses: Are all Constitutive Antimicrobial Metabolites Phytoanticipins? *Natural Product Communications* **10**: 1934578X1501000142
- Perrin A** (1972) Contribution à l'étude de l'organisation et du fonctionnement des hydathodes: recherches anatomiques, ultrastructurales et physiologiques. Lyon, Département de biologie végétale de l'Université
- Pillitteri LJ, Bogenschutz NL, Torii KU** (2008) The bHLH Protein, MUTE, Controls Differentiation of Stomata and the Hydathode Pore in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **49**: 934–943

- Pillitteri LJ, Dong J** (2013) Stomatal Development in Arabidopsis. Arabidopsis Book. doi: 10.1199/tab.0162
- Pilot G, Gaymard F, Mouline K, Cherel I, Sentenac H** (2003) Regulated expression of Arabidopsis Shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant Mol Biol* **51**: 773–787
- Pilot G, Stransky H, Bushey DF, Pratelli R, Ludewig U, Wingate VPM, Frommer WB** (2004) Overexpression of GLUTAMINE DUMPER1 Leads to Hypersecretion of Glutamine from Hydathodes of Arabidopsis Leaves. *Plant Cell* **16**: 1827–1840
- Popp J, Hantos K** (2011) The impact of crop protection on agricultural production. *Studies in Agricultural Economics* 113:
- 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* 1–5
- Ranf S, Eschen-Lippold L, Fröhlich K, Westphal L, Scheel D, Lee J** (2014) Microbe-associated molecular pattern-induced calcium signaling requires the receptor-like cytoplasmic kinases, PBL1 and BIK1. *BMC Plant Biology* **14**: 374
- Ravi M, Chan SWL** (2010) Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* **464**: 615–618
- Riedlmeier M, Ghirardo A, Wenig M, Knappe C, Koch K, Georgii E, Dey S, Parker JE, Schnitzler J-P, Vlot AC** (2017) Monoterpenes Support Systemic Acquired Resistance within and between Plants. *The Plant Cell* **29**: 1440–1459
- Rios ABM, Menino GC de O, Dalvi VC** (2020) Leaf teeth in eudicots: what can anatomy elucidate? *Botanical Journal of the Linnean Society* **193**: 504–522
- Robeson DJ, Bretschneider KE, Gonella MP** (1989) A hydathode inoculation technique for the simulation of natural black rot infection of cabbage by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Ann Applied Biology* **115**: 455–459
- Roos IMM, Hattingh MJ** (1983) Scanning Electron Microscopy of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on Sweet Cherry Leaves. *Journal of Phytopathology* **108**: 18–25
- Roussin-Léveillé C, Lajeunesse G, St-Amand M, Veerapen VP, Silva-Martins G, Nomura K, Brassard S, Bolaji A, He SY, Moffett P** (2022) Evolutionarily conserved bacterial effectors hijack abscisic acid signaling to induce an aqueous environment in the apoplast. *Cell Host & Microbe*. doi: 10.1016/j.chom.2022.02.006
- Russell HL** (1898) A Bacterial rot of cabbage and allied plants. University of Wisconsin , Agricultural Experiment Station
- Ryan RP, Vorhölter F-J, Potnis N, Jones JB, Van Sluys M-A, Bogdanove AJ, Dow JM** (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nat Rev Microbiol* **9**: 344–355

- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A** (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol* **3**: 430–439
- Schwartz AR, Morbitzer R, Lahaye T, Staskawicz BJ** (2017) TALE-induced bHLH transcription factors that activate a pectate lyase contribute to water soaking in bacterial spot of tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**: E897–E903
- Schwartz H** (2011) Bacterial Diseases of Beans. Colorado State University Extension. Fact Sheet No. 2.913
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC** (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 941–950
- Serrano M, Coluccia F, Torres M, L’Haridon F, Métraux J-P** (2014) The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science* **5**:
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, et al** (2002) A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *The Plant Cell* **14**: 2985–2994
- Shatil-Cohen A, Moshelion M** (2012) Smart pipes: the bundle sheath role as xylem-mesophyll barrier. *Plant Signal Behav* **7**: 1088–1091
- Shibagaki N, Rose A, McDermott JP, Fujiwara T, Hayashi H, Yoneyama T, Davies JP** (2002) Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant J* **29**: 475–486
- Shibuya N, Minami E** (2001) Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**: 223–233
- Shine MB, Xiao X, Kachroo P, Kachroo A** (2019) Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Science* **279**: 81–86
- Singh A, Lim G-H, Kachroo P** (2017) Transport of chemical signals in systemic acquired resistance. *Journal of Integrative Plant Biology* **59**: 336–344
- Singh D, Dhar S, Yadava DK** (2011) Genetic and Pathogenic Variability of Indian Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Causing Black Rot Disease in Crucifers. *Curr Microbiol* **63**: 551
- Smith G** (1900) The Haustoria of the Erysipheæ. *Botanical Gazette* **29**: 153–184
- Spoel SH, Dong X** (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol* **12**: 89–100
- Stakman EC** (1915) Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *Journal of Agricultural Research*. U.S. Government Printing Office, pp 193–199
- Staskawicz BJ** (2001) Genetics of Plant-Pathogen Interactions Specifying Plant Disease Resistance. *Plant Physiol* **125**: 73–76

- Steidle CE, Stam R** (2021) Multi-omics approach highlights differences between RLP classes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* **22**: 557
- Strandberg JO** (1977) Persistence of *Xanthomonas campestris* in agricultural ecosystems in Florida. *Proc Am Phytopathol Soc* **4**: 152
- Stukenbrock EH, McDonald BA** (2008) The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 75–100
- Taurino M, Abelenda JA, Río-Alvarez I, Navarro C, Vicedo B, Farmaki T, Jiménez P, García-Agustín P, López-Solanilla E, Prat S, et al** (2014) Jasmonate-dependent modifications of the pectin matrix during potato development function as a defense mechanism targeted by *Dickeya dadantii* virulence factors. *Plant J* **77**: 418–429
- Taylor JD, Conway J, Roberts SJ, Astley D, Vicente JG** (2002) Sources and Origin of Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica Genomes. *Phytopathology*® **92**: 105–111
- Thomma BP, Eggermont K, Penninckx IA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP, Broekaert WF** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15107–15111
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHAJ** (2011) Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The Plant Cell* **23**: 4–15
- Thulasi Devendrakumar K, Li X, Zhang Y** (2018) MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity. *Cell Mol Life Sci* **75**: 2981–2989
- Tian S, Wang X, Li P, Wang H, Ji H, Xie J, Qiu Q, Shen D, Dong H** (2016) Plant Aquaporin AtPIP1;4 Links Apoplastic H₂O₂ Induction to Disease Immunity Pathways. *Plant Physiol* **171**: 1635–1650
- Tian T, Liu Y, Yan H, You Q, Yi X, Du Z, Xu W, Su Z** (2017) agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res* **45**: W122–W129
- Tian W, Hou C, Ren Z, Wang C, Zhao F, Dahlbeck D, Hu S, Zhang L, Niu Q, Li L, et al** (2019) A calmodulin-gated calcium channel links pathogen patterns to plant immunity. *Nature* **572**: 131–135
- Torii KU** (2021) Stomatal development in the context of epidermal tissues. *Annals of Botany* **128**: 137–148
- Treutter D** (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ Chem Lett* **4**: 147
- Tsuda K, Somssich IE** (2015) Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist* **206**: 932–947

- Tsukaya H, Uchimiya H** (1997) Genetic analyses of the formation of the serrated margin of leaf blades in *Arabidopsis*: combination of a mutational analysis of leaf morphogenesis with the characterization of a specific marker gene expressed in hydathodes and stipules. **256**: 231–238
- Turner NC, Graniti A** (1969) Fusicoccin: a Fungal Toxin that opens Stomata. *Nature* **223**: 1070–1071
- Underwood W** (2012) The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion. *Frontiers in Plant Science* 3:
- Ursache R, Miyashima S, Chen Q, Vatén A, Nakajima K, Carlsbecker A, Zhao Y, Helariutta Y, Dettmer J** (2014) Tryptophan-dependent auxin biosynthesis is required for HD-ZIP III-mediated xylem patterning. *Development* **141**: 1250–1260
- Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT** (1980) Lignification as a Mechanism of Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **18**: 259–288
- Vega-Álvarez C, Francisco M, Soengas P** (2021) Black Rot Disease Decreases Young Brassica oleracea Plants' Biomass but Has No Effect in Adult Plants. *Agronomy* **11**: 569
- Verdoucq L, Maurel C** (2018) Plant Aquaporins. *Advances in Botanical Research*. Elsevier, pp 25–56
- Vicente JG, Holub EB** (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Mol Plant Pathol* **14**: 2–18
- Villeth GRC, Carmo LST, Silva LP, Santos MF, de Oliveira Neto OB, Grossi-de-Sá MF, Ribeiro IS, Dessaune SN, Fragoso RR, Franco OL, et al** (2016) Identification of proteins in susceptible and resistant Brassica oleracea responsive to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* infection. *Journal of Proteomics* **143**: 278–285
- Walker J C** (1923) The hot water treatment of cabbage seed. **13**: 251–253
- Wan J, He M, Hou Q, Zou L, Yang Y, Wei Y, Chen X** (2021) Cell wall associated immunity in plants. *Stress Biology* **1**: 3
- 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 G, Roux B, Feng F, Guy E, Li L, Li N, Zhang X, Lautier M, Jardinaud M-F, Chabannes M, et al** (2015) The Decoy Substrate of a Pathogen Effector and a Pseudokinase Specify Pathogen-Induced Modified-Self Recognition and Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe* **18**: 285–295
- Wang J, Liu X, Zhang A, Ren Y, Wu F, Wang G, Xu Y, Lei C, Zhu S, Pan T, et al** (2019) A cyclic nucleotide-gated channel mediates cytoplasmic calcium elevation and disease resistance in rice. *Cell Res* **29**: 820–831

- Wang W, Xu B, Wang H, Li J, Huang H, Xu L** (2011) YUCCA Genes Are Expressed in Response to Leaf Adaxial-Abaxial Juxtaposition and Are Required for Leaf Margin Development. *Plant Physiology* **157**: 1805–1819
- White** (1930) Bacterial spot of Radish and Turnip. *Phytopathology* **20**:
- Williams PH** (1980) Black Rot: A Continuing. *Plant Dis* **64**: 736
- Xin X-F, Nomura K, Aung K, Velásquez AC, Yao J, Boutrot F, Chang JH, Zipfel C, He SY** (2016) Bacteria establish an aqueous living space in plants crucial for virulence. *Nature* **539**: 524–529
- Xu R-Q, Blanvillain S, Feng J-X, Jiang B-L, Li X-Z, Wei H-Y, Kroj T, Lauber E, Roby D, Chen B, et al** (2008) 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* **190**: 343–355
- Yagi H, Nagano AJ, Kim J, Tamura K, Mochizuki N, Nagatani A, Matsushita T, Shimada T** (2021) Fluorescent protein-based imaging and tissue-specific RNA-seq analysis of *Arabidopsis* hydathodes. *J Exp Bot* **72**: 1260–1270
- Yamanaka S, Ozaki M, Kato S** (1980) Some Observations on Angular Leaf Spot of Cucumber with a Scanning Electron Microscope. *Tohoku J Agric Res* **30**: 135–141
- Yang B, Bogdanove A** (2013) Inoculation and Virulence Assay for Bacterial Blight and Bacterial Leaf Streak of Rice. *In* Y Yang, ed, *Rice Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 249–255
- Yates AD, Allen J, Amode RM, Azov AG, Barba M, Becerra A, Bhai J, Campbell LI, Carbajo Martinez M, Chakiachvili M, et al** (2022) Ensembl Genomes 2022: an expanding genome resource for non-vertebrates. *Nucleic Acids Research* **50**: D996–D1003
- Yeats TH, Rose JKC** (2013) The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiology* **163**: 5–20
- Young JM** (1974) Effect of water on bacterial multiplication in plant tissue. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **17**: 115–119
- Yu A, Lepere G, Jay F, Wang J, Bapaume L, Wang Y, Abraham A-L, Penterman J, Fischer RL, Voinnet O, et al** (2013) Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in *Arabidopsis* antibacterial defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 2389–2394
- Zeyen RJ, Carver TLW, Lyngkjær MF** (2002) Epidermal Cell Papillae. The powdery mildews A comprehensive treatise. The American Phytopathological Society, pp 107–125
- Zhang J, Yin Z, White F** (2015) TAL effectors and the executor R genes. *Front Plant Sci* **6**: 641

- Zhang L, Chen L, Dong H** (2019a) Plant Aquaporins in Infection by and Immunity Against Pathogens – A Critical Review. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2019.00632
- Zhang L, Hu Y, Li P, Wang X, Dong H** (2019b) Silencing of an aquaporin gene diminishes bacterial blight disease in rice. *Australasian Plant Pathol* **48**: 143–158
- Zhang S, Meru G, Pernezny K** (2021) Bacterial Speck of Tomato. *Plant Pathology Department UF/IFAS Extension PP-10 2*
- Zheng Y, Jiao C, Sun H, Rosli HG, Pombo MA, Zhang P, Banf M, Dai X, Martin GB, Giovannoni JJ, et al** (2016) iTAK: A Program for Genome-wide Prediction and Classification of Plant Transcription Factors, Transcriptional Regulators, and Protein Kinases. *Molecular Plant* **9**: 1667–1670
- Zhou L, Zhang L-H, Cámara M, He Y-W** (2017) The DSF Family of Quorum Sensing Signals: Diversity, Biosynthesis, and Turnover. *Trends Microbiol* **25**: 293–303
- Zhu X, Mazard J, Robe E, Pignoly S, Aguilar M, San Clemente H, Lauber E, Berthomé R, Galaud J-P** (2021) The Same against Many: AtCML8, a Ca²⁺ Sensor Acting as a Positive Regulator of Defense Responses against Several Plant Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 10469
- Ziv C, Zhao Z, Gao YG, Xia Y** (2018) Multifunctional Roles of Plant Cuticle During Plant-Pathogen Interactions. *Frontiers in Plant Science* **9**:

ANNEXES

Annexe I. Hydathodes are important organs for auxin metabolism and nutrient recycling

Hydathodes are important organs for auxin metabolism and nutrient recycling.

Jean-Marc Routaboul ^{1*}, Caroline Bellenot ¹, Alexandra Gurowietz ², Gilles Clément ³, Sylvie Citerne ³, Céline Remblière ¹, Nathalie Leonhardt ⁴, Magalie Charvin ⁵, Marie-Françoise Jardinaud¹, Sébastien Carrère¹, Grégory Mouille ³, Patrick Laufs ³, Laurent Nussaume ⁴, Lionel Navarro ⁵, Martin Schattat ^{2*}, Laurent, D. Noël¹

¹ LIPME, Université de Toulouse, INRAE/CNRS, UMR 0441/2598, F-31326 Castanet-Tolosan, France

² Department of Plant Physiology, Institute for Biology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, D-06120 Halle (Saale), Germany

³ Institut Jean-Pierre Bourgin, INRAE/AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-78000 Versailles, France

⁴ Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes, Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille, Aix-Marseille Université and Commissariat à l'Energie Atomique et aux Énergies Alternatives/CNRS, UMR 7265, F-13108 Saint Paul-Les-Durance, France

⁵ Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS), Centre National de la Recherche Scientifique, UMR8197, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1024, 75005 Paris, France.

*Address for correspondence:

Jean-Marc Routaboul jean-marc.routaboul@inrae.fr ORCID:0000-0003-2197-5280

Martin Schattat martin.schattat@pflanzenphys.uni-halle.de ORCID: 0000-0002-1995-1960

Abstract

Hydathodes are small organ located on the leaf margin of all vascular plants. They release excess water through guttation drops derived from the xylem sap. This process is essential when stomata are closed or when humidity is high. To shed new light on the functions of hydathode in plants, we performed a RNA sequencing (RNA-Seq) analysis on *Arabidopsis thaliana* hydathodes compared to mesophyll leaf tissues that highlighted 1460 differentially expressed genes. Gene categories related to auxin metabolism, stress, DNA, plant cell wall, transport, RNA or wax related genes were in average more

expressed in hydathode whereas genes related to glucosinolate synthesis and transport, the sulfation pathway, metal handling or photosynthesis were upregulated in the mesophyll. Increased gene expression of auxin regulator and biosynthetic genes, lower expression of basipetal transport genes and higher expression of vacuolar storage related genes, certainly lead to the higher free auxin accumulation we measured in hydathode. The presence of multiple nitrate, phosphate, wax, peptide, potassium, water, iron, zinc or sulfate transporters suggest that hydathodes may absorb part of the xylem nutrients and water to prevent excessive loss of valuable constituents in guttation, like a human kidney. We showed that in average 78% of the xylem content of 52 metabolites was removed from the guttation fluid at the hydathode level. To confirm this result, we measured the guttation fluid of the *nrt2.1* and *pht1;4 A. thaliana* mutants and showed that both contained more nitrate and mineral phosphate compared to wild-type plants. Our transcriptomic and metabolic analysis defines an organ that is distinct from the rest of the leaf. It also highlights functions that are not solely important for hydathodes but also for the entire plant, such as auxin synthesis or metabolite transport.

Introduction

Plants need to maintain an intense flow of water (sap) channeled from the roots to the substomatal chambers where it evaporates. This stream is essential to maintain cell turgor and to bring water and organic or inorganic solutes to the uppermost parts of shoots. Occasionally, during the night when stomata are closed or when humidity is too high, roots may deliver more water than leaves can evaporate. The flooding of the intercellular spaces is avoided by the release of excess xylem sap drops, called guttation, through leaf margin organs called hydathodes. The scientific efforts to understand hydathode physiology started decades ago with the anatomical description of hydathodes in numerous species (Perrin, 1972; Cerutti *et al.*, 2019). Since, this organ has also been suggested to be an important place for auxin synthesis and signaling. Indeed, numerous auxin metabolism related genes are expressed in hydathodes, including the auxin reporter DIRECT REPEAT5 (DR5), a synthetic promoter construct that acts as a readout for auxin activity (Alvarez *et al.*, 2009; Eklund *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Muller-Moulé *et al.*, 2016;). Several mutants regulating auxin synthesis as well as multiple mutants encoding the biosynthetic genes of the YUCCA family display vascular and serration defects (Aloni *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2009; Eklund *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Baylis *et al.*, 2013; Martinez-Fernandez *et al.*, 2014). The presence of auxin has also been assessed using immunolocalization (Aloni *et al.*, 2033). It is only very recently that two transcriptomic analyses indicated that two biosynthesis regulators, the synthesis gene YUCCA 4 and four auxin signaling genes, were more expressed in hydathodes (Yagi *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021). Many transporter genes are also expressed in the hydathodes of *Arabidopsis*, rice or barley (Mudge *et al.*, 2002; Shibagaki *et al.*, 2002; Pilot *et al.*, 2003; Pilot *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2013; Nazon *et al.*, 2013; Bailey and Leegood, 2016). Amino acids (Pilot *et al.*, 2004; Bailey and Leegood, 2016) or ions such as NO₃⁻, Pi, or K⁺ (Nagai *et al.*, 2013) are generally less concentrated in the guttation fluid than in the xylem sap. This

suggest that, as the mammalian kidney, hydathodes may absorb the remainder of the xylem metabolites that have not been used by the leaf to prevent excessive loss of valuable nutrients into the xylem derived guttation fluid (Perrin, 1972; Pilot *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2013; Bailey and Leegood, 2016). Moreover, hydathodes also appear like an easy access to the inside of leaf and the vascular system for a growing number of vascular pathogens responsible for important plant diseases that limit crop yield (Lewis and Goodman, 1966; Carlton *et al.*, 1998; Hugouvieux *et al.*, 1998; Mullens et Jamann, 2020; Bernal *et al.*, 2021). We recently described some of the strategies that allow one of these pathogens, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to enter hydathodes and access the vascular system to invade host plants such as *Arabidopsis* and cauliflower (Cerutti *et al.*, 2017). Conversely, the accumulation of water in the leaf is a necessary step for infection and can even allow non-host pathogens or non-pathogens to proliferate in the plant. Many pathogens also induce water accumulation during their infectious process either by modifying osmolarity or degrading plant cell walls (see for review Xin *et al.*, 2016; Aung *et al.*, 2018). Hydathodes, by preventing water accumulation in mesophyll, may also protect the plant from pathogen infection.

However, despite the importance of all these hydathode possible functions, only a few modern molecular, physiological and functional analyses have been undertaken on these organs. In this study, we provide a global transcriptomic description of *Arabidopsis* healthy mature hydathode compared to mesophyll, validated and enriched by metabolomic analysis. We show that auxin metabolites accumulate in hydathodes in agreement with the induction of most auxin synthesis and regulation genes and the downregulation of auxin efflux carriers. Two key transporter genes strongly expressed at hydathode level are also shown to prevent excessive loss of nitrate and phosphate through guttation. This study start to describe a once forgotten remarkable organ that still have a lot to show.

Results

Transcriptomic signatures differentiate hydathode from the rest of the leaf.

To shed new light on the function of hydathodes in plants, we performed RNA sequencing (RNA-Seq) on hydathode and mesophyll tissues of 8-10 weeks-old leaves (Figure 1A left panel). The tips of teeth leaf and mesophyll samples were manually collected using a razor blade on four biological replicates. The clustering analysis using Euclidean distance (supplemental figure 1) showed that hydathode and mesophyll samples cluster in separate groups. A FDR of p-value <0.001 was chosen: that resulted in a differentially expressed genes (DEGs) subset whose minimum log₂ fold change (FC) was higher than 0.6 or lower than -0.6. This encompassed 1460 DEGs (610 up-regulated and 850 down-regulated, see supplemental Table S1). We then perform a Mapman analysis to globally classify these DEGs into functional categories and test if some functional categories contained higher numbers of DEG than expected (Thimm *et al.*, 2004). A list of enriched categories is given in supplemental figure 1. To improve this global view of hydathode molecular functions, we also manually annotated some of the

genes according to available references given in supplemental Table 1. Figure 1C displays the number of DE genes in representative categories (that were also enriched in the initial Mapman analysis). The DE genes contained auxin metabolism, stress, DNA, plant cell wall, transport, RNA, lipids. On the other hand, glucosinolate synthesis and transport, the sulfation pathway, metal handling or photosynthesis were upregulated in the mesophyll. These results are in agreement with earlier promoter GUS analysis that showed glucosinolate metabolism gene expression in the vasculature (Schuster *et al.*, 2006; Gigolashvili *et al.*, 2007; Redovnikovic *et al.*, 2012). The hydathode transcriptomic signature appears thus very different from the rest of the leaf and already emphasizes specific hydathode functions that will extend and refine our knowledge and understanding of hydathode physiology.

To validate these data we first used a subset of available GUS promoter lines for the YUCCA auxin biosynthesis gene that were indeed mostly expressed in hydathodes (supplemental figure 1). Although GUS reporter analysis may not be the most specific analysis of gene expression since staining may diffuse, we noted that DR5 was clearly expressed on the top of the hydathode, when the expression on the other lines could also reach the delta shaped vascular system below the hydathode. This very localized DR5 reporter expression reveals places where free auxins are available (Aloni *et al.*, 2003) and could be compared to locations of auxin synthesis described with the TAA1 and YUCCAs promoter GUS reporter line analysis. Conversely, the glutamine vascular transporter GDU4.7 was solely expressed in the vascular system, not including the delta-shaped vascular elements that connect the xylem vessels to the hydathode epithem. This would suggest that hydathode vessels may have a distinct transcriptomic signature. We also constructed additional GUS reporter lines driven by four promoters chosen among the most differentially expressed genes: AT3G16670 (Pollen OLE 1), AT3G05730 (defensin-like), AT1G62510 (lipid transfer protein) and AT1G56710 (Polygalacturonase 1). All four genes were expressed in the upper part of the hydathode (Figure 3). Furthermore, two very recent studies (Yagi *et al.*, 2020 and Kim *et al.*, 2021) released 166 *Arabidopsis* genes more expressed in hydathodes. Out of the 68 and 98 hydathode genes found in these two studies, 68 and 47 respectively were shared with our analysis and 65 and 47 of them were similarly more expressed in hydathode in our study (93 and 100% respectively). The more refined single-cell transcriptome analysis of Kim and collaborators also shows similarities of hydathodes with other cell types such as the guard cell, the epidermis and the vascular subsets (74, 45 and 39% of common genes respectively) that may share common developmental regulatory origin or have interconnected regulatory programs (Pilliteri *et al.*, 2008; Torii *et al.*, 2021). On the other hand, Kim *et al.* mesophyll subset contained only 15% of the DEGs more expressed in hydathodes in our study. These data cumulatively show that our RNA-seq analysis successfully identified genes that are more expressed in hydathodes that may certainly extend our knowledge about hydathode functions.

Hydathodes are a major place for auxin synthesis.

Since some auxin biosynthetic genes and the DR5-auxin reporter have been shown to be expressed in hydathodes based on promoter GUS analysis, it has been proposed that hydathodes are a place of auxin synthesis and signaling (Aloni *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2009; Eklund *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Baylis *et al.*, 2013; Martinez-Fernandez *et al.*, 2014; Muller-Moulé *et al.*, 2016). Multiple mutants of the redundant YUCCA biosynthetic genes have also shown the importance of auxin synthesis for leaf, veins and hydathode development (Cheng, Dai and Zhao, 2006, 2007; Wang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2014). In the two recently released transcriptomic analyses only 9 of them were related to auxin metabolism (i.e. 4 biosynthesis regulators, one synthesis gene YUCCA 4, and 4 signaling genes; Yagi *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021). Auxin was also detected in hydathode using antibodies (Aloni *et al.*, 2003) but direct quantification and auxin metabolite characterization are still lacking. That is to say that our knowledge is still scarce about auxin metabolism in hydathode and its importance for this organ and the entire plant.

Sixty-seven DE genes belong to the auxin metabolism subset, 42 of which were upregulated in hydathodes. Auxin synthesis TAA1, AO1 or 6 YUCCA genes and regulators of auxin synthesis belonging for instance to the NGA, SHI or TCP transcription factor (TF) families showed an average \log_2 Fold Change (FC) ratio of 3.2 and 2.5, respectively (Figure 3A and Supplemental Table 1). Besides synthesis, auxin homeostasis is dependent on many transporters that may increase or decrease auxin accumulation (Barbosa 2018).

On the one hand, efflux carriers and their positive regulators that may limit auxin accumulation such as Pin-formed (PIN) PIN1 and PIN5, LAX2 transporter genes were less expressed in hydathode. PIN1 acts as an efflux carrier protein involved in basipetal auxin transport (Gälweiler *et al.*, 1998). PIN5 drives auxin flow from the cytosol to the lumen of the ER (Mravec *et al.*, 2009). LAX2 is an AUX/LAX family member whose product is expressed in the leaf vascular system and not in leaf margin and is involved in draining cell auxin maxima (Kasprzewska *et al.*, Plant J., 2015). Consistently, Golven secretory peptide 1 and 2 (GLV 1 and 2, Whitford *et al.*, 2012, Ghorbani *et al.*, 2016), or Pinoid-Binding Protein 1 (PBP1, Barbosa *et al.*, 2018; Benjamin *et al.*, 2003) proteins influence PIN gene activity or PIN polarity and their products are less expressed in hydathodes. However, the MADS-box gene (XAANTAL2, XAL2/AGL14, Garay-Arroyo *et al.*, 2013) transcription factor has been shown to regulate PIN1 when PIN1 appears downregulated in our analysis. The complete mechanism likely involves XAL2 and additional MADS-box proteins that form heterodimeric transcriptional activators and repressors.

On the other hand, factors that may favor auxin accumulation such as ATP-binding cassette (ABC) ABCB14 or MACCHI-BOU 4 (MAB4) were upregulated. ABCB14 was associated with local influx diffusion of auxin (Kaneda *et al.*, 2011) and MAB4 negatively controls PIN1 endocytosis and its basipetal polarization (Furutani *et al.*, 2014). Altogether, these gene expressions certainly lead to higher auxin accumulation in hydathodes than in mesophyll through increased auxin synthesis, lower basipetal transport and higher vacuolar storage. To test this hypothesis, we quantified free auxin by mass

spectrometry using a deuterated internal standard (Figure 3B) and found that hydathodes contained 40% more free auxin than the rest of the leaf. Interestingly, we also found a higher expression in hydathodes of two IAA-amido synthetases, GH3, which conjugates excess IAA to amino acids that could thus be stored in the vacuole (Staswick *et al.*, 2005). Similarly, WALLS ARE THIN1 (WAT1) transporter gene located in the tonoplast that brings auxin from the vacuole to the cytoplasm was downregulated in hydathodes (Ranocha *et al.*, 2013).

Hydathode expressed transporters prevent excessive loss of metabolites

Many transporter genes are expressed in the hydathodes of *Arabidopsis*, rice or barley (Mudge *et al.*, 2002; Shibagaki *et al.*, 2002; Pilot *et al.*, 2003; Pilot *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2013; Nazoa *et al.*, 2013; Bailey and Leegood, 2016). Amino acids (Pilot *et al.*, 2004; Bailey and Leegood, 2016) or ions such as NO_3^- , Pi , or K^+ (Nagai *et al.*, 2013) are generally less concentrated in the guttation fluid than in the xylem sap. These observations have led to the hypothesis that hydathodes may absorb the remainder of the xylem nutrients that have not been used by leaf. This could prevent excessive loss of valuable nutrients into the xylem derived guttation fluid like the mammalian kidney (Perrin, 1972; Pilot *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2013; Bailey and Leegood, 2016). However, the metabolite digressive gradient observed from the petiole to the margin may also arise from metabolite uptake at the whole leaf level. Information is also scarce on the content of other essential xylem or guttation fluid metabolites such as sugars or organic acids (Perrin, 1972). We thus manually excised 0.5mm of the leaf margin just before the hydathode on one half of *A. thaliana* Col-0 leaf and harvested the xylem fluid reaching the hydathodes on this half and the guttation fluid on the other half. Finally, we also collected the xylem sap pouring from the petiole on the same leaf. These three fluids were then analyzed by GC-MS. Figure 4A shows that the total metabolite content mostly decreases due to an uptake of nutrients by the leaf (more than 90%). However, 78% of the remaining metabolite content is removed from the guttation fluid at the hydathode level and 22 metabolites were in significantly lower concentration in the guttation fluid compared to xylem sap before hydathode (Figure 4C). Gamma-aminobutyric acid (GABA), Glutamate, Glycine, Serine and Aspartate amino acids are intermediates of nitrogen metabolism, besides having also roles in signaling and defenses. Fumarate from the TCA cycle, Glycine, Serine and Glycerate are also linked to nitrogen assimilation. Valine, Alanine, Leucine derived from Pyruvate that is a precursor of Phenylalanine (phenylpropanoids) and Tryptophane (AIA) (Gaufichon *et al.*, 2012). All of these metabolites are less concentrated in the guttation fluid than in the xylem sap coming from just before hydathodes (Figure 4C). These results are in agreement with the upregulation of genes involved in nitrate assimilation (see supplemental table 1). We thus measured the nitrate content and the ions contents colorimetrically and with ICP-MS respectively. This showed a significant uptake of (Figure 4B and C) nitrogen, phosphorus, calcium and magnesium ions at the hydathode level.

Transcriptome comparison of hydathodes and mesophyll revealed that more than 62 transporter genes are more expressed in hydathodes. Most of them are involved in nitrate uptake such as *NRT1.1* or

NRT2.1 (Table 1 and Figure 7A). These two genes have also been shown to be expressed in hydathodes (Nazo *et al.*, 2003; Krouk *et al.*, 2010). We also observed the hydathode specific expression of the phosphate transporter PHT1;4 that was until now associated with root uptake under Pi starvation (Misson *et al.*, 2004). Calcium is a critical element for organisms, acting as an essential nutrient and an important component in cellular signaling transduction. Putative cation/Ca²⁺ exchanger CCX1 and CCX1 are likely to play similar roles in plant stress tolerance regulating calcium allocation, senescence and ROS (Li *et al.*, 2016; Corso *et al.*, 2018). Aquaporins are membrane channels that facilitate the diffusion of water and small neutral solutes across the cellular membranes of most living organisms (Maurel *et al.*, 2015). Iron and zinc references on metal uptake (Xiao *et al.*, 2020). The upregulation of these genes inside hydathodes may explain the large significant recycling of valuable nutrients such as nitrate, phosphate or calcium at hydathodes. The presence of multiple wax, peptide, potassium, water, iron, zinc or sulfate transporters also confirm that the recycling is massive as observed in figure 4A. However, from the six sulfate transporters (SULTRs) expressed in hydathodes, only two, namely SULTR1;2 and SULTR3;2 were more expressed in hydathodes but at very low levels. This is concomitant with a lower expression of sulfate metabolism genes. To validate the metabolic and transcriptomic analysis, we measured the guttation fluid of the *nrt2.1* and *pht1;4* mutants and showed that both contained less nitrate and mineral phosphate in the guttation fluid compared to WT (Figure 5). Fe deficiency promotes Fe uptake by acidification of the rhizosphere through the plasma membrane H⁺-ATPases like AHA2 (Santi and Schmidt 2009), reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺ by the root cell plasma membrane ferredoxin reductases, such as FRO2 or FRO4, and the incorporation of the metal into the cell by high-affinity transporters. In shoots, Fe accumulates in mesophyll cells thanks to ferritins. They are multimeric proteins capable of storing up to 4500 atoms of Fe in their central cavity (Harrison and Arosio 1996). For example, AtFER3 is expressed in shoots and roots (Ravet *et al.* 2009). The higher expression of nitrate and phosphate transporters may explain the uptake of these metabolites at the hydathode level. However, the comparison between transcriptomic data obtained in daylight harvested plants and guttation fluid resulting from several hours of sampling before the night/day shift needs to be taken with caution. Indeed, the transporters' activity could be modified during the night, unless they are constitutively expressed (Brauner *et al.*, 2018).

Defense related gene expression and proteins: are the hydathodes defended?

Unlike the leaf surface, the inner hydathode cavity of a healthy leaf appears to be a more favorable place where many bacteria and yeast have been detected (Perrin, 1972). Hydathode pores remain mostly open and thus appear as an easy access to the inner leaf and the vascular system for a growing number of vascular pathogens (Lewis and Goodman, 1966; Carlton *et al.*, 1998; Hugouvieux *et al.*, 1998; Cerutti *et al.*, 2019; Mullens et Jamann, 2020). These pathogens still favour entry through hydathode pores even when the stomata are constitutively kept open (Cerutti *et al.*, 2017). This would suggest specific conditions original to hydathodes that makes them susceptible to vascular pathogens and other microbes.

To assess the basal level of protection of the hydathodes we reviewed the transcriptional status of genes involved in static and induced defense mechanisms such as salicylic acid (SA), phenolic compounds, oxylipins and reactive oxygen species (ROS) productions. We first observed that SA metabolism was downregulated in hydathodes, including the biosynthesis-related genes ICS1, ICS2, PBS3 and EDS5 (Garcion *et al.*, 2008; Rekhert *et al.*, 2019; Torrens- Spence *et al.*, 2019) and the DRM6 gene involved in SA homeostasis. Some SA genes regulated during defense are similarly less expressed in this organ: WRKY70, PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS (PR2) and PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4) (Van Wersch *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2021). LOX1 and LOX5 are involved in most of the synthesis of the oxylipin 9(S)-hydroxy-10,12,15-octadecatrienoic acid (Lopez *et al.*, 2011). This oxylipin also induces accumulation of callose, production of reactive oxygen species (ROS), and transcriptional changes for genes involved in plant defense (Yang *et al.*, 2021). Interestingly, LOX1 and LOX5 genes involved in redox metabolism were globally downregulated in hydathodes. Abscisic acid synthesis was also modified since the NCED5 biosynthetic gene and two ABA-responsive genes were upregulated, and the ABA negative regulator RCK1 was downregulated. We quantified ABA, SA, glucosyl SA and JA by GC-MS and found that hydathodes contained more ABA and Glucosyl SA than mesophyll but less SA and JA (Figure 6). Several genes involved in flavonoid and lignin synthesis were all less expressed in hydathodes compared to mesophyll tissues, like the flavonoid activator MYB75, but the dual flavonoid and lignin repressor MYB4 was more expressed (see supplemental figure S4). However, no visual difference in lignin deposition in the secondary cell wall of hydathodes was noticed when lignin was visualized with phloroglucinol. All glucosinolate metabolism-related genes were also more expressed in the mesophyll. Chitinases may be expressed in the absence of pathogens (Samac et Shah, 1991) and five of them were more expressed in hydathodes than mesophyll. Last, among the DEGs with the highest fold change we noted two extension-related genes (AT3G16670 and AT3G16660) and a defensin-like (AT3G05730) coding for small proteins. Altogether, these results would suggest that even if some components of the plant defenses are available inside the hydathodes, such as chitinases, these organs seem to be relatively unprotected.

Discussion

Hydathodes are small organs located on the margin of most vascular plant leaves. If their structure and physiology have been described in many plants since the 19th century (Perrin, 1970; Cerutti *et al.*, 2019), it is only recently that scientific efforts resume studying their roles in a growing number of pathogenic infections (Cerutti *et al.*, 2017, 2019) and their functions at the molecular level. To date, macroscopic RNA-seq and single-cell analyses revealed 162 genes preferentially expressed in hydathodes (Kim *et al.*, 2020 and Yagi *et al.*, 2019). They are related to biotic stress (chitinases), auxin metabolism (YUCCA 4, STYLISH1 and 2), nitrate, phosphate, sulfate, sucrose or peptides transports (NPFs, YSL1, SUC1, SULTR1;2, PUP1), cell wall degradation genes (Polygalacturonase, pectin lyase or PME1). Our study

provides a larger insight into the molecular bases of hydathode physiology and defines an organ that is not only structurally but functionally different from the leaf.

We first confirmed and extended the importance of auxin metabolism in hydathodes: more than 67 genes involved in auxin biosynthesis, regulation, signaling, conjugation and response are upregulated in hydathodes. These genes include many YUCCA genes encoding flavin monooxygenase-like enzymes that catalyze the rate-limiting step in Trp-dependent auxin biosynthesis and TAA1, the first committed steps of auxin synthesis (see Figure 3). In contrast, several auxin-related transporters were down-regulated in hydathodes compared to mesophyll. These observations are in agreement with the hypothesis of a higher accumulation of auxin in hydathodes (Aloni *et al.*, 2003). This is also supported by the overexpression in hydathodes of numerous copies of auxin biosynthesis regulators, belonging to the STYLISH, NGA or TCP families, as well as by the differential expression of many auxins signaling genes belonging to the AUX-IAA, ARF and SAUR (Small Auxin Responsive SAUR) families. Direct measurements confirm that not only auxin but also some auxin conjugates accumulate in the hydathodes. Since auxin seems to play a role during xylem induction, these auxin metabolites may explain the very dense atypical delta shape structure of the xylem irrigating the epithem (Aloni *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2011). The YUCCA family contains 11 members, only six being more expressed in hydathodes and one *YUCCA1* being expressed only at a very low level (0.07 normalized counts). Although a *YUC* single mutant in *Arabidopsis* does not show any obvious phenotype, the mutation of multiple *YUC* genes leads to a diversity of auxin-related phenotypes. When four of these *YUCCA* genes were mutated (quadruple mutant *yuc1yuc2yuc4yuc6*), the mutant plants showed severe auxin-deficient phenotypes with narrow leaves, simple venation (Cheng *et al.*, 2006, 2007) and lacked hydathodes (Wang *et al.*, 2011). The cumulative expression of the four *YUCCA 1-2-4-6* genes only account for 34% of the whole *YUCCA* genes expression in hydathodes. The mutant *yuc 2-5-8-9* would represent 86% of *YUCCA* genes expression (Muller-Moulé *et al.*, 2011) but it has not been fully described so far.

The auxin accumulation observed in hydathodes resembles those described in the lateral root where auxin maxima promote lateral root growth in mild N deprivation as part of a foraging mechanism. The nitrate transporter NRT1.1 functions as a dual-affinity transporter and a nitrate sensor. It responds to variations in nitrate concentration, switching between phosphorylated and dephosphorylated forms (Liu *et al.*, 1999; Liu and Tsay, 2003; Ho *et al.*, 2009; Léran *et al.*, 2014). To regulate lateral root growth, NRT1.1 also transports auxin basipetally via a nitrate-dependent mechanism and triggers the calcium signaling pathway (Krouk *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2017). The phosphorylation state affects root subcellular distribution, plasma membrane dynamics, and subcellular trafficking that in turn impair auxin transport and nitrate-regulated signaling (Bourguyon *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019). NRT1.1 also control NRT2.1 (Munos *et al.*, 2004). The auxin gradient increasing toward hydathodes is created by the coordinated activity of efflux proteins and influx transporters. The first ones are encoded by the

PIN and ABCB gene families and facilitate movement of auxin out of cells. The second ones are encoded mostly by the AUX/LAX genes family and that facilitate auxin entry into cells (Petrasek and Friml, 2009; Vieten *et al.*, 2007).

Conclusion

The global increase in temperature leads to lasting change in water regimes and the appearance of extreme rainfall events. This excess water promotes the appearance of pests and pathogens and is a threat to the stability of agricultural production and therefore food security. The accumulation of water in the leaf is a necessary step for infection and can even allow non-host pathogens or non-pathogens to proliferate in the plant. Many pathogens also induce water accumulation during their infectious process either by modifying osmolarity or degrading plant cell walls (Xin *et al.*, 2016; Aung *et al.*, 2018). Hydathodes are also a potential route of infection for many harmful microbes before they spread through the vascular system. These organs are therefore interesting both because they prevent the accumulation of water in the leaves and may thus maintain plant immunity but also offer favorable conditions for the entry and growth of many plant pathogens.

Our data show that hydathodes display an architecture and tissue types that are clearly distinct from the rest of the leaf. These peculiarities are supported by a transcriptomic profiling that distinguishes hydathodes from mesophyll tissues. The transcriptomic analysis also highlights functions that are not solely important for hydathodes but also for the entire plant, like auxin synthesis, metabolite transport or cell wall architecture. Striking features of hydathode cell walls is the presence of partially methylated HG pectins, the higher synthesis of most cell wall components and the finely tune expression of degrading enzymes. All of this may explain the constitution of the smaller, loosely connected epithem cells and some of the successful invading strategies of hydathodes pathogens such as *Xanthomonas*.

Materials and methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis accession Col-0 was grown on soil under short-day condition (8h day-16h dark) in growth chamber under light 100-120 μ E. Auxin related GUS reporter lines (TAA1, N66987; YUCCA 2, N69892; YUCCA 5, 69894; YUCCA 8, N69897; YUCCA 9, N69945) were obtained from the NASC.

Tissue sampling for transcriptomic

Hydathodes were harvested on *Arabidopsis* plants of 8-10 weeks. Basal serrations containing hydathodes were cut with a blade, on leaves with intermediate and/or fully extended blades. Samples

were directly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. The sampling was performed for four biological replicates, on a period of one year. RNA extraction was performed by L. Navarro and M. Charvin, IBENS).

RNA-Seq analyses and data processing

Global expression of genes was determined by replicated strand-specific Illumina RNA-Seq. Paired-end RNA sequencing has been performed on an Illumina HiSeq3000 using a paired-end read length of 2x150 pb with the Illumina HiSeq3000 Reagent Kits (<http://get.genotoul.fr/>). Paired-end reads were mapped on the reference *Arabidopsis* genome using the glint software (release 1.0.rc12.826:833, <http://lipm-bioinfo.toulouse.inra.fr/download/glint>). Only best-scores were taken into account, with a minimal hit length of 60 bp, a maximum of 5 mismatches and no gap allowed. Ambiguous matches with the same best score were removed (parameters: glint mappe --mate-maxdist 10000 -C 0 --output-format bed --best-score --no-gap --step 2 --lmin 60 --mmis 5).

Differential analysis was performed with R (v3.6.2) using the EdgeR package (v3.28.1) and normalization with the TMM method (trimmed mean of M-values; Robinson and Oshlack, 2010) according to Pecrix *et al.*, 2018. Genes with no counts across all libraries were not retained for further analysis. Differentially expressed genes (DEGs) were called using the GLM likelihood ratio test, with a FDR adjusted q-value < 0.001. For quality control plots of normalized datasets, heatmap on sample-to-sample Euclidean distances were generated with the package pheatmap version 1.0.8. Enrichment analysis used the MAPMAN software (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi).

Statistical Analysis

All indications about statistical analysis are indicated in figure legends.

Reporter gene assay/GUS assay

Plant tissues were vacuum infiltrated with staining buffer (50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.2, 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide, 0.2% Triton X-100 [v/v], 2 mM potassium ferricyanide [K_3FeCN_6], 2 mM potassium ferrocyanide [K_4FeCN_6]) and incubated from 2 to 12h at 37°C. Samples were cleared in successive baths of ethanol 80% at 60°C.

Plant transformation

Plant were transformed according to Chung and Pan (2000).

Metabolomic analysis

Samples were collected from 4 week-old plants. About 500, 100 and 100 μ l of lyophilized fluid were used for metabolome analysis of guttation fluid, xylem sap collected before hydathodes (on leaves

halves where 0.5mm of the border was macrodissected) and xylem sap collected before leaf, respectively. These samples were extracted, derivatized and analyzed by an Agilent 7890A gas chromatograph coupled to an Agilent 5975C mass spectrometer as described previously (Fiehn *et al.*, 2006; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2014). Data were analyzed with AMDIS (<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>) and QuanLynx software (Waters). Nitrate and Pi contents were determined as previously described (Zhao and Wang, 2017 and Kanno *et al.*, 2016 respectively). For hormone measurements, in each sample, 6mg of dry powder were extracted with 0.8 mL of acetone/water/acetic acid (80/19/1 v:v:v). Abscisic acid, salicylic acid, jasmonic acid, indole-3-acetic acid and cytokinines stable labelled isotopes used as internal standards were prepared as described in Le Roux *et al.* (2014). 1ng of each and 0.5ng cytokinines standard was added to the sample. The extract was vigorously shaken for 1min, sonicated for 1 min at 25 Hz, shaken for 10 minutes at 10°C in a Thermomixer (Eppendorf®), and then centrifuged (8,000g, 10 °C, 10 min.). The supernatants were collected, and the pellets were re-extracted twice with 0.4 mL of the same extraction solution, then vigorously shaken (1 min) and sonicated (1 min; 25 Hz). After the centrifugations, the three supernatants were pooled and dried (Final Volume 1.6 mL).

Each dry extract was dissolved in 100 µL of acetonitrile/water (50/50 v/v), filtered, and analyzed using a Waters Acquity ultra performance liquid chromatograph coupled to a Waters Xevo Triple quadrupole mass spectrometer TQS (UPLC-ESI-MS/MS). The compounds were separated on a reverse-phase column (Uptisphere C18 UP3HDO, 100*2.1 mm*3µm particle size; Interchim, France) using a flow rate of 0.4 mL min⁻¹ and a binary gradient: (A) acetic acid 0.1 % in water (v/v) and (B) acetonitrile with 0.1 % acetic acid, the column temperature was 40 °C, for Abscisic acid, salicylic acid, jasmonic acid, and indole-3-acetic acid we used the following binary gradient (time, % A): (0 min., 98 %), (3 min., 70 %), (7.5 min., 50 %), (8.5 min., 5 %), (9.6 min., 0%), (13.2 min., 98 %), (15.7 min., 98 %), and for cytokinins (time, % A): (0 min., 95 %), (13 min., 40 %), (16 min., 0 %), (16.5 min., 95 %), Mass spectrometry was conducted in electrospray and Multiple Reaction Monitoring scanning mode (MRM mode), in positive ion mode for the indole-3-acetic acid and in negative ion mode for the other hormones. Relevant instrumental parameters were set as follows: capillary 1.5 kV (negative mode), source block and desolvation gas temperatures 130 °C and 500 °C, respectively. Nitrogen was used to assist the cone and desolvation (150 L h⁻¹ and 800 L h⁻¹, respectively), argon was used as the collision gas at a flow of 0.18 mL min⁻¹.

References

van Alebeek G-JWM, Christensen TMIE, Schols HA, Mikkelsen JD, Voragen AGJ (2002) Mode of action of pectin lyase A of *Aspergillus niger* on differently C(6)-substituted oligogalacturonides. *J Biol Chem* **277**: 25929–25936

- Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich CI** (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* **216**: 841–853
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, et al** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657
- Alvarez JP, Goldshmidt A, Efroni I, Bowman JL, Eshed Y** (2009) The NGATHA Distal Organ Development Genes Are Essential for Style Specification in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 1373–1393
- Bailey KJ, Leegood RC** (2016) Nitrogen recycling from the xylem in rice leaves: dependence upon metabolism and associated changes in xylem hydraulics. *J Exp Bot* **67**: 2901–2911
- Barbosa ICR, Hammes UZ, Schwechheimer C** (2018) Activation and Polarity Control of PIN-FORMED Auxin Transporters by Phosphorylation. *Trends Plant Sci* **23**: 523–538
- Baylis T, Cierlik I, Sundberg E, Mattsson J** (2013) SHORT INTERNODES/STYLISH genes, regulators of auxin biosynthesis, are involved in leaf vein development in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **197**: 737–750
- Benjamins R, Ampudia CSG, Hooykaas PJJ, Offringa R** (2003) PINOID-Mediated Signaling Involves Calcium-Binding Proteins. *Plant Physiology* **132**: 1623–1630
- Bernal E, Deblais L, Rajashekara G, Francis DM** (2021) Bioluminescent *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* as a Tool to Quantify Bacteria in *Planta*, Screen Germplasm, and Identify Infection Routes on Leaf Surfaces. *Front Plant Sci*. doi: [10.3389/fpls.2021.667351](https://doi.org/10.3389/fpls.2021.667351)
- Bouton S, Leboeuf E, Mouille G, Leydecker M-T, Talbotec J, Granier F, Lahaye M, Höfte H, Truong H-N** (2002) QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 2577–2590
- Brauner K, Birami B, Brauner HA, Heyer AG** (2018) Diurnal periodicity of assimilate transport shapes resource allocation and whole-plant carbon balance. *The Plant Journal* **94**: 776–789
- Carlton WM, Braun EJ, Gleason ML** (1998) Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into Tomato Leaves Through Hydathodes. *Phytopathology* **88**: 525–529
- Cerutti A, Jauneau A, Laufs P, Leonhardt N, Schattat MH, Berthomé R, Routaboul J-M, Noël LD** (2019a) Mangroves in the Leaves: Anatomy, Physiology, and Immunity of Epithelial Hydathodes. *Annu Rev Phytopathol* **57**: 91–116
- Cerutti A, Jauneau A, Laufs P, Leonhardt N, Schattat MH, Berthomé R, Routaboul J-M, Noël LD** (2019b) Mangroves in the Leaves: Anatomy, Physiology, and Immunity of Epithelial Hydathodes. *Annu Rev Phytopathol* **57**: 91–116
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y** (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **20**: 1790–1799
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y** (2007) Auxin Synthesized by the YUCCA Flavins Monooxygenases Is Essential for Embryogenesis and Leaf Formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 2430–2439

- Corso M, Doccua FG, de Melo JRF, Costa A, Verbruggen N** (2018) Endoplasmic reticulum-localized CCX2 is required for osmotolerance by regulating ER and cytosolic Ca²⁺ dynamics in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 3966–3971
- Cosgrove DJ** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 850–861
- Driouich A, Follet-Gueye M-L, Bernard S, Kousar S, Chevalier L, Vicré M, Lerouxel O** (2012) Golgi-Mediated Synthesis and Secretion of Matrix Polysaccharides of the Primary Cell Wall of Higher Plants. *Front Plant Sci*. doi: [10.3389/fpls.2012.00079](https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00079)
- Durand M, Mainson D, Porcheron B, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N** (2018) Carbon source-sink relationship in Arabidopsis thaliana: the role of sucrose transporters. *Planta* **247**: 587–611
- Eklund DM, Thelander M, Landberg K, Ståldal V, Nilsson A, Johansson M, Valsecchi I, Pederson ERA, Kowalczyk M, Ljung K, et al** (2010) Homologues of the Arabidopsis thaliana SHI/STY/LRP1 genes control auxin biosynthesis and affect growth and development in the moss Physcomitrella patens. *Development* **137**: 1275–1284
- Fiehn O** (2006) Metabolite profiling in Arabidopsis. *Methods Mol Biol* **323**: 439–447
- Furutani M, Nakano Y, Tasaka M** (2014) MAB4-induced auxin sink generates local auxin gradients in Arabidopsis organ formation. *PNAS* **111**: 1198–1203
- Gälweiler L, Guan C, Müller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K** (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* **282**: 2226–2230
- Garcion C, Lohmann A, Lamodièrre E, Catinot J, Buchala A, Doermann P, Métraux J-P** (2008) Characterization and Biological Function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 Gene of Arabidopsis. *Plant Physiology* **147**: 1279–1287
- Gaufichon L, Masclaux-Daubresse C, Tcherkez G, Reisdorf-Cren M, Sakakibara Y, Hase T, Clement G, Avicé J-C, Grandjean O, Marmagne A, et al** (2012) Arabidopsis thaliana ASN2 encoding asparagine synthetase is involved in the control of nitrogen assimilation and export during vegetative growth. *Plant, cell & environment*. doi: [10.1111/j.1365-3040.2012.02576.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02576.x)
- Ghorbani S, Hoogewijs K, Pečenková T, Fernandez A, Inzé A, Eeckhout D, Kawa D, De Jaeger G, Beeckman T, Madder A, et al** (2016) The SBT6.1 subtilase processes the GOLVEN1 peptide controlling cell elongation. *Journal of Experimental Botany* **67**: 4877–4887
- Gigolashvili T, Yatusевич R, Berger B, Müller C, Flügge U-I** (2007) The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **51**: 247–261
- Harrison PM, Arosio P** (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* **1275**: 161–203
- Hugouvieux V, Barber CE, Daniels MJ** (1998) Entry of Xanthomonas campestris pv. campestris into hydathodes of Arabidopsis thaliana leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 537–543

Kaneda M, Schuetz M, Lin BSP, Chanis C, Hamberger B, Western TL, Ehling J, Samuels AL (2011) ABC transporters coordinately expressed during lignification of Arabidopsis stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. *J Exp Bot* **62**: 2063–2077

Kasprzewska A, Carter R, Swarup R, Bennett M, Monk N, Hobbs JK, Fleming A (2015) Auxin influx importers modulate serration along the leaf margin. *Plant J* **83**: 705–718

Kim J-Y, Symeonidi E, Pang TY, Denyer T, Weidauer D, Bezruczyk M, Miras M, Zöllner N, Hartwig T, Wudick MM, et al (2021) Distinct identities of leaf phloem cells revealed by single cell transcriptomics. *The Plant Cell*. doi: [10.1093/plcell/koaa060](https://doi.org/10.1093/plcell/koaa060)

Klepek Y-S, Volke M, Konrad KR, Wippel K, Hoth S, Hedrich R, Sauer N (2010) Arabidopsis thaliana POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H⁺ symporters in pollen and young xylem cells. *J Exp Bot* **61**: 537–550

Lewis S, Goodman RN (1966) The Glandular Trichomes, Hydathodes and Lenticels of Jonathan Apple and Their Relation to Infection by *Erwinia amylovora*. *Journal of Phytopathology* **55**: 352–358

Li F, Wu X, Lam P, Bird D, Zheng H, Samuels L, Jetter R, Kunst L (2008) Identification of the Wax Ester Synthase/Acyl-Coenzyme A:Diacylglycerol Acyltransferase WSD1 Required for Stem Wax Ester Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **148**: 97–107

Li L-S, Ying J, Li E, Ma T, Li M, Gong L-M, Wei G, Zhang Y, Li S (2021) Calmodulin-Binding Protein 60b is a central transcriptional activator of immunity. *Plant Physiol*. doi: [10.1093/plphys/kiab164](https://doi.org/10.1093/plphys/kiab164)

Li Z, Wang X, Chen J, Gao J, Zhou X, Kuai B (2016) CCX1, a Putative Cation/Ca²⁺ Exchanger, Participates in Regulation of Reactive Oxygen Species Homeostasis and Leaf Senescence. *Plant and Cell Physiology* **57**: 2611–2619

Limberg G, Körner R, Buchholt HC, Christensen TM, Roepstorff P, Mikkelsen JD (2000) Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. *Carbohydr Res* **327**: 293–307

López MA, Vicente J, Kulasekaran S, Vellosillo T, Martínez M, Irigoyen ML, Cascón T, Bannenberg G, Hamberg M, Castresana C (2011) Antagonistic role of 9-lipoxygenase-derived oxylipins and ethylene in the control of oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence. *The Plant Journal* **67**: 447–458

Martínez-Fernández I, Sanchís S, Marini N, Balanzá V, Ballester P, Navarrete-Gómez M, Oliveira AC, Colombo L, Ferrándiz C (2014) The effect of NGATHA altered activity on auxin signaling pathways within the Arabidopsis gynoecium. *Front Plant Sci*. doi: [10.3389/fpls.2014.00210](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00210)

Maurel C, Boursiac Y, Luu D-T, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L (2015) Aquaporins in Plants. *Physiological Reviews* **95**: 1321–1358

Misson J, Thibaud M-C, Bechtold N, Raghothama K, Nussaume L (2004) Transcriptional regulation and functional properties of Arabidopsis Pht1;4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Mol Biol* **55**: 727–741

Mravec J, Skůpa P, Bailly A, Hoyerová K, Krecek P, Bielach A, Petrásek J, Zhang J, Gaykova V, Stierhof Y-D, et al (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* **459**: 1136–1140

Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW (2002) Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis. *Plant J* **31**: 341–353

Mullens A, Jamann T (2020) Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter nebraskensis* in maize. *Plant Disease*. doi: [10.1094/PDIS-08-20-1823-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1823-RE)

Müller-Moulé P, Nozue K, Pytlak ML, Palmer CM, Covington MF, Wallace AD, Harmer SL, Maloof JN (2016) YUCCA auxin biosynthetic genes are required for Arabidopsis shade avoidance. *PeerJ* **4**: e2574

Nagai M, Ohnishi M, Uehara T, Yamagami M, Miura E, Kamakura M, Kitamura A, Sakaguchi S-I, Sakamoto W, Shimmen T, et al (2013) Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to tissue ion levels along primary leaves of barley. *Plant Cell Environ* **36**: 1826–1837

Nazoa P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Zhuo D, Glass ADM, Touraine B (2003) Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in Arabidopsis thaliana: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Mol Biol* **52**: 689–703

Patwari P, Salewski V, Gutbrod K, Kreszies T, Dresen-Scholz B, Peisker H, Steiner U, Meyer AJ, Schreiber L, Dörmann P (2019) Surface wax esters contribute to drought tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal* **98**: 727–744

Perrin A (1970) [Diversity of phytoferritin arrangement in epithem of hydathodes in *Taraxacum officinale* and in *Saxifraga aizoon*]. *Planta* **93**: 71–81

Pillitteri LJ, Bogenschutz NL, Torii KU (2008) The bHLH protein, MUTE, controls differentiation of stomata and the hydathode pore in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **49**: 934–943

Pilot G, Gaymard F, Mouline K, Chérel I, Sentenac H (2003) Regulated expression of Arabidopsis shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant Mol Biol* **51**: 773–787

Pilot G, Stransky H, Bushey DF, Pratelli R, Ludewig U, Wingate VPM, Frommer WB (2004) Overexpression of GLUTAMINE DUMPER1 leads to hypersecretion of glutamine from Hydathodes of Arabidopsis leaves. *Plant Cell* **16**: 1827–1840

Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat J-F, Gaymard F, Cellier F (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *Plant J* **57**: 400–412

Redovniković IR, Textor S, Lisnić B, Gershenzon J (2012) Expression pattern of the glucosinolate side chain biosynthetic genes MAM1 and MAM3 of Arabidopsis thaliana in different organs and developmental stages. *Plant Physiology and Biochemistry* **53**: 77–83

Rekhter D, Lüdke D, Ding Y, Feussner K, Zienkiewicz K, Lipka V, Wiermer M, Zhang Y, Feussner I (2019) Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science* **365**: 498–502

- Samac DA, Shah DM** (1991) Developmental and Pathogen-Induced Activation of the Arabidopsis Acidic Chitinase Promoter. *Plant Cell* **3**: 1063–1072
- Santi S, Schmidt W** (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots. *New Phytol* **183**: 1072–1084
- Schuster J, Knill T, Reichelt M, Gershenzon J, Binder S** (2006) BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE4 Is Part of the Chain Elongation Pathway in the Biosynthesis of Methionine-Derived Glucosinolates in Arabidopsis. *The Plant Cell* **18**: 2664–2679
- Shibagaki N, Rose A, McDermott JP, Fujiwara T, Hayashi H, Yoneyama T, Davies JP** (2002) Selenate-resistant mutants of Arabidopsis thaliana identify Sultr1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant J* **29**: 475–486
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W** (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17**: 616–627
- Torii KU** (2021) Stomatal Development in the Context of Epidermal Tissues. *Annals of Botany*. doi: [10.1093/aob/mcab052](https://doi.org/10.1093/aob/mcab052)
- Torrens-Spence MP, Bobokalonova A, Carballo V, Glinkerman CM, Pluskal T, Shen A, Weng J-K** (2019) PBS3 and EPS1 Complete Salicylic Acid Biosynthesis from Isochorismate in Arabidopsis. *Molecular Plant* **12**: 1577–1586
- Wang W, Xu B, Wang H, Li J, Huang H, Xu L** (2011) YUCCA genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin development. *Plant Physiol* **157**: 1805–1819
- van Wersch R, Li X, Zhang Y** (2016) Mighty Dwarfs: Arabidopsis Autoimmune Mutants and Their Usages in Genetic Dissection of Plant Immunity. *Front Plant Sci* **7**: 1717
- Whitford R, Fernandez A, Tejos R, Pérez AC, Kleine-Vehn J, Vanneste S, Drozdzecki A, Leitner J, Abas L, Aerts M, et al** (2012) GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. *Dev Cell* **22**: 678–685
- Xiao Y, Wu X, Liu D, Yao J, Liang G, Song H, Ismail AM, Luo J-S, Zhang Z** (2020) Cell Wall Polysaccharide-Mediated Cadmium Tolerance Between Two Arabidopsis thaliana Ecotypes. *Front Plant Sci*. doi: [10.3389/fpls.2020.00473](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00473)
- Yadav S, Yadav P, Yadav D, Yadav K** (2009) Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry* **44**: 1–10
- Yagi H, Nagano AJ, Kim J, Tamura K, Mochizuki N, Nagatani A, Matsushita T, Shimada T** (2021) Fluorescent protein-based imaging and tissue-specific RNA-seq analysis of Arabidopsis hydathodes. *Journal of Experimental Botany* **72**: 1260–1270
- Yang N, Zhang Y, Chen L, Wang W, Liu R, Gao R, Zhou Y, Li H** (2021) G protein and PLD δ are involved in JA to regulate osmotic stress responses in Arabidopsis thaliana. *Biochem Biophys Res Commun* **26**: 100952
- Zamil MS, Geitmann A** (2017) The middle lamella—more than a glue. *Phys Biol* **14**: 015004

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche NEPHRON project (ANR-18-CE20-0020-01). LIPM and LRSV are part of the French Laboratory of Excellence project (TULIP ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

Author contributions

JMR, LN conceived the study, supervised experiments and wrote the manuscript with contributions from all co-authors; CB and JMR performed and analyzed the experiments; AG, GC, SC, CR, MC performed experiments; CB, MFJ, SC performed annotation and statistics on transcriptomic data; MS, GM, PL, LNa, LNu contribute to write the manuscript and critically reviewed the results.

Data availability statement

All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files. Sequence read archive accession numbers for RNAseq libraries are openly available.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

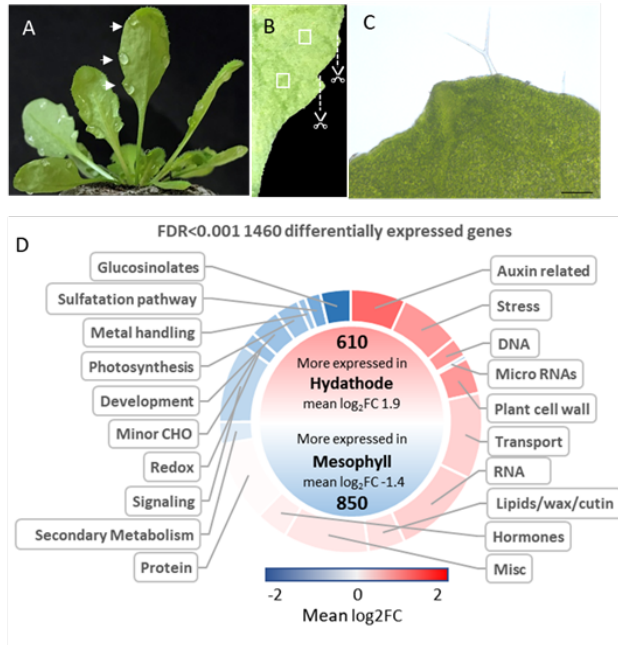


Figure 1. RNA-Seq expression analysis identifies Arabidopsis gene functional categories that differentiate hydathode from the rest of the leaf. (A) Arabidopsis hydathodes are located on leaf margin at the top of leaf teeth (arrows). They release xylem derived fluid excretion droplets. (B) The top of 8-week old leaf teeth and square samples were used for hydathode and mesophyll RNA extraction respectively. Macroscopic view of a hydathode in bright field microscopy shows the numerous xylem vessels endings irrigating this organ and its paler green color (B (C) Breakdown of the 1087 annotated out of 1460 DEG between hydathode and mesophyll tissues at the FDR<0.001 level into functional categories. DEG were mainly annotated using the MapMan analysis classification available from the BASR site (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools/classification_superviewer.cgi) and personal annotation from bibliography according to available references (see supplemental Table 1). A color key is shown that is proportional to the mean log₂Fold Change (FC) of the genes belonging to the given functional category that were globally either more expressed in hydathode (in red) or more expressed in mesophyll (in blue).

Table 2. List of the 20 most differentially expressed genes (DEG) in hydathode. *Arabidopsis* genome gene ID (AGI), gene name, mean normalized counts in hydathode (mean C H) or mesophyll (mean C M), log₂Fold Change (FC), False Discovery rate (FDR) and TAIR10 annotation are given.

AGI	Name	Log ₂ F		FDR	TAIR annotation
		C	Mean C H / Mean C M		
At3g16670		11,0	997,6 / 0,8	2,44E-16	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
At3G05730		10,8	1434,0 / 4,6	6,80E-10	Defensin like
At3g16660		8,7	191,0 / 1,1	3,86E-12	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
At1g56710	PGL1	7,1	37,2 / 0,2	3,24E-72	PGL1__Pectin lyase-like superfamily protein
At3g09330	NIP3;1	6,7	12,6 / 0,1	4,06E-78	Transmembrane amino acid transporter family protein
At1G22900		6,7	65,6 / 0,6	5,06E-174	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein
At1g08090	NRT2.1	6,6	58,9 / 0,7	9,56E-37	NRT2.1__nitrate transporter 2:1
At4g36260	STY2	6,2	23,4 / 0,3	2,23E-63	SRS2_STY2__Lateral root primordium (LRP) protein-related
AT2G28970		6,1	5,1 / 0,1	3,86E-36	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
At3g51060	STY1	5,9	6,9 / 0,1	1,78E-43	AtSTY1_SRS1_STY1__Lateral root primordium (LRP) protein-related
AT4G32950		5,7	9,8 / 0,1	2,46E-49	Protein phosphatase 2C family protein
AT2G43610		5,7	7,9 / 0,1	5,78E-51	Chitinase family protein
AT1G17960		5,6	4,1 / 0,1	2,04E-28	Threonyl-tRNA synthetase
AT2G29380	HAI3	5,4	3,3 / 0,1	6,74E-22	HAI3__highly ABA-induced PP2C gene 3
AT4G23550	WRKY29	5,1	60,6 / 1,6	2,42E-81	ATWRKY29_WRKY29__WRKY family transcription factor
AT2G19990		5,1	20,4 / 0,5	2,23E-72	PR-1-LIKE__pathogenesis-related protein-1-like
At5g11320	YUC4	5,0	2,7 / 0,1	2,48E-20	AtYUC4_YUC4__Flavin-binding monooxygenase family protein
AT5G24910	CYP714A1	5,0	6,0 / 0,2	1,21E-28	CYP714A1_ELAI__cytochrome P450, family 714, subfamily A, polypeptide 1
At5g43890	YUC5	5,0	6,7 / 0,2	5,10E-30	SUPER1_YUC5__Flavin-binding monooxygenase family protein
AT4G09430		4,8	3,9 / 0,2	2,21E-22	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family

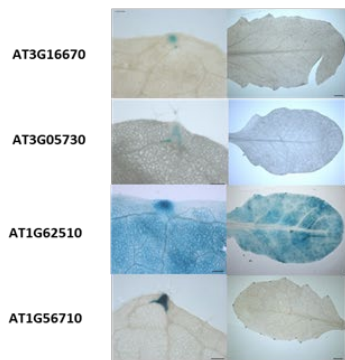
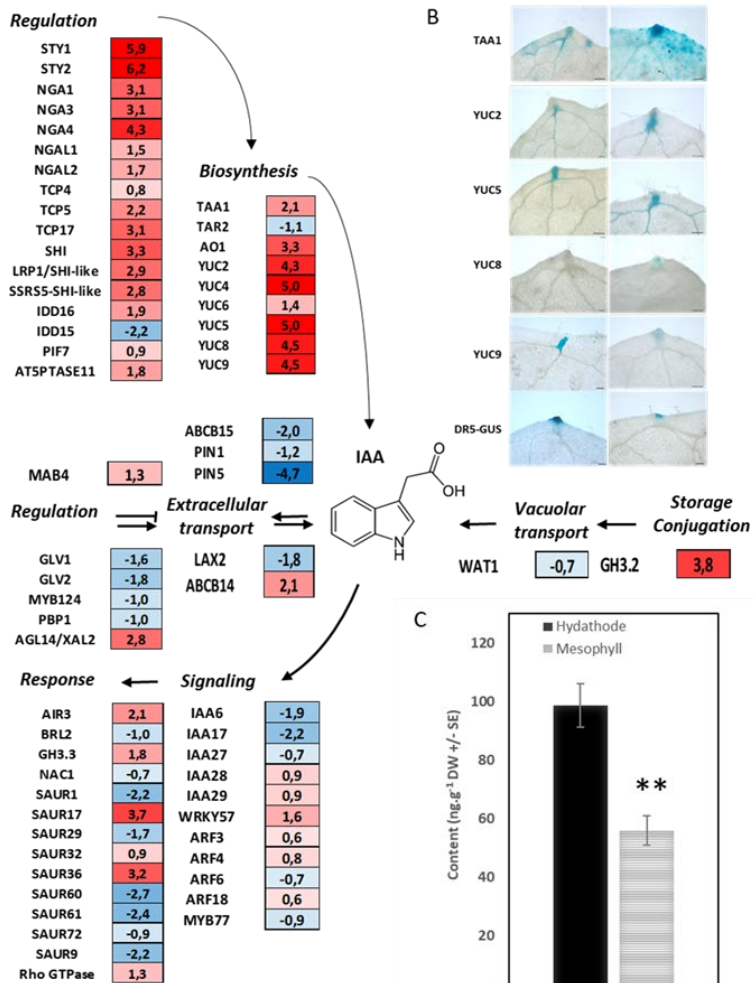


Figure 3. Promoter GUS expression analysis on 8-week-old plants of four promoter GUS reporter lines validate the transcriptomic data. (scale bar 0.2mm).

Figure 2. Hydathodes are a major place of auxin metabolism. (A) Scheme of auxin metabolism with main genes either more (red) or less (blue) expressed in hydathode. Log₂FC is also indicated for each gene (see supplemental table 1 for more information). (B) Free auxin and (C) auxin conjugates contents in hydathode and mesophyll of 8 week-old leaves. (C) Promoter GUS expression analysis of several genes expressed mostly in hydathode or mesophyll validate RNA-Seq analysis: Hydathode expressed TAA1 and YUCs gene involved in auxin synthesis, the auxin response reporter DR5-GUS and mesophyll expressed GDU4.7 (4 and 8-week-old plants (-0.2mm)). . Means +/- SE. ** p>0.001 T-test paired. n=6.



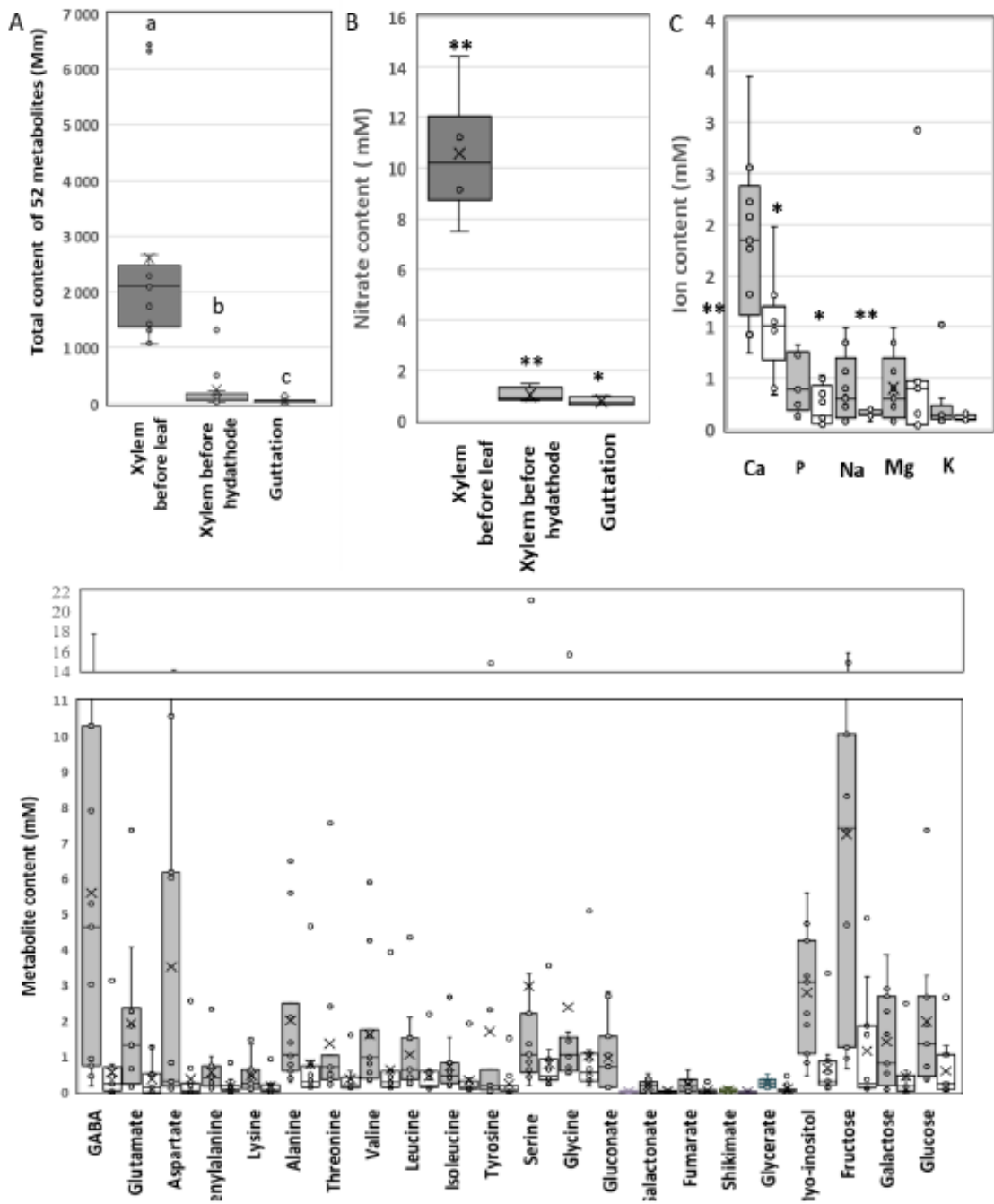
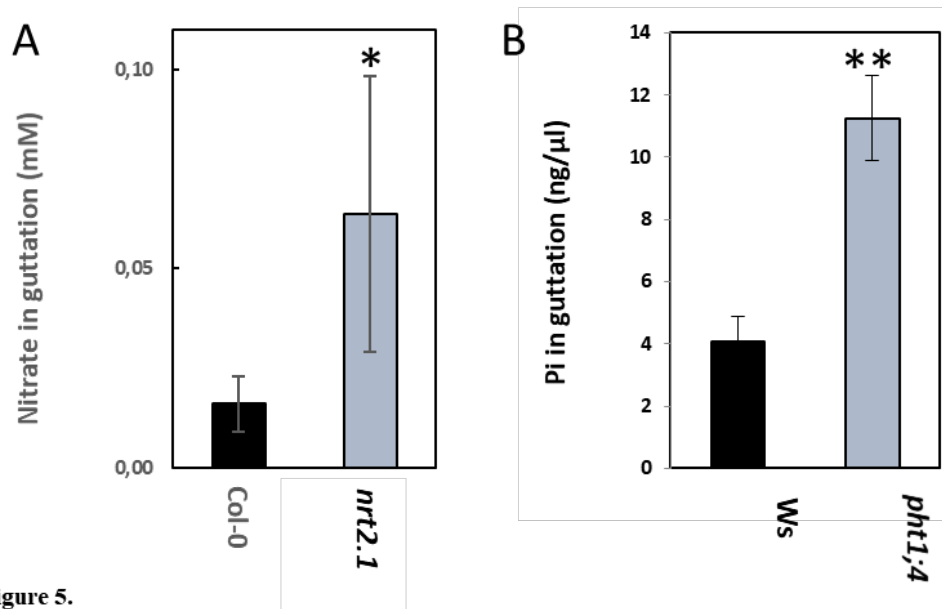


Figure 4. Uptake of metabolites in leaf. (A) Total metabolite content (mM) in xylem before petiole, xylem before hydathode and guttation fluid showing uptake gradient of metabolite from petiole to hydathode in 4 week-old plants and (D) Metabolites significantly different between xylem before hydathode and guttation fluid. (A and D) Measured with GC-MS on 4-week-old plants. Different letter means $p < 0.05$, $n = 12$, using a non-parametric Kruskal-Wallis statistical test (B) Nitrate content measured colorimetrically in xylem before hydathode (grey boxes) and guttation fluid (white boxes), * $p < 0.05$ and ** $p > 0.01$, T-test paired, $n = 5$ (C) Mineral contents of guttation fluid. Ions measured with ICP-MS. * $p < 0.05$ and ** $p > 0.01$ T-test paired, $n = 9$

Table 4.

Genes involved in nitrate and phosphate transport and nitrate metabolism more expressed in hydathode. *Arabidopsis* genome gene ID (AGI), gene name, mean normalized counts in hydathode (mean C H) or mesophyll (mean C M), log₂ Fold Change (FC), False Discovery rate (FDR) and TAIR10 annotation are given.

AGI	Name	log ₂ FC	Mean CH	MeanCM	FDR
Nitrate transport					
At1g08090	NRT2.1	6,6	58,9	0,7	9,56E-37
AT3G45060	ATNRT2.6	2,7	2,9	0,4	1,56E-06
AT1G12940	ATNRT2.5	2,6	5,1	1,1	1,20E-09
At1g68570	NPF3.1	2,2	94,4	18,0	1,09E-18
At5g50200	NRT3.1	1,5	39,3	13,3	3,42E-12
AT1G69870	NRT1.7	1,4	674,2	263,6	8,50E-11
At1g12110	NRT1.1	0,8	63,5	37,9	2,33E-05
Phosphate transport					
At2g38940	PHT1;4	4,3	31,2	1,5	6,62E-49

**Figure 5.**

Uptake of nitrate and phosphate at hydathode. (A) GUS promoter expression analysis of *PHT1;4* gene in hydathode and surrounding leaf. Nitrate and phosphate contents in guttation in *nrt2.1* (B) and *pht1;4* (C) mutants showing higher concentration of nitrate or phosphate in given mutants. Means \pm SE. * $p < 0.05$ and ** $p > 0.001$ T-test paired. $n = 7$.

Table 5.

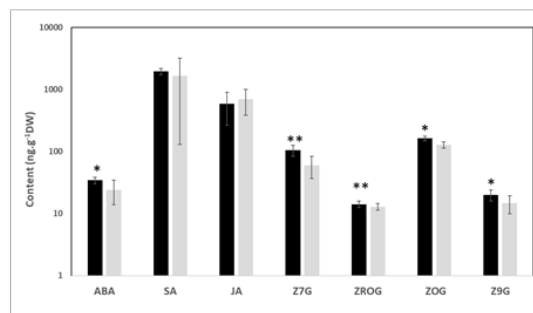
Twenty most expressed genes in hydathode involved in defenses. *Arabidopsis* genome gene ID (AGI), gene name, mean normalized counts in hydathode (mean C H) or mesophyll (mean C M), log₂ Fold Change (FC), False Discovery rate (FDR) and TAIR10 annotation are given.

ID	log ₂ FC	Mean		FDR	TAIR 10 annotation
		C H	C M		
AT3G05730	10,8	1434,0	4,6	6,80E-10	Defensin?
AT1G22900	6,7	65,6	0,6	5,06E-174	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein
AT2G43610	5,7	7,9	0,1	5,78E-51	Chitinase family protein
AT2G19990	5,1	20,4	0,5	2,23E-72	PR-1-LIKE__pathogenesis-related protein-1-like
AT4G09430	4,8	3,9	0,2	2,21E-22	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT1G72260	4,6	21,5	1,6	5,89E-09	THI2.1_THI2.1.1__thionin 2.1
AT1G44160	4,5	5,4	0,2	3,06E-26	HSP40/DnaJ peptide-binding protein
AT2G43590	4,4	43,9	2,4	2,15E-96	Chitinase family protein
AT2G17060	4,4	4,7	0,2	2,88E-27	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT1G19610	4,0	17,3	1,0	9,09E-45	LCR78_PDF1.4__Arabidopsis defensin-like protein
AT1G23120	3,2	4,6	0,4	1,05E-10	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT2G17050	3,2	4,1	0,4	1,03E-10	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative
AT1G70880	3,0	0,9	0,1	3,01E-06	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT4G19820	2,9	2,0	0,2	4,27E-08	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain
AT2G43620	2,7	36,9	5,5	3,30E-56	Chitinase family protein
AT2G17055	2,6	0,6	0,1	1,27E-04	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein
AT4G19810	2,6	8,5	1,5	3,78E-13	ChiC__Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain
AT4G09420	2,5	7,5	1,2	9,14E-15	Disease resistance protein (TIR-NBS class)
AT2G21510	2,3	5,4	1,2	4,94E-07	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
AT5G47130	2,2	9,4	1,9	1,34E-12	Bax inhibitor-1 family protein

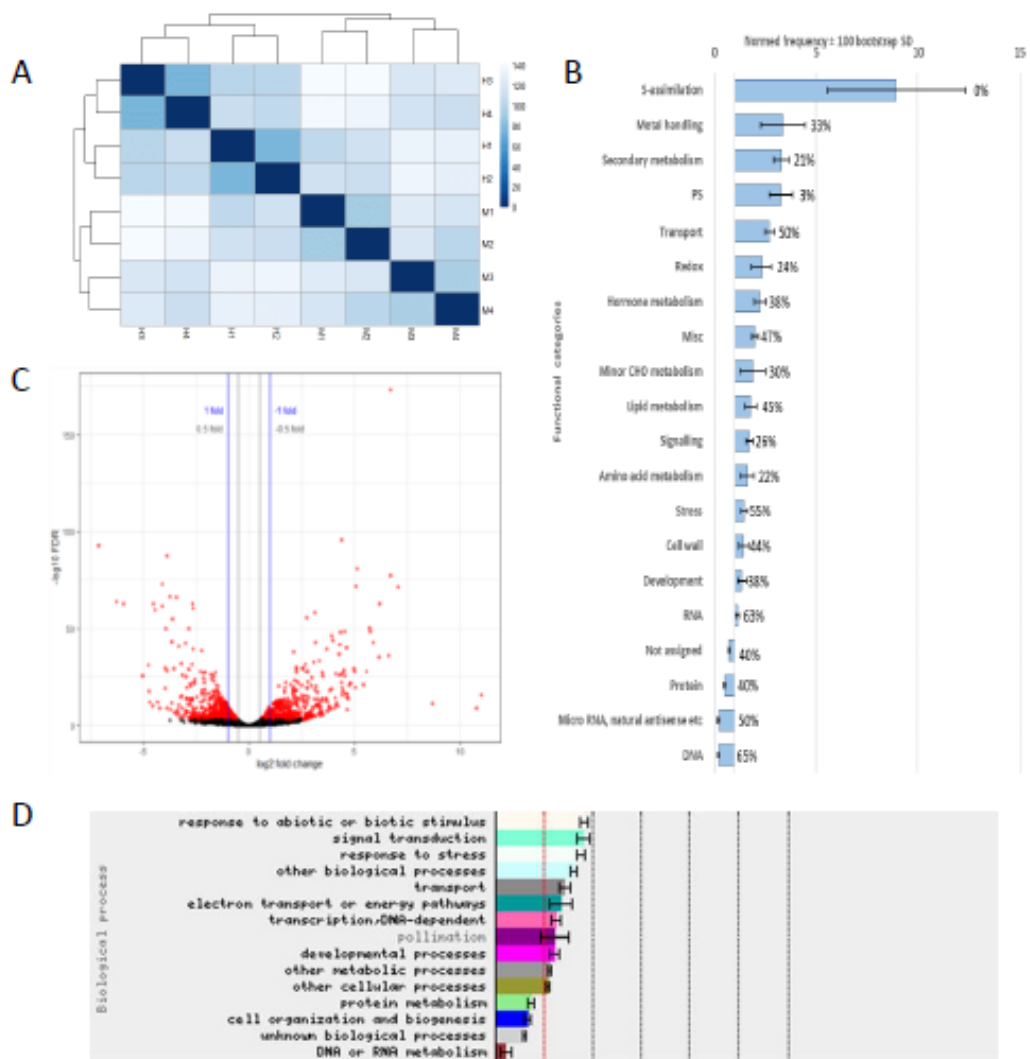
Table 6

Given gene involved in ABA, SA, JA metabolism that are either more (red) or less (blue) expressed in hydathode (see supplemental table for normalised mean counts and FDR) compared to mesophyll of 8 week-old leaves. log₂FC is indicated for each gene.

ID	name	Log2FC	Mean C H	Mean C M	FDR
ABA metabolism					
AT1G30100	NCED5	2,7	0,9	0,2	3,36E-05
AT5G15960	KIN1	2,2	438,8	101,5	1,33E-29
AT4G24960	HVA22D	0,8	139,1	79,9	3,22E-05
AT5G67030	ABA1	-0,8	278,7	467,4	6,05E-04
Cytokinin metabolism					
At1g22400	UGT85A1	1,8	33,5	9,4	2,86E-09
AT3G63110	ITP3	-1,1	3,3	7,0	2,23E-04
GA metabolism					
At1g02400	GA20X6	1,6	79,1	24,9	1,27E-11
AT5G14920	GASA14	1,3	43,1	17,4	1,02E-09
At5g17490	RGL3	1,1	33,6	18,1	2,39E-04
AT3G63010	GID18	0,8	21,3	13,2	5,05E-04
AT1G79460	KS1	-0,8	21,6	36,4	3,41E-06
AT1G22690		-1,1	5,2	11,2	2,20E-06
At5g52020	GSTF11	3,1	4,6	0,5	2,53E-14
SA metabolism					
At1g74710	ICS1	-1,3	19,7	49,9	1,54E-05
At1g18870	ICS2	-1,2	8,6	18,7	1,59E-04
At5g24530	DRM6	-0,8	73,5	128,4	1,15E-04
At4g37750	ANT	-1,2	1,7	3,9	3,10E-04
At5g13320	GH3.12	-1,6	8,7	27,9	8,02E-04
JA metabolism					
AT1G55020	LOX1	-0,9	12,4	22,1	7,45E-06
AT3G22400	LOX5	-1,2	2,9	6,7	5,21E-04

**Figure 6.**

ABA, SA, JA and some cytokinins contents in hydathode compared to mesophyll. ABA, SA, JA, cytokinins contents measured with GC-MS. Means +/- SE. * p < 0.05 and ** p > 0.001 T-test paired. n=6.

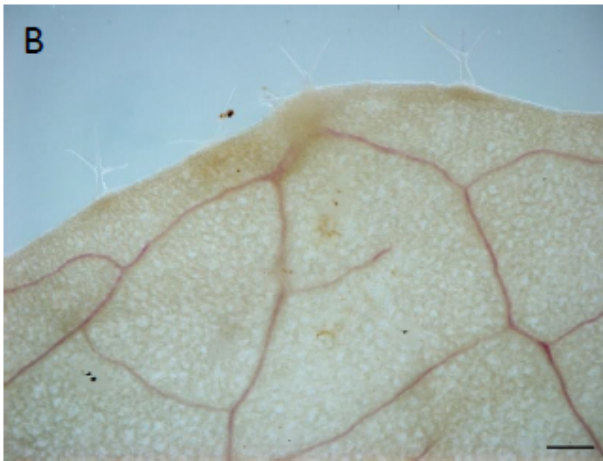


Supplemental Figure 1.

RNA-Seq expression profiling of Arabidopsis hydathode compared to mesophyll tissues. (A) Clustering analysis with evaluation of euclidean distance shows that samples are grouped by tissue type. A color key is shown on the right. (B) Log₂Fold Change (FC) between hydathode and mesophyll expression with log₁₀ False Discovery Rate (FDR). Genes with a FDR>0.001 are indicated in red. Over- and under-represented functional categories analysis of hydathode compared to mesophyll using (C) the MapMan analysis classification and (D) GO analysis for biological processes analyzed using the BAR site (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi). Analysis were done using the 1460 DEG between hydathode and mesophyll tissues at the FDR<0.001 level. Normed frequency number, 100 bootstrap+/-SD is displayed. Percent of DE gene more expressed in hydathode are indicated for each functional category for Mapman analysis. Normed frequency is calculated as: $\text{Number_in_Class input_set} / \text{Number_Classified input_set} / ((\text{Number_in_Class reference_set} / \text{Number_Classified reference_set}))$; p-value of the hypergeometric distribution. It is calculated as follows: $p = \text{BC}(M,x) * \text{BC}(N-M, n-x) / \text{BC}(N,n)$ with BC as the binomial coefficient calculated as follows: $\text{BC}(n,k) = n! / (k! * (n-k)!)$, x as the number of input genes with the selected classification, n as the total number of input genes, M as the number of genes with the selected classification in the MapMan database, N as the total number of genes in this database. Provant, N., Zhu, T. (2003) A Browser-based Functional Classification SuperViewer for Arabidopsis Genomics. *Currents in Computational Molecular Biology* 2003:271-272.)

A

<i>Flavonoids</i>		
At5g13930	CHS	-1,2
At5g42800	DFR	-0,8
At5g61160	AACT1	-2,1
At2g33590	DFR-like?	-0,6
<i>Lignins</i>		
At1g15950	CCR1	-0,8
At4g37970	CAD6	-1,3
At1g77520	OMT	-2,5
<i>Regulators</i>		
At1g56650	MYB75	-1,2
AT4G38620	MYB4	0,8

**Supplemental Figure 3.**

DE genes involved in phenylpropanoid metabolism and visualisation of lignin deposition in secondary cell wall using phloroglucinol staining. DE genes involved in flavonoid and lignin synthesis were all less expressed in hydathode compared to mesophyll including the flavonoid activator MYB75 (A). The only DE gene that was more expressed in hydathode was the dual flavonoid and lignin repressor MYB4 (Ma *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). This lower expression of phenylpropanoid metabolism genes is consistent with the observation that lignified secondary cell xylem vessels (visualised in pink with phloroglucinol staining) only irrigate the lower part of Arabidopsis hydathode (B).

Supplemental Table 1. List of 1460 differentially expressed genes

Supplemental Figure 1.

RNA-Seq expression profiling of Arabidopsis hydathode compared to mesophyll tissues. (A) \log_2 Fold Change (FC) between hydathode and mesophyll expression with \log_{10} False Discovery Rate (FDR). Genes with a $FDR > 0.001$ are indicated in red. Over- and under-represented functional categories analysis of hydathode compared to mesophyll using the MapMan analysis classification available from the BAR site (http://bar.utoronto.ca/nTools/cgi-bin/nTools_classification_superviewer.cgi). Analysis were done using the 1460 DEG between hydathode and mesophyll tissues at the $FDR < 0.001$ level. Normed frequency number, 100 bootstrap \pm SD is displayed and percent of DE gene more expressed in hydathode are indicated for each functional category. Normed frequency is calculated as: $\text{Number_in_Class_input_set} / \text{Number_Classified_input_set}$; $(\text{Number_in_Class_reference_set} / \text{Number_Classified_reference_set})$; p-value of the hypergeometric distribution. It is calculated as follows: $p = \text{BC}(M, x) * \text{BC}(N-M, n-x) / \text{BC}(N, n)$ with BC as the binomial coefficient calculated as follows: $\text{BC}(n, k) = n! / (k! * (n-k)!)$, x as the number of input genes with the selected classification, n as the total number of input genes, M as the number of genes with the selected classification in the MapMan database, N as the total number of genes in this database. Colors are proportional to the number of either more expressed in hydathode (red) or more expressed in mesophyll genes (Provar, N., Zhu, T. (2003) A Browser-based Functional Classification SuperViewer for Arabidopsis Genomics. *Currents in Computational Molecular Biology* 2003:271-272.)

Annexe II. Transcriptomic and immunofluorescence analysis of cauliflower hydathodes

Transcriptomic and immunofluorescence analysis of cauliflower hydathodes: A focus on remodeling cell wall domains following infection by *Xanthomonas*

Jean-Marc Routaboul^{1a*}, Alain Jauneau^{2a}, Caroline Bellenot¹, Marie-Françoise Jardinaud¹, Sébastien Carrère¹, Marie-Christine Auriac^{1,2}, Marielle Aguilar³, Aude Cerutti¹, Emmanuelle Lauber¹, Vincent Burlat³, Laurent D. Noël^{1*}

¹ Laboratoire des interactions plantes-microbes-environnement, LIPME, Université de Toulouse, INRAE, CNRS, Castanet-Tolosan, France.

² Institut Fédératif de Recherche 3450, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Plateforme Imagerie TRI-Genotoul, Castanet-Tolosan, France.

³ Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, CNRS, Université Paul Sabatier, INP Toulouse, Castanet-Tolosan, France.

^a Authors contributed equally to this work

Running title: Transcriptomic and immunofluorescence analysis of cauliflower hydathode

* Address correspondence to jean-marc.routaboul@inrae.fr or laurent.noel@inrae.fr, LIPME, 24 Chemin de Borde-Rouge, Auzeville, CS52627, F-31326 Castanet-Tolosan, FRANCE, ORCID JMR: 0000-0003-2197-5280, ORCID LDN: 0000-0002-0110-1423

Highlight

Transcriptomic analysis of cauliflower hydathodes and localization of cell wall components provide molecular bases for hydathodes physiology with a focus on plant cell wall and its degradation by a vascular pathogen.

Abstract

Hydathodes are organs found at the leaf margins of all vascular plants. Hydathodes mediate guttation of xylem-derived droplets when transpiration rate is low and humidity elevated. These organs are natural infection sites for several vascular microbial pathogens such as *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) bacteria, the causal agent of black rot disease on *Arabidopsis thaliana* and cauliflower. In this

study, we performed a transcriptomic analysis of cauliflower hydathodes compared to mesophyll. We identified 2053 genes significantly overexpressed in hydathodes including genes related to auxin metabolism, transport, stress or cell wall. For instance, expression of genes relevant for cell wall component synthesis and remodelling, such as most pectin lyases and two methyl esterase inhibitors, were upregulated in hydathodes. Immunofluorescence labelling of cell wall polysaccharides in non-infected and infected hydathodes showed that hydathodes contains partially methyl-esterified pectins that are the first cell wall component degraded during *Xcc* infection. These transcriptomic and topochemical atlas provide the molecular cues to hydathodes identity and specificities.

Keywords

Hydathode, *Brassica oleracea*, cell wall, transcriptomic, immunofluorescence, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Abbreviations

AGP, ArabinoGalactan Protein

Bo, *Brassica oleracea*

DEG, Differentially Expressed Gene

dpi, Days Post Infection

M, Mesophyll

H, Hydathode

HG, Homogalacturonan

Xcc, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

PAE, Pectin Acetyl Esterase

PL, Pectin Lyase

PG, PolyGalacturonase

PME, Pectin Methyl Esterase

PMEI, Pectin Methyl Esterase Inhibitor

Introduction

Hydathodes are small organs found at the leaf margin of all vascular plants (Cerutti *et al.*, 2019). They are composed of water pores flanked by guard cells that give access to an underneath cavity (Perrin, 1972, Cerutti *et al.*, 2017, Jauneau *et al.*, 2020). Most hydathodes possess around this cavity a parenchymatous tissue composed of small and loosely connected cells called the epithem. The epithem is irrigated by a delta shaped structure of converging leaf veins. The main role of hydathodes is to maintain water flow from the roots up to the leaves, by the release of guttation fluid. . This process is

especially important during the night when stomata are closed. Hydathodes are also the place of complex and active exchanges of minerals, metals, amino acids, sugars, hormones, organic acids and vitamins. Most of these compounds are less concentrated in the guttation fluid than in the xylem sap and numerous transporter genes are expressed in the hydathodes, leading to the hypothesis that these transporters prevent excessive loss of essential nutrients in the guttation fluid (Perrin, 1972; Pilot *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2013; Bailey and Leegood, 2016). Last, but not least, hydathodes have also been proposed to be a place of auxin synthesis since many auxin biosynthetic gene and the DR5-auxin reporter are expressed in these organs (Aloni *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2009; Eklund *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Martinez-Fernandez *et al.*, 2014; Baylis *et al.*, 2013; Muller-Moulé *et al.*, 2016).

Moreover, hydathodes offer almost direct access to the vascular system and nutrients for many pathogenic bacteria responsible for many economically important diseases. For example, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) causes black rot on Brassicaceae species, such as the model plant *Arabidopsis thaliana* and cauliflower crops (Lewis and Goodman, 1966; Carlton *et al.*, 1998; Hugouvieux *et al.*, 1998; Cerutti *et al.*, 2019; Mullens et Jamann, 2020). The lifestyle of *Xcc* is complex with both epiphytic and endophytic stages (Vicente and Holub, 2013). The entry of *Xcc* through the water pores in cauliflower and in *A. thaliana* is not limited by pre-invasive immunity. Until three days post infection (dpi), bacteria adopt a biotrophic lifestyle. They multiply in the epithem without visible plant cell wall degradation and find their way between the epithem cells towards the vasculature, where they gather (Cerutti *et al.*, 2017). Plant cell walls not only provide a structure to the plant architecture but also act as a possible physical and dynamic barrier against pathogens. After 6 dpi, *Xcc* switch to a necrotrophic lifestyle, degrading epithem cells, invading the veins and propagating into the plant (Cerutti *et al.*, 2017). In parallel, many bacterial genes encoding cell wall degradation enzymes, type 2 secretion system (T2S) or carbohydrate catabolic pathway are expressed at higher levels during this period (Luneau *et al.*, 2022). Moreover, the molecular compounds produced by the breakdown of the cell wall components can provide nutrients for the bacterial growth and/or elicit defenses against pathogens (Underwood, 2012; Malinovsky *et al.*, 2014; Hou et Ma, 2020).

Plant cell walls are made of a network of relatively stiff cellulose microfibrils cross-linked with glycosylated non-cellulosic materials, such as hemicelluloses, and embedded in a matrix of pectins and structural proteins (and phenolics in the secondary cell walls) (Cosgrove, 2005). Pectins are a diverse group of polysaccharides made of galacturonic acid (GalA) and constitute up ~50% of *Arabidopsis* leaf cell walls (Zabackis *et al.*, 1995; Zandleven *et al.*, 2007; Mohnen, 2008; Harholt *et al.*, 2010). Homogalacturonan (HG), a linear homopolymer of GalA, accounts for 65% of the pectins (Mohen, 2008). Based on these main components, cell walls can differ in their composition, fine structure and architecture depending on the tissue, cell type or cell wall domains. The cell wall structuration involves the action of cross-linked structural proteins such as extensins (HRGP) and the cell wall dynamic is achieved by the continuous action of various cell wall proteins. These proteins belong to complex

multigenic families including polygalacturonases (PG), pectin lyases (PL), pectin methyl (or acetyl) esterases (PME, PAE), expansins or arabinogalactan proteins (AGP). They may remodel cell wall stiffness, thickness or cell-to-cell adhesion in a concerted way (Cosgrove, 2005, 2018). PME and PME inhibitors (PMEI) are also important factors during infection by different microbial pathogens. It was shown with fungi such as *Botrytis cinerea* and *Alternaria brassicicola*, bacteria such as *Pseudomonas syringae*, nematodes such as *Heterodera glycines* and viruses like turnip vein clearing virus (TVCV) (Lionetti *et al.*, 2007, 2013, 2017; Hewezi *et al.*, 2008; Lionetti, an Métraux, 2014; Bethke *et al.*, 2014, 2016; Liu *et al.*, 2018). The PAE-dependent pectin acetylation status (Chiniguy *et al.*, 2019) and pectate lyase-dependent pectin fragmentation are also important immunity factors (Yang *et al.*, 2017).

Information about the molecular basis of hydathodes functions is scarce, despite their importance for guttation, metabolite uptake or exclusion, auxin metabolism or biotic stress. It is only very recently that two seminal studies have highlighted 167 genes more expressed in *Arabidopsis* hydathodes than in the rest of the plant (Yagi *et al.*, 2020 and Kim *et al.*, 2021). How bacteria penetrate the vessel element remains unclear partially because little is known about the composition of the plant cell wall along the bacteria route, from hydathode to vascular vessels. We also lack knowledge about genes involved in the biosynthesis, modification or degradation of hydathode plant cell wall components. In cauliflower, compositional information of polysaccharides only concerns market-ready plants (Femenia *et al.*, 1999) and localization of hydathode cell wall components is unknown. Thus, we performed a comparative transcriptomic analysis of healthy hydathode and mesophyll enriched tissues. Then we used well-characterized antibodies targeted against cell wall polysaccharides in non-infected and *Xcc* infected hydathodes at 3 and 6 dpi to follow the impact of *Xcc* on hydathode cell walls.

Material and methods

Plant Material, Growth Conditions, and Infection Tests

Cauliflower (*B. oleracea* var. *botrytis*) cultivar Clovis was grown under greenhouse conditions. Histological and immunostaining observations, RNA extraction and *Xcc* inoculations were performed on the second true leaf of four-weeks-old plants.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* strain 8004 (Daniels *et al.*, 1984) was grown in MOKA-rich medium (4 g/L yeast extract, 8 g/L casamino acids, 2 g/L K₂HPO₄, and 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O; Blanvillain *et al.*, 2007) at 28°C under shaking. Bacteria were harvested from overnight cultures in MOKA by centrifugation (4,000g, 10 min) and suspended in 1 mM MgCl₂. Inoculation was performed by dipping leaves for 20 s in bacterial suspension (10⁸ cfu·mL⁻¹) containing SILWET L-77 (0.02%).

After inoculation, plants were placed in a growth chamber (9 h light; 22°C; relative humidity 70%) in mini-greenhouses covered for 24h with a clear plastic cover to keep them at 100% relative humidity.

RNA-Seq extraction, analyses and data processing

One hundred hydathode-enriched and mesophyll samples were harvested in three biological replicates using a 1.5mm Miltex™ Biopsy punch (Miltex, Hatfield, USA) and frozen in liquid nitrogen. Total RNA samples were isolated using the *mir*-Vana™ miRNA isolation kit according to the manufacturer's instructions and were treated with DNase (Ambion, Carlsbad, USA). Prior to sequencing, purified RNA quality was checked with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Germany). Global expression of cauliflower genes was determined by replicated strand-specific Illumina RNA-Seq. Paired-end RNA sequencing has been performed on an Illumina HiSeq3000 using a paired-end read length of 2x150 pb with the Illumina HiSeq3000 Reagent Kits. (<http://get.genotoul.fr/>). Paired-end reads were mapped on the reference genome of *B. oleracea* V2.1.31 and using the glint software (release 1.0.rc12.826:833, <http://lipm-bioinfo.toulouse.inra.fr/download/glint>). Only best-scores were taken into account, with a minimal hit length of 60 bp, a maximum of 5 mismatches and no gap allowed. Ambiguous matches with the same best score were removed (parameters: `glint mappe --mate-maxdist 10000 -C 0 --output-format bed --best-score --no-gap --step 2 --lmin 60 --mmis 5`).

Differential analysis was performed with R (v3.6.2) using the EdgeR package (v3.28.1) and normalization with the TMM method (trimmed mean of M-values; Robinson and Oshlack, 2010) according to Pecrix *et al.*, 2018. Genes with no counts across all libraries were not retained for further analysis. Differentially expressed genes (DEGs) were called using the GLM likelihood ratio test, with a FDR adjusted q-value < 0.001. For quality control plots of normalized datasets, heatmap on sample-to-sample Euclidean distances were generated with the package pheatmap version 1.0.8. To determine the closest Arabidopsis homolog and classified cauliflower gene into functional categories we used the Mercator V3.6 software (<https://www.plabipd.de/portal/mercator-sequence-annotation>). Enrichment analysis used the MAPMAN software (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi).

Observations of Clarified Samples

Samples were treated in an aqueous solution of chloral hydrate (45 g of chloral hydrate and 9.3 mL of a solution 60% glycerol in 7.6 mL water) for 1 to 3 weeks. These were mounted in the same solution and images of hydathodes were acquired in Nomarsky (DIC) using an inverted microscope (DMIRBE; Leica) equipped with a color CCD camera (DFC300 FX; Leica). Some samples were rinsed in water and stained in an aqueous solution of calcofluor (0.01% [w/v]) for cell wall imaging. Confocal images were then captured using the xyz acquisition mode of a laser scanning confocal microscope (SP2AOBS; Leica). The 405-nm diode laser was used for excitation, and the emitted fluorescence was collected between 410 and 500 nm. Images were then analyzed using Image-Pro Plus software (Media Cybernetics).

Resin Embedded Material, cytochemical and immunolabelling and Microscopies

Hydathodes (2–3 mm²) were fixed under vacuum for 30 min with 2.5% glutaraldehyde in 0.2 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.2) containing 0.1% Triton X-100 and then, at the atmospheric pressure, for 1 h in the same solution without Triton X-100. Samples were rinsed in the same cacodylate buffer. Samples were dehydrated in a series of aqueous solutions of increasing ethanol concentrations (25, 50, 70, 95, and 100%, 1 h each) and then infiltrated stepwise in LRWhite acrylic resin using a microwave apparatus (Leica EM AMW). Resin was finally polymerized for 24 h at 60°C. From embedded material, semithin (0.5 µm in thickness) or ultra-thin (80–90 nm thickness) paradermal sections of uninfected or *Xcc*-inoculated hydathodes (3 dpi and 6 dpi) were prepared using an UltraCut E ultramicrotome equipped with a diamond knife (Reichert-Leica), for immunofluorescence and confocal microscopy or immunogold and TEM, respectively.

For bright-field microscopy, semi thin sections were mounted on silane-coated glass slides and stained in 0.1% toluidine blue. For transmission electron microscopy, ultrathin sections were collected on carbon-coated gold TEM grids and submitted to the periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate (PATAg) polysaccharide staining or the UranylLess ultrastructural negative staining.

Immunofluorescence labeling was performed as previously reported (Cosio et al. 2017). Briefly, semithin sections were disposed on silane-coated slides and blocked with 5% nonfat dry milk in TTBS₅₀₀ (0.01 M Tris-HCl pH 7.5, 500mM NaCl, 0.3% Tween 20) for 30 min. Sections were incubated at room temperature in primary JIM or LM rat monoclonal antibodies (<http://www.plantprobes.net>) diluted 1:10 in TTBS₅₀₀-milk for 3-4 h under a coverslip. Following 6 washing steps in TTBS₅₀₀ the sections were incubated in anti-Rat IgG-Alexa488 secondary antibody (Invitrogen) diluted 1:100 in TTBS₅₀₀-milk for 90 min under a coverslip. After final washing steps, the slides were mounted in Pro-Long® Gold Antifade medium and imaged using confocal microscopy. HCX APO CS 63.0 × 1.40 oil immersion objective under sequential mode: Sequence 1 for Alexa488 (excitation: 488 nm; emission: 499–578 nm), sequence 2 for autofluorescence (excitation: 405 nm; emission 426–468 nm). Images corresponded to single confocal sections merged and false colored using ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Immunogold labelling was performed as previously reported (Oudin et al. 2007) on ultrathin sections disposed on carbon coated nickel grids. The protocol was essentially the same as for immunofluorescence except for primary antibodies that were diluted 1:5 and for the anti-Rat IgG-10nm gold (Aurion) diluted 1:50. Contrast was enhanced using UranylLess and sections were imaged with a HT7700 TEM (Hitachi) (Hitachi, www.hitachi-hightech.com) operated at 80 kV with a Gatan numeric camera (www.gatan.com). Gold particle density was counted for different cell wall domains directly on the digital images.

For PATAg staining, sections were floated on a 1% (w/v) aqueous solution of periodic acid for 30 min at room temperature, rinsed twice in distilled water for 2 h and treated overnight at 4°C with a 20% aqueous solution of acetic acid containing 0.2% thiocarbohydrazide. Sections were washed in solutions

of decreasing concentrations of acetic acid and finally in water, floated in a 1% (w/v) aqueous solution of silver proteinate for 30 min in the dark, washed in water and air-dried before observation. Images were obtained using a Hitachi-HT-7700 (Japan) transmission electron microscope operating at 80 kV.

Statistical Analysis

For Fig. 5, non-parametric statistical analyses were performed using Wilcoxon test in order to compare each time versus Control. A comparison was considered as statistically significant, if the pvalue is lower the threshold of 0.05 and so classified as *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.

Results

Identification of a hydathode-specific transcriptomic signature in healthy cauliflower leaves

In order to determine the differences in gene expression between cauliflower hydathodes and the mesophyll, we sequenced RNA (RNA-Seq) extracted from macro-dissected tissues enriched in hydathodes and mesophyll, sampled on the second true leaves of four weeks-old cauliflowers (Fig. 1A). Paired-end RNA sequencing (2×150 nucleotides) yielded a total number of reads per samples ranging from 23 to 31 million. Trim reads were mapped to the TO1000 *Brassica oleracea* reference genome (Parkin et al., 2014 http://plants.ensembl.org/Brassica_oleracea/Info/Annotation/). On average, 87% of these reads were mapped on the reference genome.

Evaluation of Euclidean distance between samples showed that hydathode and mesophyll samples clustered in distinct groups (Fig. 1B). A differential analysis identified more than four thousands differentially expressed genes (DEGs, 2054 up regulated and 2010 down-regulated) with an adjusted *P*-value below 0.001 and a \log_2 fold change (FC) higher than 0.5 or lower than -0.5 (Fig. 1C; Supplementary Table S1 at *JXB* online, Robinson and Oshlack, 2010). Among those, we identified 59 which are known markers of *Arabidopsis* hydathodes (Table S3), supporting the enrichment in hydathode tissues and the quality of the sampling. Altogether, these results indicate that cauliflower hydathodes express a specific gene set compared to the mesophyll.

Identification of enriched functional categories inside cauliflower hydathodes

To assign a putative function to these DEGs, the closest *Arabidopsis* homolog to the cauliflower DEGs were determined: 3115 cauliflower genes correspond to 2331 *Arabidopsis* genes. We then performed a Mapman enrichment analysis using the *Arabidopsis* homolog (Fig. 1D, Thimm *et al.*, 2004). Lower expression of DEG relevant to photosynthesis (51 out of 53 DEGs), sulfate assimilation (8 out of 8) or

redox-related genes (25 out of 33) was remarkable. On the other hand, DEG involved in mitochondrial electron transport genes (6 out of 7 DEGs) were more expressed in hydathode with an average \log_2FC of 1.4. PIN-FORMED auxin transporters homologs *BoPIN4*, 5 and 7 display a reduced expression in hydathodes, while genes coding for auxin biosynthesis, such as *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS (TAA1)* and *YUCCA (YUC) 4, 6, 9*, and the auxin regulators belonging to the *NGATHA (NGA)*, *SHORT INTERNODE (SHI)* or *STYLISH (STY)* families, were more expressed in hydathodes than in mesophyll. This suggests a higher synthesis and accumulation of this essential hormone in cauliflower hydathodes (Estornell et al., 2018).

The analysis also highlighted a specific subset of 235 transporter-related genes. One-hundred and seven transporters were more expressed in hydathodes and notably several copies of the *BoNRT2.1*, *BoNRT3.1* nitrate transporters and *BoKCI* potassium transporters. On the other hand, only *BoSULTR2.1*, out of nine sulfate transporters, was more expressed in hydathodes, which is in agreement with the lower expression of sulfate assimilation genes in hydathodes (Fig. 1D).

Eighty-two DEGs related to biotic stress were also more expressed in hydathodes than in mesophyll, with a mean \log_2FC of 0.8 (Supplementary Table S1). They encode, among others : three chitinases, one defensin, three NLR proteins, AIG2 (involved in plant resistance to bacteria; Wang *et al.*, 2009), BI-1 (Bax inhibitor-1, that functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death; Yue *et al.*, 2012), RLK7 (the receptor of PIP1, a plant peptide whose expression potentiates PTI responses, Hou *et al.*, 2014), BIK1 (RLCK BOTRYTIS-INDUCED KINASE 1), and BAK1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED KINASE 1, Ma *et al.*, 2020). On the other hand, cauliflower homologs of classical immune responsive genes such as FLS2 (flagellin receptor FLAGELLIN SENSING 2, Beck *et al.*, 2014), SID2 (involved in SA synthesis), PR1 and 2 (PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS), EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY) or PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 4) (Van Wersch *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2021) were not differentially expressed. Chitinase may also be expressed in the absence of pathogens (Samac et Shah, 1991). Altogether, these results indicate that hydathodes express defense-related genes at similar or higher levels than the mesophyll. It suggests that this organ could have the potential to mount significant immune responses upon infection.

Genes important for cell wall modifications are differentially expressed in hydathodes

We had a close look at the hundred DEGs from the “cell wall” GO term group and refined the annotation with available *Arabidopsis* references (Table 1). Though most of these genes belong to multigenic families, some observations and hypotheses can be formulated. The cellulose, hemicellulose and pectin biosynthesis toolbox genes were overall over-expressed in the hydathodes in agreement with the epithem being composed of young developing cells. The hemicellulose-related genes also encompassed several

over-expressed genes that could account for the synthesis of the xylan backbone and xylan substitutions that may be found in the secondary cell wall of the xylem tracheary elements. Interestingly, many DEGs encoded cell wall remodeling proteins. For instance, HG demethyl esterification necessitates the pectin methyltransferase (PME) activity that is counteracted by the PME inhibitor (PMEI) activity in a fine-tuned process (Driouich *et al.*, 2012). To refine the putative function of the subset of PME and PMEI, we performed an alignment based on their protein sequences. We found that six of these proteins possessed only the pectin esterase inhibitor domain (PFAM 04043; Supplementary Fig. S1). Among them, two PMEIs (Bo7g056250 and Bo8g063720) were more expressed in hydathodes. Eight proteins share both the pectin esterase domain (PFAM 01095) and the inhibitor domain, six of them being down-regulated in hydathodes. However, cumulated normalized counts showed a less contrasted profile (148 in hydathodes (H) vs 230 in mesophyll (M) for PMEIs and 154 in H vs 150 in M for PMEs) (Table 1; Supplementary Table S1). At last, two proteins containing only the pectinesterase domain and a pectin acetyltransferase were also less expressed in hydathode. It is also striking to notice that the pectin degradation toolbox is enriched in upregulated pectin lyases (PLs) (cumulated normalized counts: 173 in H vs 21 in M) and downregulated polygalacturonases (PGs) (cumulated normalized counts: 7 in H vs 16 in M) (Table 1; Supplementary Table S1). PLs and PGs are more specific to the highly methyl esterified and methyl esterified HG, respectively (Limberg *et al.*, 2000; van Alebeek *et al.*, 2002; Yadav *et al.*, 2009). Overall, the overexpression in hydathodes of the two PMEIs may inhibit most PMEs, leading to a higher proportion of methylated pectins in these organs that are more prone to degradation by PL enzymes.

Cell walls of hydathode cells are organized in different topochemical domains

In order to expand our transcriptomic analysis, we investigated cell wall composition and spatial organization within hydathodes. Cellulose was stained with calcofluor revealing the general organization of the organ (Fig. 2A; Cerutti *et al.*, 2017). The calcofluor staining intensity was notably lower in the epithem cell wall compared to the neighbouring cortical parenchyma (Fig. 2B). We also observed a high calcofluor staining associated to the secondary cell wall xylem ornamentations of the vessels irrigating the epithem and a thin staining line between these ornamentations (Fig. 2C). Using the metachromatic properties of toluidine blue to stain polysaccharides, we observed a dark blue staining associated with the epithem cell walls and with primary wall domains located at the basis of the xylem ornamentations (Fig. 2D). The secondary wall of xylem ornamentations was stained in a lighter blue. Vascular elements from macerated hydathode-enriched samples were all composed of short vessels with helical ornamentations indicative of the high resistance of xylem ornamentations to degradation (Fig. 2E). Finally, the primary walls of the epithem cells were not or lightly Uranyl-contrastrated when observed by transmission electron microscopy of hydathode sections (Fig. 2F). We observed that a small

primary wall domain area at the basis of the xylem ornamentations (dashed arrows) exhibited the same feature while the secondary wall xylem ornamentations were more electron dense. In all samples, we observed large intercellular spaces (up to 4-5 μm) between epithem cells. The hydathode hence appears as an organ open to the outside, through small, thin and spaced epithem cells and linked to the inside through vessel element terminations. These epithem cells were in direct contact with leaf veins since the primary walls of the vessel elements appeared as a loosened packed matrix underneath and between the vessel secondary wall ornamentations. Differences in staining also suggested different structural and/or biochemical cell wall domains, i.e. in the epithem and in the tracheary elements connected to it.

Xylan and arabinoxylan hemicelluloses are only detected in the secondary cell wall ornamentation of the vessel elements.

To further document the difference in cell wall component within the hydathodes, we used specific monoclonal antibodies to visualize, by immunofluorescence microscopy, the distribution of the main non-cellulosic polysaccharides. We first used three monoclonal antibodies LM10, LM11 and LM28 to localize cell wall xylans (Fig. 3A-C). LM10 is specific to unsubstituted or low-substituted xylans while LM11 binds to arabinoxylan (from wheat) in addition to unsubstituted xylans (McCartney *et al.*, 2005). LM28 binds strongly to birch wood xylan, maize kernel and oat spelt glucuronoxyylan. (Pedersen *et al.*, 2012; Cornuault *et al.*, 2015). In cauliflower hydathodes, both LM10 and LM11 epitopes were restricted to the ornamentations of the vessel elements (Fig. 3A-B). Using these two antibodies, we detected no labelling in the primary walls of epithem, epidermis or vessel elements, in agreement with the restriction of xylans and arabinoxylans in the secondary cell walls. No labelling was detected using the LM28 (Fig. 3C) whatever the cell wall types, including the cell wall ornamentations. That suggests the absence or a low and undetectable amount of glucuronoxyylan in the hydathodes and leaf veins.

Xyloglucan hemicellulose are distributed in the epidermal, the epithem cell walls and the vessel element primary walls

We then detected xyloglucans with three additional monoclonal antibodies, LM25, LM24 and LM15 (Fig. 3D-I). LM25 recognizes a range of xyloglucan-specific oligosaccharides motifs including xylosylated/galactosylated oligosaccharides from tamarind xyloglucan. LM24 binds preferentially to the galactosylated oligosaccharides motifs, whereas LM15 binds to the XXXG motif of xyloglucan and can accommodate to some extent a single galactosyl residue. The presence of two galactosyl residues prevents recognition of the xyloglucan oligosaccharides by LM15, although one galactosyl residue was more readily tolerated (Marcus *et al.*, 2008; Pedersen *et al.*, 2012). LM25 binding sites were localized

to the primary wall of epidermis, epithem and vessel elements but were not detected in the xylem secondary wall ornamentations (Fig. 3D-F). No immunolabeling was detected with LM24 (Fig. 3G). Finally, the LM15 binding sites were associated to the primary cell walls of the vessels and to some epithem cells (Fig. 3H-I). These results suggested that xyloglucans of the hydathode epithem and primary vessel element cell walls were mainly substituted by xylosyl residues with few additional galactosyl residues.

Methyl-esterified homogalacturonan (HG) pectins but not de-methylesterified HGs are labelled in the hydathodes

Finally, we used five monoclonal antibodies, LM20, LM19, LM18, JIM7 and JIM5 to detect pectic homogalacturonans (HGs) and two antibodies, LM5 and LM6 to detect pectic rhamnogalacturonan I (Fig. 3J-O). HGs are the major constituent of pectin representing around 65% of pectins of *Arabidopsis* leaves (Mohnen, 2008). They consist of (1,4)- α -linked galacturonosyl residues that are synthesized in a methyl-esterified form. Specific acidic HG demethyl esterification patterns are finely tuned *in muro* through the concerted action of pectin methylesterases (PMEs) and PME inhibitors (PMEIs) multigenic family members. LM20 and JIM7 preferentially bind to partially methyl-esterified HGs. They do not bind to de-esterified cell wall polysaccharides. In contrast, LM19, LM18 and JIM5 preferentially bind to de-esterified HG domains (Verhertbruggen *et al.*, 2009). Moreover, LM5 and LM6 detect lateral galactan and arabinan chains of pectic RGI. LM5 recognizes linear tetra-saccharide in (1-4)- β -D galactans. There is no cross reactivity with (1-3)- β -D-galactans or (1-6)- β -D-galactans (Jones *et al.*, 1997). LM6 recognizes a penta-saccharide in (1-5)- α -L-arabinans. LM6 may additionally recognize the same arabinan motif found in arabinogalactan proteins (AGPs) in some plant species (Willats *et al.*, 1998). In the hydathodes, the binding sites of LM20 and JIM7 were associated to the contours of all the cell types except the xylem ornamentations (Fig. 3J-L). No labelling was detected with LM19 (Fig. 3M) LM18 and JIM5 (not shown) indicating the absence of detection of de-methylesterified HGs in the hydathodes. However, these antibodies displayed a labelling of the epidermal cell walls outside of the hydathodes including the leaf blade, the petiole and the internode (not shown). Therefore, the absence of labeling of unesterified HG appeared as a distinctive mark of the hydathode epidermis. Both LM5 and LM6 binding sites were mainly located in epithem primary cell walls along the vessel elements (Fig. 3N-O).

Immuno-gold labeling reveals pectins and xyloglucan in primary wall domains located below and between xylem secondary wall ornamentations, respectively.

We used immunogold and electron microscopy to decipher the topochemical distribution of methylated HGs with JIM7 and xyloglucans with LM25 in the primary wall domains of the vessel elements and epithem cells (Fig. 4). JIM7 binding sites were mainly associated with the primary cell walls of the

epithem cells and vessel elements at the basis of the xylem secondary wall ornamentations (Fig. 4A-B). In contrast, JIM7 was poorly associated with the loosened primary wall matrix between the xylem ornamentations. Using LM25, few gold particles were located in the primary cell walls of the epithem cells and within the primary wall matrix between the xylem ornamentations, and almost no labeling was detected in the primary wall domain below the secondary wall xylem ornamentations (Fig. 4C-D).

During *Xcc* infection, pectins are degraded before xyloglucans

Beyond the relevance of our results to better understand the physiological status of the hydathodes, the ultrastructure and topochemistry of the different cell wall domains of these peculiar organs may also be an avenue for pathogens. As previously shown, *Xcc* bacteria use the large intercellular spaces between epithem cells to find their route towards the vessel elements where they gather as soon as 3 dpi (Cerutti *et al.*; 2017). At 6 dpi, along a vessel, numerous points of bacterial-penetration, due to the degradation of wall compounds between xylem ornamentations, are clearly visible. Immunogold labeling were performed on these samples and gold particles density was quantified in different wall domains, *i.e.* the epithem primary cell wall (e-cw), the vessel element primary cell wall (v-cw) located between the xylem ornamentations and finally, the vessel primary wall attachment zone (az) of the xylem secondary wall ornamentations (Fig. 5A). We used JIM7 (Fig. 5B) and LM25 (Fig. 5C) to detect the partially methylated HG pectins and the xyloglucan hemicellulose epitopes, respectively, during the time course of early infection (*i.e.*, 0, 3 and 6 dpi). Compared to the uninfected control, at 3 dpi, the pectin JIM7 labeling density decreased mainly in the epithem cell walls and the attachment zones of the xylem ornamentations, while the xyloglucan LM25 labeling was unchanged. At 6 dpi, the labeling of xyloglucans associated to the vessel cell walls, and to a lesser extent to the epithem cell wall, significantly decreased.

Discussion

Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) is a close relative of the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis* remains the best-annotated plant genome and a valuable wealth of information for the annotation of cauliflower. However, the *Brassica* genomes experienced a whole genome triplication event (WGT) since its divergence from the *Arabidopsis* lineage. This WGT was followed by massive gene losses and frequent reshuffling of triplicated genomic blocks that resulted in multiple possible homologs for one *Arabidopsis* gene that may hinder the functional annotation (Liu *et al.*, 2014). Two very recent studies (Yagi *et al.*, 2020 and Kim *et al.*, 2021) identified 167 *Arabidopsis* genes specific to hydathodes (Supplementary Table S2 and S3). Out of the 69 and 98 hydathode related genes found in these two studies, 47 and 33 respectively were shared with our analysis. 40 and 31 of them were similarly more expressed in hydathodes in our study (85 and 94% respectively against 0 and 21% for the

mesophyll subset, see Supplementary Table S2 and S3). Some cauliflower hydathode expressed genes were also attributed to other cell type such as the epidermis and the guard cell subsets (53 and 63% of Cauliflower and *Arabidopsis* homolog commons genes respectively; Kim *et al.*, 2021). It suggests that hydathodes, epidermis and guard cells may share common developmental regulatory origins or have interconnected regulatory programs (Pilliteri *et al.*, 2008; Torii *et al.*, 2021). However, mechanisms regulating hydathode pores spacing could be different from those of stomata (Pilliteri and Dong, 2013). Overall, these comparisons show that our RNA-seq analysis successfully identified genes that are more expressed in cauliflower hydathodes and will improve our knowledge about hydathode functions.

Among the *Arabidopsis* genes related to hydathodes, Yagi and collaborators and Kim and collaborators highlighted *Arabidopsis* gene related to biotic stress (chitinases), auxin metabolism (YUCCA 4, STYLISH1 and 2), nitrate, phosphate, sulfate, sucrose or peptides transports (NPFs, YSL1, SUC1, SULTR1;2, PUP1), and cell wall degradation/remodeling genes (Polygalacturonases or PMEIs). Our study provides a larger insight into the molecular bases of hydathodes physiology, using cauliflower as a model. We first confirm and extend the importance of auxin metabolism in hydathodes: most genes involved in cauliflower auxin biosynthesis and regulation, including many YUCCA genes but also the first committed steps of auxin synthesis TAA1, are upregulated in hydathodes compared to the mesophyll. Moreover, several PIN related transporters are down regulated in hydathodes. These observations are in agreement with the hypothesis of a higher accumulation of auxin in hydathodes (Aloni *et al.*, 2003). This is also supported by the overexpression, in cauliflower hydathodes, of numerous copies of auxin biosynthesis regulators belonging to the STYLISH, NGA or TCP families and by differential expression of many auxin signaling genes belonging to the AUX-IAA, ARF and SAUR (Small Auxin Responsive SAUR) families. Since auxin seems to play a role during xylem formation, it may also explain the very dense atypical delta shape structure of the xylem irrigating the epithem (Aloni *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2006, 2007; Kondo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

It has been proposed that hydathodes recycle metabolites from the xylem sap to prevent excessive loss of valuable nutrients into the guttation fluid (Perrin, 1972; Pilot *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2013; Bailey and Leegood, 2016). One hundred and seventeen transporter genes were upregulated in hydathodes. Among the most differentially expressed homologs are several copies of nitrate transporter *BoNRT2.1* and *BoNRTT3.1*, phosphate transporter *BoPHT1.9* and potassium channel *BoKC1*. These results are in agreement with the expression of many *Arabidopsis*, rice and barley transporter gene orthologs in hydathodes and the observation that metabolites are generally less concentrated in the guttation fluid than in the xylem sap (Pilot *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2013; Bailey and Leegood, 2016). This is also in agreement with the observation that the transport systems involved in uptake of inorganic phosphate (Pi), sulfur or nitrogen in *Xanthomonas* were upregulated at 72 hours after infection showing that *Xcc* faces Pi, sulfur or nitrate starvation occurring inside hydathodes (Moreira *et al.*, 2015).

A very distinctive feature of hydathodes is the highly vascularized tissue called the epithem, present around the cavity that lies below the water pores (Cerutti *et al.*, 2017). The epithem is composed of

smaller cells that are loosely connected. Enlarged intercellular spaces are often observed in between these particular parenchyma cells. In plants, the structural integrity of tissues and organs depends on the middle lamella that prevents the cells from separating or sliding against each other. The middle lamella is an extracellular matrix rich in pectins and structural proteins that acts as a glue between the walls of two adjacent cells (Zamil and Geitmann, 2017). Defects in biosynthesis of homogalacturonan pectins (HG) result in loss of cell adhesion in hypocotyls and leaves mutants thus showing that HG are indeed important for cell to cell adhesion (Bouton *et al.*, 2002; Mouille *et al.*, 2007). Interestingly, we observed a strong labelling of epithem primary cell wall with JIM7 and LM20 targeting partially methyl esterified HG. However, in the same zones there was no labeling with JIM5 and LM19, which are specific to more demethyl esterified HG. Several families of pectinases, classified according to their substrates specificity or mode of action, may degrade pectins : pectin esterases (EC 3.1.1.11), polygalacturonases (EC 3.2.1.15), pectate lyases (EC 4.2.3.2) and pectin lyases (EC 1.4.2.10). Pectin esterases remove methoxyl and acetyl residues of polygalacturonic acids. Polygalacturonases (PG) hydrolyse the glycosidic bonds between galacturonic acid residues (Ogawa *et al.*, 2009; Rhee *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2010; Rui *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2021). Pectate lyases cleave pectate and are capable of degrading pectin polymers directly without methanol production (Limberg *et al.*, 2000; van Alebeek *et al.*, 2002; Yadav *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2012). The cell wall biosynthesis and remodeling genes are widely represented among the DEGs. HG is synthesized in a highly methyl esterified form in the Golgi apparatus and may be demethyl esterified in the wall by PME (Driouich *et al.*, 2012). The global down-regulation of PMEs by the two PME inhibitors overexpressed in cauliflower hydathodes might accounts for the relatively high methyl esterification status observed with LM20/JIM7. The large number of PME and PMEI with distinct expressions and regulations suggest temporal and spatial fine control of pectin methylation (Liu *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2018). Furthermore, HG demethyl esterification also favors the formation of Ca²⁺-pectate that connects adjacent cells, produces specific anchoring platforms for additional cell wall remodeling enzymes (Francoz *et al.*, 2019) and determines whether HGs become susceptible to degradation by other enzymes, including pathogen ones. There is also an impressive enrichment of overexpressed pectin lyase genes in the hydathodes. These enzymes are more prone to hydrolyze relatively highly methyl esterified homogalacturonan (HG), which is in agreement with the relatively high methyl esterification patterns observed in hydathodes with the LM20/JIM17 immunolabeling. Both the relatively high methyl esterified level of pectins observed with immunolabeling and suggested by transcriptomic and the fragmentation by PLs, suggested by transcriptomics, may explain the relatively loosened primary cell wall domains observed between epithem cells and below the xylan- and lignin-containing reinforced vessel ornamentations. A tempting interpretation to combined the immunolabeling and ultrastructural observations of the epithem cell wall domains and the DEG pattern would be to consider that the JIM7/LM20 reactivity is linked to the poor demethyl esterification of HG thanks to the downregulation of several PMEs by PME inhibitors. This in turn may prevent methylated pectins from adjacent cell walls to connect through calcium bridges. Pectin methylation also provides

the substrate for HG fragmentation by the overall overexpressed PLs. This may ultimately lead to the many ultra destructured loosened cell wall domains observed in the hydathodes epithem and vessel elements. This remodeling and degradation of vessel wall domains may facilitate a more direct water flow from the vessel, to the pores via the epithem.

These peculiar structural features may also offer direct access for pathogenic bacteria such as *Xanthomonas (Xcc)*. *Xcc* is a vascular pathogen that preferentially penetrate inside the plant leaves through hydathodes. Microscopy observations have shown that the route to the vessel elements is likely more or less free due to the numerous intercellular spaces within the epithem (Cerutti *et al.*, 2017). However, little is known about the composition of the cell walls degraded by *Xcc* bacteria to reach and penetrate the vessel elements. We observed that *Xcc* enlarged spaces between epithem cells and formed new spaces in contact with the vessel elements. These vessel elements are helicated and the distance between xylem ornamentations is more than 2 μm , allowing easy passage for much smaller bacteria. However, to penetrate the vessel, *Xcc* has to degrade the primary wall domains between or below the ornamentations that are heavily protected by the deposition of lignins and xylans. It is worth noting that both lignin and flavonoid biosynthesis were upregulated in hydathodes (Supplementary Fig. S1). During infection, *Xcc* first degraded pectins, located in the loosened primary cell wall domain of epithem and in the attachment zone below the vessel ornamentations. In both cases, pectins could be pre-fragmented by the plant PLs. As a result, at 3 dpi, we observed the enlargement of intercellular spaces, the detachment of the epithem primary cell walls along the vessel elements and an accumulation of *Xcc* bacteria in these spaces. Then, at 6 dpi, xyloglucans of the primary wall domain located between the vessel ornamentation were degraded and we observed ruptures of the wall between xylem ornamentations and numerous bacteria inside the vessels.

Methylation of pectin appears to be a general plant mechanism to increase resistance to diseases (Lionetti *et al.*, 2012; Bellincampi *et al.*, 2014). Biotechnological approaches to reduce PME activity through the constitutive expression of PMEs enhanced plant resistance to fungal, bacterial, and viral pathogens (Lionetti *et al.*, 2007; Lionetti and Métraux, 2014, 2017; Raiola *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2018; An *et al.*, 2020). This was associated with the low susceptibility of highly methyl esterified pectins to pectate lyases and polygalacturonases secreted by pathogens (Herron *et al.*, 2000; Lionetti *et al.*, 2012; Bethke *et al.*, 2016). The question then arises: which tools bacteria need to degrade methylated pectins? Bacteria and fungi secrete degrading enzymes that hydrolyze plant cell wall components (Lionetti *et al.*, 2015; An *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2021). Transcriptome analysis of *Xcc* gene expression during infection in hydathodes showed the overexpression between 2 to 5 folds of a combination of cell wall degrading enzymes, at 3DPI compared to 4 hour after infection (Luneau *et al.*, in press). On this line, the generation of *Xanthomonas* mutants affected in a pectin methyltransferase, two pectate lyases (*pel* and *pelL*), a polygalacturonase (*pglA*), a xylanase or a cellobiosidase have shown that only cellobiosidase, polygalacturonase and xylanase were necessary for vascular infection in rice (Rajeshwari *et al.*, 2007; Tayi *et al.*, 2016, 2018; Gluck-Thaler *et al.*, 2020). The critical importance of cellobiosidase for vascular

pathogen infection has recently been emphasized in rice with the observation that vascular pathogen genomes contained CbsA cellobiosidase but most nonvascular pathogen did not (Gluck-Thaler *et al.*, 2020). This cellobiosidase could degrade the cell wall directly, allowing pathogen entrance into the vessels and/or provide a nutrient source by the release of cellobiose from cellulose (Gluck-Thaler *et al.*, 2020). Since, genome wide transcriptional profiling also shows that *Arabidopsis* PME and PMEIs are expressed in response to pathogens (Lionetti *et al.*, 2012; Windram *et al.*, 2012). It thus tempting to speculate that degradation of cell walls occurs synergistically via the concomitant action of secreted depolymerizing enzymes (cellobiosidase, polygalacturonase, xylanase). In addition, induction of plant pectin methyl esterases could make the plants more susceptible or facilitate access of these microbe-degrading enzymes to cell wall components.

Overall, our immunolabeling data shows that cauliflower hydathodes display an architecture and tissue types that are clearly distinct from the rest of the leaf. These peculiarities are supported by a transcriptomic profile that also distinguishes hydathodes from mesophyll. Transcriptomic analysis also highlights functions that are not solely important for hydathodes but also for the entire plant, such as auxin synthesis, metabolite transport or cell wall architecture. Characteristics of hydathode cell wall domains are i) the presence of partially methylated HG pectins, ii) the higher expression of cell wall synthesis genes and iii) the finely tune expression of degrading enzymes. All these features may explain the small, loosely connected epithem cells and some of the successful invading strategies of pathogens such as *Xanthomonas*. Indeed, these observations await validation. Switching to the *Arabidopsis* model is a promising alternative: mutants affected in these hydathode functions are available. We will also use these mutants to determine to what extent hydathode peculiarities may facilitate or prevent pathogen infection.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche NEPHRON project (ANR-18-CE20-0020-01). LIPME and LRSV are part of the French Laboratory of Excellence project (TULIP ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

Author contributions

JMR, AJ, VB, LN conceived the study, supervised experiments and wrote the manuscript with contributions from all co-authors; EL, MCA, MA performed experiments; AJ, VB, CB, JMR performed and analyzed the experiments; CB, MFJ, SC performed annotation and statistics on transcriptomic data.

Data availability statement

All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Sequence read archive accession numbers for RNAseq libraries are openly available: SRP322419 (SRR14714538 to SRR14714543).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

References

- van Alebeek G-JWM, Christensen TMIE, Schols HA, Mikkelsen JD, Voragen AGJ** (2002) Mode of action of pectin lyase A of *Aspergillus niger* on differently C(6)-substituted oligogalacturonides. *J Biol Chem* **277**: 25929–25936
- Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich CI** (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* **216**: 841–853
- Alvarez JP, Goldshmidt A, Efroni I, Bowman JL, Eshed Y** (2009) The NGATHA Distal Organ Development Genes Are Essential for Style Specification in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 1373–1393
- An S-Q, Potnis N, Dow M, Vorhölter F-J, He Y-Q, Becker A, Teper D, Li Y, Wang N, Bleris L, et al** (2020) Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews* **44**: 1–32
- Atmodjo MA, Sakuragi Y, Zhu X, Burrell AJ, Mohanty SS, Atwood JA, Orlando R, Scheller HV, Mohnen D** (2011) Galacturonosyltransferase (GAUT)1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan:galacturonosyltransferase complex. *PNAS* **108**: 20225–20230
- Bailey KJ, Leegood RC** (2016) Nitrogen recycling from the xylem in rice leaves: dependence upon metabolism and associated changes in xylem hydraulics. *J Exp Bot* **67**: 2901–2911
- Baylis T, Cierlik I, Sundberg E, Mattsson J** (2013) SHORT INTERNODES/STYLISH genes, regulators of auxin biosynthesis, are involved in leaf vein development in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **197**: 737–750
- Beck M, Wyrsh I, Strutt J, Wimalasekera R, Webb A, Boller T, Robatzek S** (2014) Expression patterns of flagellin sensing 2 map to bacterial entry sites in plant shoots and roots. *J Exp Bot* **65**: 6487–6498
- Bellincampi D, Cervone F, Lionetti V** (2014) Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Front Plant Sci* **5**: 228
- Bethke G, Grundman RE, Sreekanta S, Truman W, Katagiri F, Glazebrook J** (2014) *Arabidopsis* PECTIN METHYLESTERASEs contribute to immunity against *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol* **164**: 1093–1107

Bethke G, Thao A, Xiong G, Li B, Soltis NE, Hatsugai N, Hillmer RA, Katagiri F, Kliebenstein DJ, Pauly M, et al (2016) Pectin Biosynthesis Is Critical for Cell Wall Integrity and Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **28**: 537–556

Blanvillain S, Meyer D, Boulanger A, Lautier M, Guynet C, Denancé N, Vasse J, Lauber E, Arlat M (2007) Plant carbohydrate scavenging through tonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS One* **2**: e224

Bouton S, Leboeuf E, Mouille G, Leydecker M-T, Talbotec J, Granier F, Lahaye M, Höfte H, Truong H-N (2002) QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 2577–2590

Braidwood L, Breuer C, Sugimoto K (2014) My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytologist* **201**: 388–402

Bromley JR, Busse-Wicher M, Tryfona T, Mortimer JC, Zhang Z, Brown DM, Dupree P (2013) GUX1 and GUX2 glucuronyltransferases decorate distinct domains of glucuronoxylan with different substitution patterns. *The Plant Journal* **74**: 423–434

Brown DM, Zeef LAH, Ellis J, Goodacre R, Turner SR (2005) Identification of Novel Genes in *Arabidopsis* Involved in Secondary Cell Wall Formation Using Expression Profiling and Reverse Genetics. *The Plant Cell* **17**: 2281–2295

Cao J (2012) The Pectin Lyases in *Arabidopsis thaliana*: Evolution, Selection and Expression Profiles. *PLOS ONE* **7**: e46944

Cao Y, Zhang Y, Chen Y, Yu N, Liaqat S, Wu W, Chen D, Cheng S, Wei X, Cao L, et al (2021) OsPG1 Encodes a Polygalacturonase that Determines Cell Wall Architecture and Affects Resistance to Bacterial Blight Pathogen in Rice. *Rice (N Y)* **14**: 36

Carlton WM, Braun EJ, Gleason ML (1998) Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into Tomato Leaves Through Hydathodes. *Phytopathology* **88**: 525–529

Cerutti A, Jauneau A, Auriac M-C, Lauber E, Martinez Y, Chiarenza S, Leonhardt N, Berthomé R, Noël LD (2017) Immunity at Cauliflower Hydathodes Controls Systemic Infection by *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *Plant Physiol* **174**: 700–716

Cerutti A, Jauneau A, Laufs P, Leonhardt N, Schattat MH, Berthomé R, Routaboul J-M, Noël LD (2019) Mangroves in the Leaves: Anatomy, Physiology, and Immunity of Epithelial Hydathodes. *Annu Rev Phytopathol* **57**: 91–116

Chen J, Chen X, Zhang Q, Zhang Y, Ou X, An L, Feng H, Zhao Z (2018) A cold-induced pectin methyl-esterase inhibitor gene contributes negatively to freezing tolerance but positively to salt tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* **222**: 67–78

Cheng Y, Dai X, Zhao Y (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **20**: 1790–1799

Cheng Y, Dai X, Zhao Y (2007) Auxin Synthesized by the YUCCA Flavins Monooxygenases Is Essential for Embryogenesis and Leaf Formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 2430–2439

Chiniquy D, Underwood W, Corwin J, Ryan A, Szemenyei H, Lim CC, Stonebloom SH, Birdseye DS, Vogel J, Kliebenstein D, et al (2019) PMR5, an acetylation protein at the intersection of pectin biosynthesis and defense against fungal pathogens. *The Plant Journal* **100**: 1022–1035

Cornuault V, Buffetto F, Rydahl MG, Marcus SE, Torode TA, Xue J, Crépeau M-J, Faria-Blanc N, Willats WGT, Dupree P, et al (2015) Monoclonal antibodies indicate low-abundance links between heteroxylan and other glyicans of plant cell walls. *Planta* **242**: 1321–1334

Corpo DD, Fullone MR, Miele R, Lafond M, Pontiggia D, Grisel S, Kieffer-Jaquinod S, Giardina T, Bellincampi D, Lionetti V (2020) AtPME17 is a functional *Arabidopsis thaliana* pectin methylesterase regulated by its PRO region that triggers PME activity in the resistance to *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* **21**: 1620–1633

Cosgrove DJ (2018) Nanoscale structure, mechanics and growth of epidermal cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* **46**: 77–86

Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 850–861

Cosio C, Ranocha P, Francoz E, Burlat V, Zheng Y, Perry SE, Ripoll J-J, Yanofsky M, Dunand C (2017) The class III peroxidase PRX17 is a direct target of the MADS-box transcription factor AGAMOUS-LIKE15 (AGL15) and participates in lignified tissue formation. *New Phytol* **213**: 250–263

Daniels MJ (1984) Molecular biology of bacterial plant pathogens. *Microbiol Sci* **1**: 33–36

Driouich A, Follet-Gueye M-L, Bernard S, Kousar S, Chevalier L, Vicré M, Lerouxel O (2012) Golgi-Mediated Synthesis and Secretion of Matrix Polysaccharides of the Primary Cell Wall of Higher Plants. *Front Plant Sci*. doi: [10.3389/fpls.2012.00079](https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00079)

Ebert B, Birdseye D, Liwanag AJM, Laursen T, Rennie EA, Guo X, Catena M, Rautengarten C, Stonebloom SH, Gluza P, et al (2018) The Three Members of the *Arabidopsis* Glycosyltransferase Family 92 are Functional β -1,4-Galactan Synthases. *Plant and Cell Physiology* **59**: 2624–2636

Eklund DM, Thelander M, Landberg K, Ståldal V, Nilsson A, Johansson M, Valsecchi I, Pederson ERA, Kowalczyk M, Ljung K, et al (2010) Homologs of the *Arabidopsis thaliana* SHI/STY/LRP1 genes control auxin biosynthesis and affect growth and development in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* **137**: 1275–1284

Estornell LH, Landberg K, Cierlik I, Sundberg E (2018) SHI/STY Genes Affect Pre- and Post-meiotic Anther Processes in Auxin Sensing Domains in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*. doi: [10.3389/fpls.2018.00150](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00150)

Fagard M, Desnos T, Desprez T, Goubet F, Refregier G, Mouille G, McCann M, Rayon C, Vernhettes S, Höfte H (2000) PROCUSTE1 encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 2409–2424

Femenia A, Selvendran RR, Ring SG, Robertson JA (1999) Effects of heat treatment and dehydration on properties of cauliflower fiber. *J Agric Food Chem* **47**: 728–732

- Francoz E, Ranocha P, Le Ru A, Martínez Y, Fourquaux I, Jauneau A, Dunand C, Burlat V** (2019) Pectin Demethylesterification Generates Platforms that Anchor Peroxidases to Remodel Plant Cell Wall Domains. *Developmental Cell* **48**: 261-276.e8
- Garay-Arroyo A, Ortiz-Moreno E, de la Paz Sánchez M, Murphy AS, García-Ponce B, Marsch-Martínez N, de Folter S, Corvera-Poiré A, Jaimes-Miranda F, Pacheco-Escobedo MA, et al** (2013) The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating PIN expression. *EMBO J* **32**: 2884–2895
- Gluck-Thaler E, Cerutti A, Perez-Quintero AL, Butchacas J, Roman-Reyna V, Madhavan VN, Shantharaj D, Merfa MV, Pesce C, Jauneau A, et al** (2020) Repeated gain and loss of a single gene modulates the evolution of vascular plant pathogen lifestyles. *Science Advances* **6**: eabc4516
- Gonneau M, Desprez T, Guillot A, Vernhettes S, Höfte H** (2014) Catalytic Subunit Stoichiometry within the Cellulose Synthase Complex1[W]. *Plant Physiol* **166**: 1709–1712
- Günl M, Neumetzler L, Kraemer F, de Souza A, Schultink A, Pena M, York WS, Pauly M** (2011) AXY8 Encodes an α -Fucosidase, Underscoring the Importance of Apoplastic Metabolism on the Fine Structure of *Arabidopsis* Cell Wall Polysaccharides. *The Plant Cell* **23**: 4025–4040
- Harholt J, Suttangkakul A, Vibe Scheller H** (2010) Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol* **153**: 384–395
- Herron SR, Benen JAE, Scavetta RD, Visser J, Journak F** (2000) Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8762–8769
- Hewezi T, Howe P, Maier TR, Hussey RS, Mitchum MG, Davis EL, Baum TJ** (2008) Cellulose Binding Protein from the Parasitic Nematode *Heterodera schachtii* Interacts with *Arabidopsis* Pectin Methylesterase: Cooperative Cell Wall Modification during Parasitism. *Plant Cell* **20**: 3080–3093
- Hill JL, Hammudi MB, Tien M** (2014) The *Arabidopsis* Cellulose Synthase Complex: A Proposed Hexamer of CESA Trimers in an Equimolar Stoichiometry. *The Plant Cell* **26**: 4834–4842
- Hou S, Wang X, Chen D, Yang X, Wang M, Turrà D, Di Pietro A, Zhang W** (2014) The secreted peptide PIP1 amplifies immunity through receptor-like kinase 7. *PLoS Pathog* **10**: e1004331
- Hou Y, Ma W** (2020) Natural Host-Induced Gene Silencing Offers New Opportunities to Engineer Disease Resistance. *Trends Microbiol* **28**: 109–117
- Hugouvieux V, Barber CE, Daniels MJ** (1998) Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 537–543
- Iglesias N, Abelenda JA, Rodiño M, Sampedro J, Revilla G, Zarra I** (2006) Apoplastic Glycosidases Active Against Xyloglucan Oligosaccharides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**: 55–63
- Jauneau A, Cerutti A, Auriac M-C, Noël LD** (2020) Anatomy of leaf apical hydathodes in four monocotyledon plants of economic and academic relevance. *PLoS One* **15**: e0232566

Jones L, Seymour GB, Knox JP (1997) Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1[->]4)-[beta]-D-Galactan. *Plant Physiol* **113**: 1405–1412

Kim J, Shiu S-H, Thoma S, Li W-H, Patterson SE (2006) Patterns of expansion and expression divergence in the plant polygalacturonase gene family. *Genome Biol* **7**: R87

Kim J-Y, Symeonidi E, Pang TY, Denyer T, Weidauer D, Bezruczyk M, Miras M, Zöllner N, Hartwig T, Wudick MM, et al (2021) Distinct identities of leaf phloem cells revealed by single cell transcriptomics. *The Plant Cell*. doi: [10.1093/plcell/koaa060](https://doi.org/10.1093/plcell/koaa060)

Kondo Y, Tamaki T, Fukuda H (2014) Regulation of xylem cell fate. *Front Plant Sci*. doi: [10.3389/fpls.2014.00315](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00315)

Lee C, Zhong R, Richardson EA, Himmelsbach DS, McPhail BT, Ye Z-H (2007) The PARVUS Gene is Expressed in Cells Undergoing Secondary Wall Thickening and is Essential for Glucuronoxylan Biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* **48**: 1659–1672

Lewis S, Goodman RN (1966) The Glandular Trichomes, Hydathodes and Lenticels of Jonathan Apple and Their Relation to Infection by *Erwinia amylovora*. *Journal of Phytopathology* **55**: 352–358

Li L-S, Ying J, Li E, Ma T, Li M, Gong L-M, Wei G, Zhang Y, Li S (2021) Calmodulin-Binding Protein 60b is a central transcriptional activator of immunity. *Plant Physiol*. doi: [10.1093/plphys/kiab164](https://doi.org/10.1093/plphys/kiab164)

Limberg G, Körner R, Buchholt HC, Christensen TM, Roepstorff P, Mikkelsen JD (2000) Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. *Carbohydr Res* **327**: 293–307

Lionetti V, Cervone F, Bellincampi D (2012) Methyl esterification of pectin plays a role during plant–pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *Journal of Plant Physiology* **169**: 1623–1630

Lionetti V, Fabri E, Caroli MD, Hansen AR, Willats WGT, Piro G, Bellincampi D (2017) Three Pectin Methyltransferase Inhibitors Protect Cell Wall Integrity for *Arabidopsis* Immunity to Botrytis. *Plant Physiology* **173**: 1844–1863

Lionetti V, Métraux J-P (2014) Plant cell wall in pathogenesis, parasitism and symbiosis. *Front Plant Sci*. doi: [10.3389/fpls.2014.00612](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00612)

Lionetti V, Raiola A, Camardella L, Giovane A, Obel N, Pauly M, Favaron F, Cervone F, Bellincampi D (2007) Overexpression of Pectin Methyltransferase Inhibitors in *Arabidopsis* Restricts Fungal Infection by Botrytis cinerea. *Plant Physiol* **143**: 1871–1880

Lionetti V, Raiola A, Cervone F, Bellincampi D (2013) Transgenic expression of pectin methyltransferase inhibitors limits tobamovirus spread in tobacco and *Arabidopsis*. *Mol Plant Pathol* **15**: 265–274

Lionetti V, Raiola A, Mattei B, Bellincampi D (2015) The Grapevine VvPME11 Gene Encodes a Novel Functional Pectin Methyltransferase Inhibitor Associated to Grape Berry Development. *PLoS One*. doi: [10.1371/journal.pone.0133810](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133810)

- Liu N, Sun Y, Pei Y, Zhang X, Wang P, Li X, Li F, Hou Y** (2018a) A Pectin Methylesterase Inhibitor Enhances Resistance to *Verticillium Wilt*1[OPEN]. *Plant Physiol* **176**: 2202–2220
- Liu S, Liu Y, Yang X, Tong C, Edwards D, Parkin IAP, Zhao M, Ma J, Yu J, Huang S, et al** (2014) The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nat Commun*. doi: [10.1038/ncomms4930](https://doi.org/10.1038/ncomms4930)
- Liu T, Yu H, Xiong X, Yu Y, Yue X, Liu J, Cao J** (2018b) Genome-Wide Identification and Characterization of Pectin Methylesterase Inhibitor Genes in *Brassica oleracea*. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 3338
- Luneau JS, Cerutti A, Roux B, Carrère S, Jardinaud M-F, Gaillac A, Gris C, Lauber E, Berthomé R, Arlat M, et al** (2021) *Xanthomonas* transcriptome inside cauliflower hydathodes reveals bacterial virulence strategies and physiological adaptation at early infection stages. 2021.01.19.427230
- Ma X, Claus LAN, Leslie ME, Tao K, Wu Z, Liu J, Yu X, Li B, Zhou J, Savatin DV, et al** (2020) Ligand-induced monoubiquitination of BIK1 regulates plant immunity. *Nature* **581**: 199–203
- MacMillan CP, Mansfield SD, Stachurski ZH, Evans R, Southerton SG** (2010) Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *Plant J* **62**: 689–703
- Malinovsky FG, Fangel JU, Willats WGT** (2014) The role of the cell wall in plant immunity. *Front Plant Sci* **5**: 178
- Marcus SE, Verhertbruggen Y, Hervé C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, Willats WG, Knox JP** (2008) Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biology* **8**: 60
- Martínez-Fernández I, Sanchís S, Marini N, Balanzá V, Ballester P, Navarrete-Gómez M, Oliveira AC, Colombo L, Ferrándiz C** (2014) The effect of NGATHA altered activity on auxin signaling pathways within the *Arabidopsis* gynoecium. *Front Plant Sci*. doi: [10.3389/fpls.2014.00210](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00210)
- McCartney L, Marcus SE, Knox JP** (2005) Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. *J Histochem Cytochem* **53**: 543–546
- McFarlane HE, Döring A, Persson S** (2014) The Cell Biology of Cellulose Synthesis. *Annu Rev Plant Biol* **65**: 69–94
- Mohnen D** (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 266–277
- Moreira LM, Facincani AP, Ferreira CB, Ferreira RM, Ferro MIT, Gozzo FC, de Oliveira JCF, Ferro JA, Soares MR** (2015) Chemotactic signal transduction and phosphate metabolism as adaptive strategies during citrus canker induction by *Xanthomonas citri*. *Funct Integr Genomics* **15**: 197–210
- Mortimer JC, Faria-Blanc N, Yu X, Tryfona T, Sorieul M, Ng YZ, Zhang Z, Stott K, Anders N, Dupree P** (2015) An unusual xylan in *Arabidopsis* primary cell walls is synthesised by GUX3, IRX9L, IRX10L and IRX14. *The Plant Journal* **83**: 413–426

Mouille G, Ralet M-C, Cavelier C, Eland C, Effroy D, Hématy K, McCartney L, Truong HN, Gaudon V, Thibault J-F, et al (2007) Homogalacturonan synthesis in *Arabidopsis thaliana* requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain. *Plant J* **50**: 605–614

Mullens A, Jamann T (2020) Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter nebraskensis* in maize. *Plant Disease*. doi: [10.1094/PDIS-08-20-1823-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1823-RE)

Müller-Moulé P, Nozue K, Pytlak ML, Palmer CM, Covington MF, Wallace AD, Harmer SL, Maloof JN (2016) YUCCA auxin biosynthetic genes are required for *Arabidopsis* shade avoidance. *PeerJ* **4**: e2574

Nagai M, Ohnishi M, Uehara T, Yamagami M, Miura E, Kamakura M, Kitamura A, Sakaguchi S-I, Sakamoto W, Shimmen T, et al (2013) Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to tissue ion levels along primary leaves of barley. *Plant Cell Environ* **36**: 1826–1837

Ogawa M, Kay P, Wilson S, Swain SM (2009) *ARABIDOPSIS* DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 Are Polygalacturonases Required for Cell Separation during Reproductive Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 216–233

Oudin A, Mahroug S, Courdavault V, Hervouet N, Zelwer C, Rodríguez-Concepción M, St-Pierre B, Burlat V (2007) Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. *Plant Mol Biol* **65**: 13–30

Parkin IA, Koh C, Tang H, Robinson SJ, Kagale S, Clarke WE, Town CD, Nixon J, Krishnakumar V, Bidwell SL, et al (2014) Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome Biology* **15**: R77

Peaucelle A, Braybrook SA, Le Guillou L, Bron E, Kuhlemeier C, Höfte H (2011) Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **21**: 1720–1726

Pecrix Y, Staton ES, Sallet E, Lelandais-Brière C, Moreau S, Carrère S, Blein T, et al. (2018) Whole-Genome Landscape of *Medicago truncatula* Symbiotic Genes. *Nature Plants* **4**: 1017-25.

Pedersen HL, Fangel JU, McCleary B, Ruzanski C, Rydahl MG, Ralet M-C, Farkas V, Schantz L von, Marcus SE, Andersen MCF, et al (2012) Versatile High Resolution Oligosaccharide Microarrays for Plant Glycobiology and Cell Wall Research. *J Biol Chem* **287**: 39429–39438

Peña MJ, Zhong R, Zhou G-K, Richardson EA, O'Neill MA, Darvill AG, York WS, Ye Z-H (2007) *Arabidopsis* irregular xylem8 and irregular xylem9: Implications for the Complexity of Glucuronoxylan Biosynthesis. *The Plant Cell* **19**: 549–563

Perrin A (1972) Contribution à l'étude de l'organisation et du fonctionnement des hydathodes: recherches anatomiques ultrastructurales et physiologiques. These. Université de Lyon, Lyon

Persson S, Paredez A, Carroll A, Palsdottir H, Doblin M, Poindexter P, Khitrov N, Auer M, Somerville CR (2007) Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15566–15571

Pillitteri LJ, Bogenschutz NL, Torii KU (2008) The bHLH protein, MUTE, controls differentiation of stomata and the hydathode pore in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **49**: 934–943

- Pillitteri LJ, Dong J** (2013) Stomatal Development in *Arabidopsis*. *Arabidopsis* Book. doi: [10.1199/tab.0162](https://doi.org/10.1199/tab.0162)
- Pilot G, Stransky H, Bushey DF, Pratelli R, Ludewig U, Wingate VPM, Frommer WB** (2004) Overexpression of GLUTAMINE DUMPER1 leads to hypersecretion of glutamine from Hydathodes of *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* **16**: 1827–1840
- Raiola A, Lionetti V, Elmaghraby I, Immerzeel P, Mellerowicz EJ, Salvi G, Cervone F, Bellincampi D** (2011) Pectin methylesterase is induced in *Arabidopsis* upon infection and is necessary for a successful colonization by necrotrophic pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 432–440
- Rajeshwari R, Jha G, Sonti RV** (2005) Role of an In Planta-Expressed Xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Promoting Virulence on Rice. *MPMI* **18**: 830–837
- Ranocha P, Dima O, Nagy R, Felten J, Corratgé-Faillie C, Novák O, Morreel K, Lacombe B, Martinez Y, Pfrunder S, et al** (2013) *Arabidopsis* WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nature Communications* **4**: 2625
- Rautengarten C, Ebert B, Herter T, Petzold CJ, Ishii T, Mukhopadhyay A, Usadel B, Scheller HV** (2011) The Interconversion of UDP-Arabinopyranose and UDP-Arabinofuranose Is Indispensable for Plant Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **23**: 1373–1390
- Reboul R, Geserick C, Pabst M, Frey B, Wittmann D, Lütz-Meindl U, Léonard R, Tenhaken R** (2011) Down-regulation of UDP-glucuronic Acid Biosynthesis Leads to Swollen Plant Cell Walls and Severe Developmental Defects Associated with Changes in Pectic Polysaccharides. *J Biol Chem* **286**: 39982–39992
- Rhee SY, Osborne E, Poindexter PD, Somerville CR** (2003) Microspore separation in the quartet 3 mutants of *Arabidopsis* is impaired by a defect in a developmentally regulated polygalacturonase required for pollen mother cell wall degradation. *Plant Physiol* **133**: 1170–1180
- Robinson MD, Oshlack A** (2010) A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* **11**: R25
- Rose JKC, Braam J, Fry SC, Nishitani K** (2002) The XTH Family of Enzymes Involved in Xyloglucan Endotransglucosylation and Endohydrolysis: Current Perspectives and a New Unifying Nomenclature. *Plant and Cell Physiology* **43**: 1421–1435
- Roudier F, Fernandez AG, Fujita M, Himmelpach R, Borner GHH, Schindelman G, Song S, Baskin TI, Dupree P, Wasteneys GO, et al** (2005) COBRA, an *Arabidopsis* Extracellular Glycosyl-Phosphatidyl Inositol-Anchored Protein, Specifically Controls Highly Anisotropic Expansion through Its Involvement in Cellulose Microfibril Orientation. *The Plant Cell* **17**: 1749–1763
- Rui Y, Xiao C, Yi H, Kandemir B, Wang JZ, Puri VM, Anderson CT** (2017) POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION3 Functions in Seedling Development, Rosette Growth, and Stomatal Dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **29**: 2413–2432

Saez-Aguayo S, Ralet M-C, Berger A, Botran L, Ropartz D, Marion-Poll A, North HM (2013) PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR6 Promotes *Arabidopsis* Mucilage Release by Limiting Methylesterification of Homogalacturonan in Seed Coat Epidermal Cells. *The Plant Cell* **25**: 308–323

Samac DA, Shah DM (1991) Developmental and Pathogen-Induced Activation of the *Arabidopsis* Acidic Chitinase Promoter. *Plant Cell* **3**: 1063–1072

Sampedro J, Valdivia ER, Fraga P, Iglesias N, Revilla G, Zarra I (2017) Soluble and Membrane-Bound β -Glucosidases Are Involved in Trimming the Xyloglucan Backbone. *Plant Physiology* **173**: 1017–1030

Sénéchal F, Habrylo O, Hocq L, Domon J-M, Marcelo P, Lefebvre V, Pelloux J, Mercadante D (2017) Structural and dynamical characterization of the pH-dependence of the pectin methylesterase–pectin methylesterase inhibitor complex. *J Biol Chem* **292**: 21538–21547

Senechal FF, L ’enfant M, Domon J-MJ-M, Rosiau E, CREPEAU M-J, Surcouf O, Esquivel-Rodríguez J, Marcelo P, Mareck AA, Guerineau FF, et al (2015) Tuning of Pectin Methylesterification : PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR 7 modulates the processive activity of co-expressed PECTIN METHYLESTERASE 3 in a pH-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* **290**: 23320–23335

da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LMC, et al (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**: 459–463

de Souza A, Hull PA, Gille S, Pauly M (2014) Identification and functional characterization of the distinct plant pectin esterases PAE8 and PAE9 and their deletion mutants. *Planta* **240**: 1123–1138

Tan C, Liu Z, Huang S, Li C, Ren J, Tang X, Liu W, Peng S, Feng H (2018) Pectin methylesterase inhibitor (PMEI) family can be related to male sterility in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Mol Genet Genomics* **293**: 343–357

Tayi L, Kumar S, Nathawat R, Haque AS, Maku RV, Patel HK, Sankaranarayanan R, Sonti RV (2018) A mutation in an exoglucanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, which confers an endo mode of activity, affects bacterial virulence, but not the induction of immune responses, in rice. *Mol Plant Pathol* **19**: 1364–1376

Tayi L, Maku RV, Patel HK, Sonti RV (2016) Identification of Pectin Degrading Enzymes Secreted by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and Determination of Their Role in Virulence on Rice. *PLoS One* **11**: e0166396

Taylor NG, Howells RM, Huttly AK, Vickers K, Turner SR (2003) Interactions among three distinct Cesa proteins essential for cellulose synthesis. *PNAS* **100**: 1450–1455

Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* **37**: 914–939

- Torii KU** (2021) Stomatal Development in the Context of Epidermal Tissues. *Annals of Botany*. doi: [10.1093/aob/mcab052](https://doi.org/10.1093/aob/mcab052)
- Torre F de la, Sampedro J, Zarra I, Revilla G** (2002) AtFXG1, an *Arabidopsis* Gene Encoding α -L-Fucosidase Active against Fucosylated Xyloglucan Oligosaccharides. *Plant Physiology* **128**: 247–255
- Underwood W** (2012) The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Front Plant Sci* **3**: 85
- Verhertbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Ordaz-Ortiz JJ, Knox JP** (2009) An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research* **344**: 1858–1862
- Vicente JG, Holub EB** (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology* **14**: 2–18
- Vieira PS, Bonfim IM, Araujo EA, Melo RR, Lima AR, Fessel MR, Paixão DAA, Persinoti GF, Rocco SA, Lima TB, et al** (2021) Xyloglucan processing machinery in *Xanthomonas* pathogens and its role in the transcriptional activation of virulence factors. *Nat Commun* **12**: 4049
- Wan L, Xia X, Hong D, Yang G** (2010) Molecular analysis and expression of a floral organ-specific polygalacturonase gene isolated from rapeseed (*Brassica napus* L.). *Mol Biol Rep* **37**: 3851–3862
- Wang W, Xu B, Wang H, Li J, Huang H, Xu L** (2011) YUCCA genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin development. *Plant Physiol* **157**: 1805–1819
- Wang Y, Mortimer JC, Davis J, Dupree P, Keegstra K** (2013) Identification of an additional protein involved in mannan biosynthesis. *The Plant Journal* **73**: 105–117
- Wang Z, Li X** (2009) IAN/GIMAPs are conserved and novel regulators in vertebrates and angiosperm plants. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 165–167
- van Wersch R, Li X, Zhang Y** (2016) Mighty Dwarfs: *Arabidopsis* Autoimmune Mutants and Their Usages in Genetic Dissection of Plant Immunity. *Front Plant Sci* **7**: 1717
- Western TL, Young DS, Dean GH, Tan WL, Samuels AL, Haughn GW** (2004) MUCILAGE-MODIFIED4 Encodes a Putative Pectin Biosynthetic Enzyme Developmentally Regulated by APETALA2, TRANSPARENT TESTA GLABRA1, and GLABRA2 in the *Arabidopsis* Seed Coat. *Plant Physiology* **134**: 296–306
- Wieczorek K, Elashry A, Quentin M, Grundler FMW, Favery B, Seifert GJ, Bohlmann H** (2014) A Distinct Role of Pectate Lyases in the Formation of Feeding Structures Induced by Cyst and Root-Knot Nematodes. *MPMI* **27**: 901–912
- Willats W, McCartney L, Mackie W, Knox P** (2001) Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. *Plant molecular biology* **47**: 9–27
- Windram O, Madhou P, McHattie S, Hill C, Hickman R, Cooke E, Jenkins DJ, Penfold CA, Baxter L, Breeze E, et al** (2012) *Arabidopsis* defense against *Botrytis cinerea*: chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *Plant Cell* **24**: 3530–3557

- Wu A-M, Hörnblad E, Voxeur A, Gerber L, Rihouey C, Lerouge P, Marchant A** (2010) Analysis of the *Arabidopsis* IRX9/IRX9-L and IRX14/IRX14-L Pairs of Glycosyltransferase Genes Reveals Critical Contributions to Biosynthesis of the Hemicellulose Glucuronoxylan. *Plant Physiology* **153**: 542–554
- Xiao Y, Wu X, Liu D, Yao J, Liang G, Song H, Ismail AM, Luo J-S, Zhang Z** (2020) Cell Wall Polysaccharide-Mediated Cadmium Tolerance Between Two *Arabidopsis thaliana* Ecotypes. *Front Plant Sci.* doi: [10.3389/fpls.2020.00473](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00473)
- Yadav S, Yadav P, Yadav D, Yadav K** (2009) Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry* **44**: 1–10
- Yagi H, Nagano AJ, Kim J, Tamura K, Mochizuki N, Nagatani A, Matsushita T, Shimada T** (2021) Fluorescent protein-based imaging and tissue-specific RNA-seq analysis of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **72**: 1260–1270
- Yang J, Bak G, Burgin T, Barnes WJ, Mayes HB, Peña MJ, Urbanowicz BR, Nielsen E** (2020) Biochemical and Genetic Analysis Identify CSLD3 as a beta-1,4-Glucan Synthase That Functions during Plant Cell Wall Synthesis. *The Plant Cell* **32**: 1749–1767
- Yang L, Huang W, Xiong F, Xian Z, Su D, Ren M, Li Z** (2017) Silencing of SIPL, which encodes a pectate lyase in tomato, confers enhanced fruit firmness, prolonged shelf-life and reduced susceptibility to grey mould. *Plant Biotechnology Journal* **15**: 1544–1555
- Yue H, Li Z, Xing D** (2012) Roles of *Arabidopsis* bax inhibitor-1 in delaying methyl jasmonate-induced leaf senescence. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 1488–1489
- Zablackis E** (1995) Characterization of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* Leaves. *PLANT PHYSIOLOGY* **107**: 1129–1138
- Zabotina OA, Ven WTGVD, Freshour G, Drakakaki G, Cavalier D, Mouille G, Hahn MG, Keegstra K, Raikhel NV** (2008) *Arabidopsis* XXT5 gene encodes a putative α -1,6-xylosyltransferase that is involved in xyloglucan biosynthesis. *The Plant Journal* **56**: 101–115
- Zamil MS, Geitmann A** (2017) The middle lamella—more than a glue. *Phys Biol* **14**: 015004
- Zandleven J, Sørensen SO, Harholt J, Beldman G, Schols HA, Scheller HV, Voragen AJ** (2007) Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **68**: 1219–1226
- Zhao C, Zayed O, Zeng F, Liu C, Zhang L, Zhu P, Hsu C-C, Tuncil YE, Tao WA, Carpita NC, et al** (2019a) Arabinose biosynthesis is critical for salt stress tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **224**: 274–290
- Zhao F, Chen W, Sechet J, Martin M, Bovio S, Lionnet C, Long Y, Battu V, Mouille G, Monéger F, et al** (2019b) Xyloglucans and Microtubules Synergistically Maintain Meristem Geometry and Phyllotaxis. *Plant Physiol* **181**: 1191–1206

Table 1. Cell wall differentially expressed genes (DEGs)(FDR<0.001) in hydathode compared to mesophyll tissues. *B.oleracea* genome gene ID, *Arabidopsis* closest homolog AGI, *Arabidopsis* gene abbreviation, putative function of *Arabidopsis* homolog, log₂FC (including heat map), normalized counts in hydathode (H) and mesophyll (M) and functional reference are given. SCW: secondary cell wall; PCW: primary cell wall. A more complete DEG list is given in Supplementary Table S1.

Bol	Log ₂ FC	Annotation Ensembl Bol	Arabidopsis AGI homolog	Name	Putative function from Arabidopsis reference	Arabidopsis references
Cellulose synthesis						
Bo2g012670	3	COBRA-like protein	AT5G15630	COBL4	Cellulose synthesis SCW	<i>Brown et al., Plant Cell, 2005.</i>
Bo7g066970	2.5	cellulose synthase A4	AT5G44030	CESA4	Cellulose synthesis SCW	<i>Hill et al., Plant Cell, 2014</i>
Bo7g106250	2.5	cellulose synthase family protein	AT4G18780	CESA8	Cellulose synthesis SCW	<i>Taylor et al., PNAS, 2003</i>
Bo3g010520	2.1	COBRA-like protein	AT5G15630	COBL4	Cellulose synthesis SCW	<i>Brown et al., Plant Cell, 2005.</i>
Bo1g002500	1.7	cellulose synthase A2	AT2G21770	CESA9	Cellulose synthesis PCW	<i>Mac Farlane et al., ARPB, 2014.</i>
Bo1g122980	1.2	COBRA-like protein B precursor	AT3G16860	COBL8	Cellulose synthesis SCW	<i>Roudier et al., Plant Cell, 2005.</i>
Bo3g012630	1.2	Cellulose synthase	AT5G17420	CESA7	Cellulose synthesis SCW	<i>Mac Farlane et al., ARPB, 2014.</i>
Bo3g005320	1	cellulose synthase 5	AT5G09870	CESA5	Cellulose synthesis PCW	<i>Mac Farlane et al., ARPB, 2014.</i>
Bo1g154950	0.9		AT3G03050	CSLD3	Cellulose synthesis PCW	<i>Yang et al., Plant Cell, 2020.</i>
Bo3g100970	0.9	Cellulose synthase	AT5G64740	CESA6	Cellulose synthesis PCW	<i>Fagard et al., Plant Cell, 2000.</i>
Bo7g115740	0.7	Cellulose synthase	AT2G25540	CESA10	Cellulose synthesis PCW	<i>Persson et al., PNAS, 2007; Gonneau et al., Plant Physiol., 2014; Hill et al., Plant Cell, 2014.</i>
Bo1g010450	0.7	Cellulose synthase	AT2G25540	CESA10	Cellulose synthesis PCW	
Bo2g006860	0.6	Cellulose synthase	AT5G05170	CESA3	Cellulose synthesis PCW	
Bo3g003250	0.6	Cellulose synthase	AT5G05170	CESA3	Cellulose synthesis PCW	
Bo9g014410	0.6	COBRA-like protein	AT5G60920	COB	Cellulose synthesis SCW	<i>Brown et al., Plant Cell, 2005.</i>
Bo7g109270	-0.6	Glycosyltransferase (Fragment)	AT4G23990	CSLG3	Cellulose synthesis?	<i>Xiao et al., FIPS, 2020.</i>
Bo3g010900	-1.3		AT4G13410	CSLA15	Cellulose synthesis?	
Bo4g184730	1.9		AT2G35860	FLA16	Cellulose deposition?	
Bo3g002210	2.8		AT5G03170	FLA11	Cellulose deposition	<i>Mac Millan et al., Plant J. 2010.</i>
Bo2g003890	1.9		AT5G03170	FLA11	Cellulose deposition	<i>Mac Millan et al., Plant J. 2010.</i>
Bo3g017330	1.9		AT5G60490	FLA12	Cellulose deposition	<i>Mac Millan et al., Plant J. 2010.</i>
Hemicellulose synthesis						
Bo1g008230	2.7	plant glycogenin-like starch initiation protein 3	AT4G33330	GUX2	Glucuronyl transferase on SCW xylans	<i>Bromley et al., Plant J., 2013</i>
Bo1g116390	2.1	Hexosyltransferase	AT3G18660	GUX1	Glucuronyl transferase on SCW xylans	<i>Bromley et al., Plant J., 2013</i>
Bo4g030870	2.1	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein	AT2G37090	IRX9	Xylan backbone synthesis SCW	<i>Wu et al., Plant Physiol., 2010.</i>
Bo5g027330	1.2	Hexosyltransferase	AT1G19300	PARVUS	Xylan backbone synthesis SCW	<i>Lee et al., Plant Cell Physiol., 2007.</i>
Bo6g042570	1.1		AT1G51630	MSR2	Mannans synthesis	<i>Wang et al., Plant J., 2013.</i>
Bo3g181440	1		AT1G51630	MSR2	Mannans synthesis	<i>Wang et al., Plant J., 2013.</i>
Bo6g087070	1		AT1G74380	XXT5	Xyloglucan synthesis PCW	<i>Zabatina et al., Plant J., 2008.</i>
Bo7g049750	0.9	Glycosyltransferases	AT1G27600	IRX9L	Xylan backbone synthesis PCW	<i>Pena et al., Plant Cell, 2007; Mortimer et al., Plant J., 2015.</i>
Bo01073s060	0.9		AT1G27600	IRX9L	Xylan backbone synthesis PCW	
Bo5g063240	1.2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	AT1G30620	MUR4	Arabinose synthesis	<i>Zhao et al., New Phytol., 2019.</i>
Bo9g060020	1.3		AT5G44480	DUR	Arabinose synthesis	<i>Zhao et al., New Phytol., 2019.</i>
Bo3g010540	1.3		AT5G15650	RGP2	Xylans and pectins: Interconversion of UDP-Arap to UDP-Arapf	<i>Rautengarten et al., Plant Cell, 2011.</i>
Bo3g042920	-2	reversibly glycosylated polypeptide 4	AT5G50750	RGP4	Xylans and pectins: Interconversion of UDP-Arap to UDP-Arapf	<i>Rautengarten et al., Plant Cell, 2011.</i>

Hemicellulose modification

Bo5g113800	4.1	Glycosyl hydrolase family protein	AT3G19620		Xylosidase?	<i>Iglesias et al., Plant Cell Physiol., 2006.</i>
Bo9g048830	2.6	glycosyl hydrolase family 1 protein / carbohydrate-binding domain-1,2-alpha-L-fucosidases	AT1G58370	ATXYN1	Xylanase?	
Bo1g007460	2		AT4G34260	AXY8	Fucosidase	<i>Gunl et al., 2011.</i>
Bo2g023280	1.3		AT5G20950	BGLC1	Glucosidase	<i>Sampedro et al., Plant Physiol., 2017.</i>
Bo6g106360	1.2		AT1G67830	FXG1	Fucosidase	<i>del La Torre et al., Plant Physiol., 2002.</i>
Bo3g175630	3.5	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	AT4G30270	XTH24	Glucosidase	<i>Braidwood et al., New Phytol., 2013; Rose et al., Plant Cell Physiol., 2002.</i>
Bo8g059510	-1.9	xyloglucan:xyloglucosyl transferase 33	AT1G10550	XTH33	Glucosidase	
Bo3g097760	-2.1	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 6	AT5G65730	XTH6	Glucosidase	
Bo7g025320	-2.3	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 1	AT2G14620	XTH10	Glucosidase	
Bo7g114380	-3.3	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	AT4G30270	XTH24	Glucosidase	<i>Braidwood et al., New Phytol., 2013; Rose et al., Plant Cell Physiol., 2002.</i>
Bo7g118760	-3.8	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 7	AT4G37800	XTH7*	Glucosidase	

Pectin synthesis

Bo7g038960	1.3		AT3G23820	GAE5	Pectin synthesis	<i>Bethke et al., Plant Cell, 2016.</i>
Bo2g012590	1.1	UDP-glucose 6-dehydrogenase	AT5G15490	UGD3	Xyloglucan and pectins synthesis	<i>Reboul et al., J.Biol. Chem., 2011.</i>
Bo00613s010	1.1		AT5G44670	GALS2	Pectin synthesis/RGI	<i>Ebert et al., Plant Cell Physiol., 2018.</i>
Bo8g095640	0.6	Hexosyltransferase	AT3G61130	GAUT1	Pectin synthesis	<i>Atmadio et al., PNAS, 2011.</i>
Bo1g022230	-0.7		AT4G20170	GALS3	Pectin synthesis/ galactans on RGI	<i>Ebert et al., Plant Cell Physiol., 2018.</i>
Bo6g031510	-0.7		AT1G53500	MUM4	Pectin synthesis	<i>Western et al., Plant Physiol., 2004.</i>

Pectin degrading enzyme

Bo5g003190	8.2		AT1G02460	Pectin lyase-like	Pectin degradation	<i>Cao, PLOS One, 2012.</i>
Bo2g140690	4.9	Pectate lyase	AT3G27400	PLL18	Pectin degradation	<i>Wieczorek et al., MPMI, 2014.</i>
Bo1g034680	4.5		AT4G23500	Pectin lyase-like	Pectin degradation	<i>Cao, PLOS One, 2012.</i>
Bo9g054490	4.2	Pectin lyase-like superfamily protein	AT1G56710	PGL1 pectin-lyase like	Pectin degradation	<i>Estornell et al., FIPS, 2014.</i>
Bo8g117430	3.6		AT1G02460	Pectin lyase-like	Pectin degradation	<i>Cao, PLOS One, 2012.</i>
Bo4g190010	3.2		AT4G13760	Pectin lyase-like	Pectin degradation	<i>Cao, PLOS One, 2012.</i>
Bo7g084540	3	Pectate lyase	AT3G27400	Pectin lyase-like	Pectin degradation	<i>Wieczorek et al., MPMI, 2014.</i>
Bo5g138240	2.7	Pectin lyase-like superfamily protein	AT3G09540	Pectin lyase-like	Pectin degradation	<i>Cao, PLOS One, 2012.</i>
Bo8g097660	2.1		AT3G62110	Pectin lyase-like	Pectin degradation	<i>Cao, PLOS One, 2012.</i>
Bo8g074810	1.8		AT1G23460	Pectin lyase-like	Pectin degradation	<i>Cao, PLOS One, 2012.</i>
Bo6g066540	0.8	Pectin lyase-like superfamily protein	AT5G41870	Pectin lyase-like	Pectin degradation	<i>Cao, PLOS One, 2012.</i>
Bo6g110970	-1.2		AT1G23760	PGL3, polygalacturonase	Pectin degradation	
Bo6g010910	-1.7	Pectin lyase-like superfamily protein	AT1G48100	PGX3, polygalacturonase	Pectin degradation	<i>Rui et al., Plant Cell 2017.</i>
Bo3g060810	-2.5	Pectin lyase-like superfamily protein	AT3G06770	Pectin lyase-like	Pectin degradation	<i>Cao, PLOS One, 2012.</i>
Bo7g109150	-2.9		AT4G23820	Pectin lyase-like	Pectin degradation	<i>Cao, PLOS One, 2012.</i>

Pectin methyl esterases and inhibitors

Bo4g002390	-0.8		AT2G47670	PME16	Pectin methyl esterase inhibitor	<i>Francoz et al., Development Cell, 2018; Sae-Aguayo et al., Plant Cell, 2013.</i>
Bo9g014930	-3.1	Plant invertase/pectin methyl esterase inhibitor	AT5G62360	PME13	Pectin methyl esterase inhibitor	<i>Chen et al., J. Plant Physiol., 2018.</i>
Bo9g036870	-1.6		AT1G62760	PME10	Pectin methyl esterase inhibitor	<i>Lionetti et al., Plant Physiol., 2017.</i>
Bo7g056250	3.5		AT1G23205	PEI domain		
Bo8g063720	2.9		AT1G14890	PEI domain		
Bo8g098130	-1.4	Plant invertase/pectin methyl esterase inhibitor	AT3G62820	PEI domain		
Bo3g037670	6.5	Pectinesterase	AT2G45220	PME17	Pectin methyl esterase, PEI domain	<i>Del Corpo et al., Mol. Plant Pathol., 2020.</i>
Bo3g170870	0.6	pectin methyl esterase 44	AT4G33220	PME44	Pectin methyl esterase, PEI domain	<i>Bethke et al., Plant Physiol., 2014.</i>
Bo5g130430	-1.7	Pectinesterase	AT3G14310	PME3	Pectin methyl esterase, PEI domain	<i>Senchal et al., J.Biol. Chem., 2015, 2017. Raiola et al., 2011.</i>
Bo4g192910	-2	Pectinesterase	AT2G43050	ATPMEPCRD	Pectin methyl esterase, PEI domain	<i>Lionetti et al., Plant Physiol., 2017.</i>

Bo8g108850	-3,7	methylesterase PCR A	AT1G11580	PMEPCRA	Pectin methyl esterase, PEI domain	<i>Lionetti et al., Plant Physiol., 2017.</i>
Bo1g141540	-0,9	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor	AT3G10720		PE domain, PEI domain	
Bo5g145170	-2,5	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor	AT3G05620		PE domain, PEI domain	
Bo9g177520	-1	Pectinesterase	AT5G04970		PE domain, PEI domain	
Bo7g077650	-1,8	Pectinesterase	AT5G47500	PME5	Pectin methyl esterase	<i>Peaucelle et al., Development, 2011.</i>
Bo9g008810	3,3	Pectinesterase	AT3G29090	PME31	Pectin methyl esterase	<i>Bethke et al., Plant Physiol., 2014.</i>
Bo1g021480	-1,5	Pectin acetylerase	AT4G19420	PAEB	Pectin ecetyl esterase	<i>De Souza et al., Planta, 2014.</i>

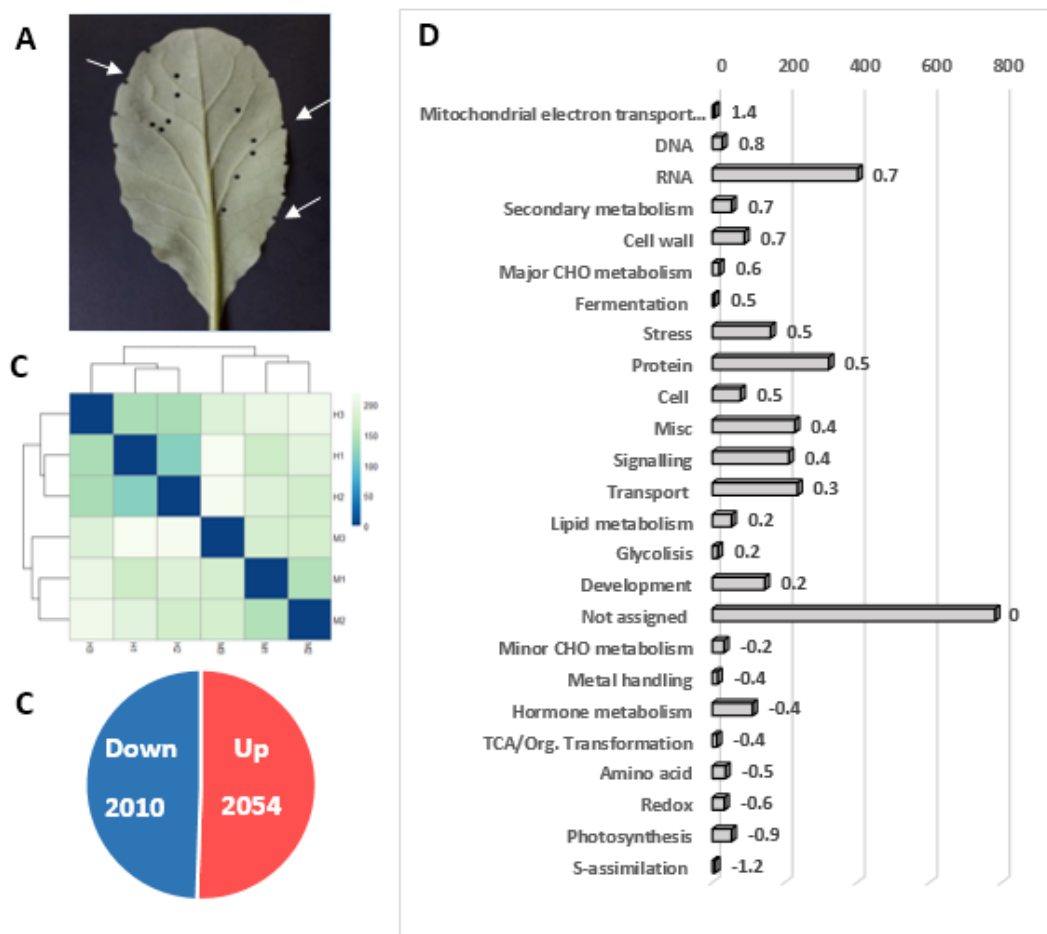


Fig. 1. RNA-seq expression profiling of cauliflower hydathode enriched compared to mesophyll enriched tissues. (A) Example of sampling of hydathode (see arrows on leaf margin) and mesophyll (biopsy dots on leaf blade) on 4-weeks old cauliflower leaves. **(B)** Hierarchical clustering using Euclidian distance showing that hydathode and mesophyll samples differs (H1 to 3 and M1 to 3 are three hydathode and mesophyll biological repeats, respectively and heatmap from deep to pale blue color indicate increased in Euclidian distance). **(C)** Number of Differentially Expressed Genes (DEGs) either up (red) or down (blue) regulated in hydathode. **(D)** Summary of functional annotation of cauliflower DEGs using Mapman annotation of 2331 closest *Arabidopsis* homolog of cauliflower. Only enriched functional categories are shown ($p < 0.05$). The number of genes is presented and the mean relative expression for genes of a given category presented as the log₂ Fold Change (Log₂ FC, non-linear scale) either overexpressed (+) or underexpressed (-) in hydathode is given in the label.

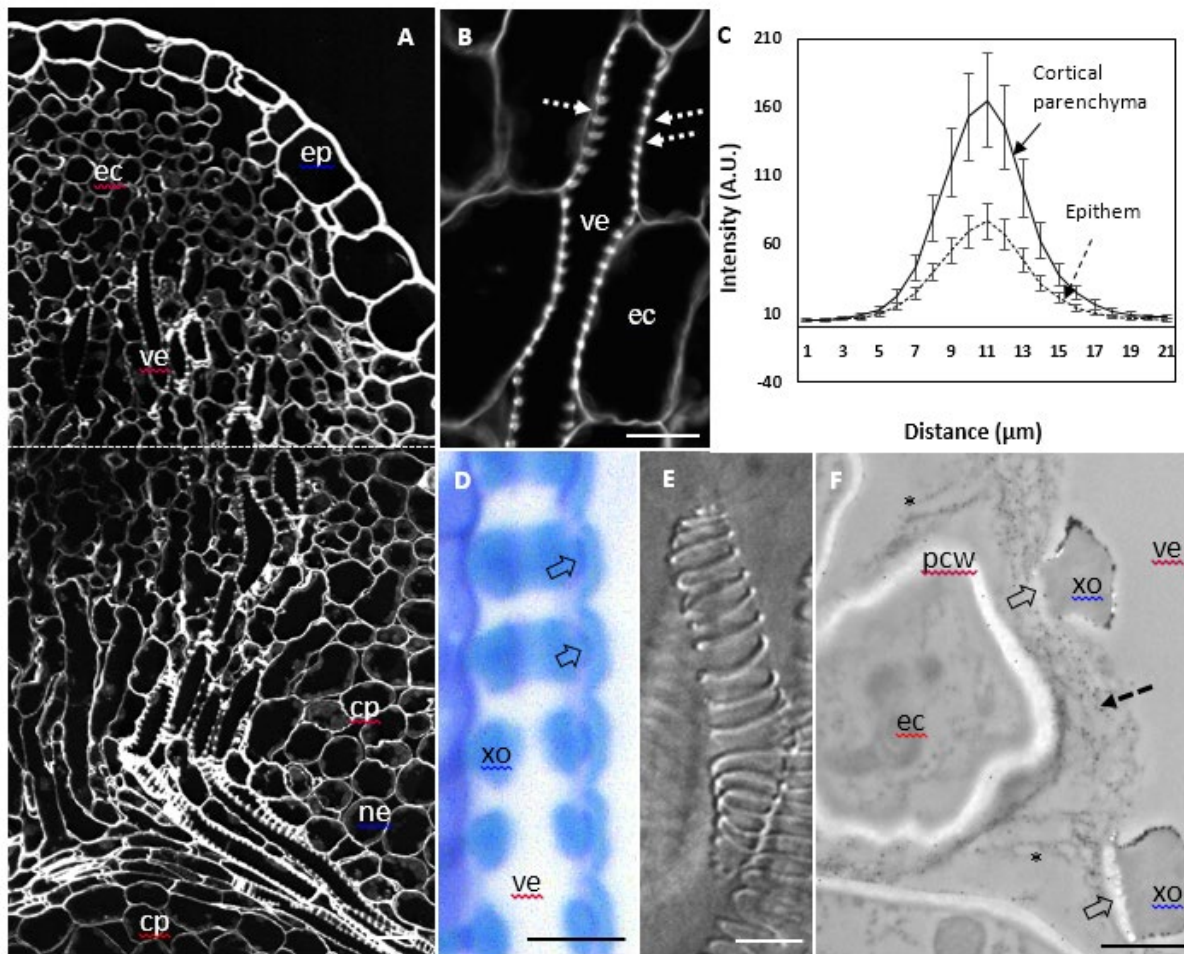


Fig. 2. Microscopy of sagittal sections of hydathodes. (A) General view of hydathode structure recomposed from two images and (B) details of vessels within the epithem cells in calcofluor-stained samples. (C) Measurements of calcofluor staining intensity of epithem and the surrounding spongy parenchyma cell walls. (D-E) Details of vessel elements stained with toluidine blue or using DIC microscopy. (F) Transmission electron microscopy of epithem and vessel samples contrasted with UranylLess. The dashed arrows and the open arrows indicate wall-domains located between and at the basis of the xylem ornamentations, respectively. Note in (B,D), differences in the calcofluor and Toluidine blue staining related to wall domains and in (E) the clearing of epithem cell wall and wall-domains at the basis of ornamentation. Legends: ve, vessel element; ec, epithem cell; ep, epiderm; cp, cortical parenchyma; ne, leaf nerve, xo, xylem ornamentation; pcw, primary cell wall; * intercellular spaces. Scale bars: 20 μm (A), 1 μm (B, D, E), 1 μm (F).

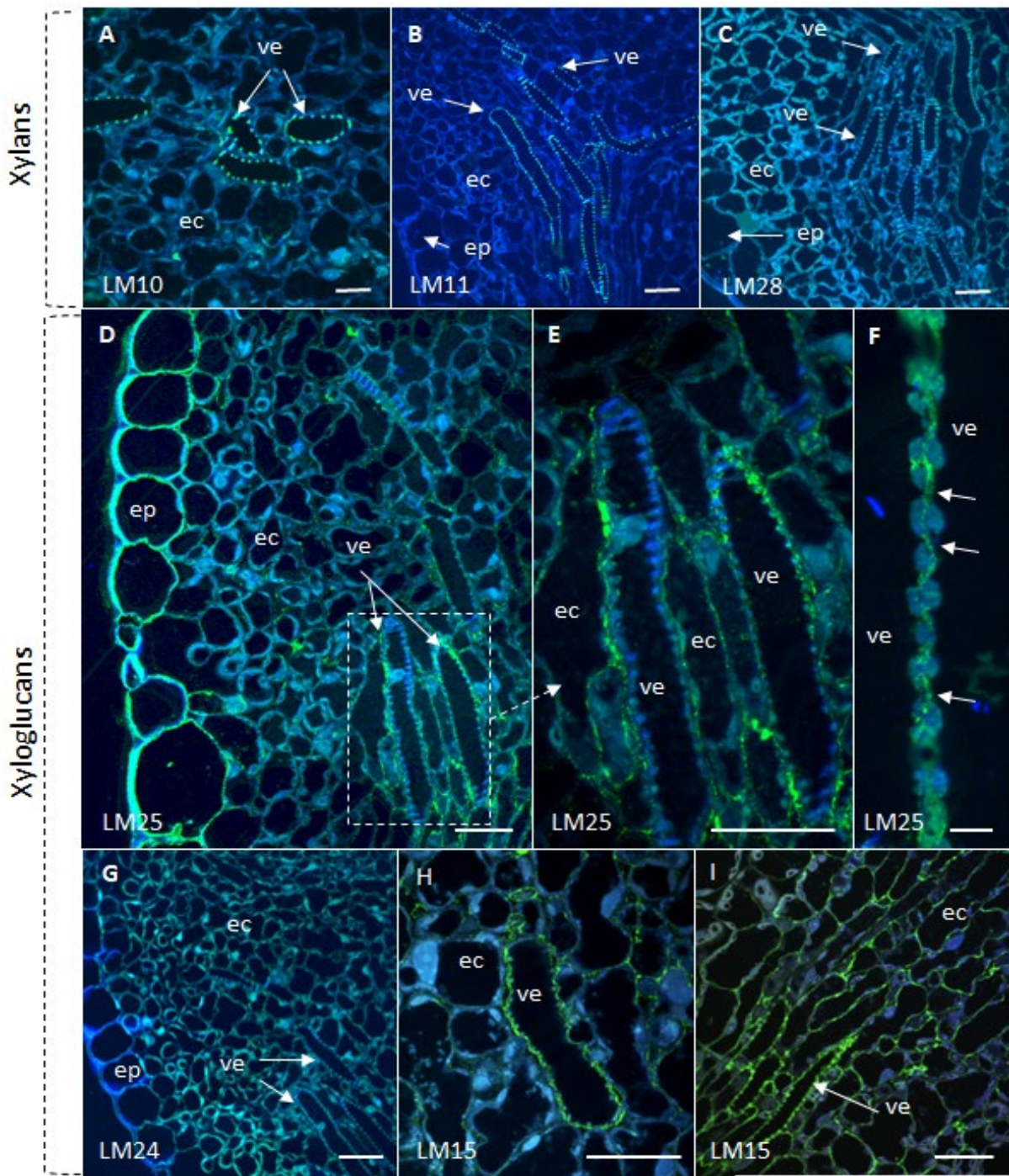


Fig. 3 (1/2).

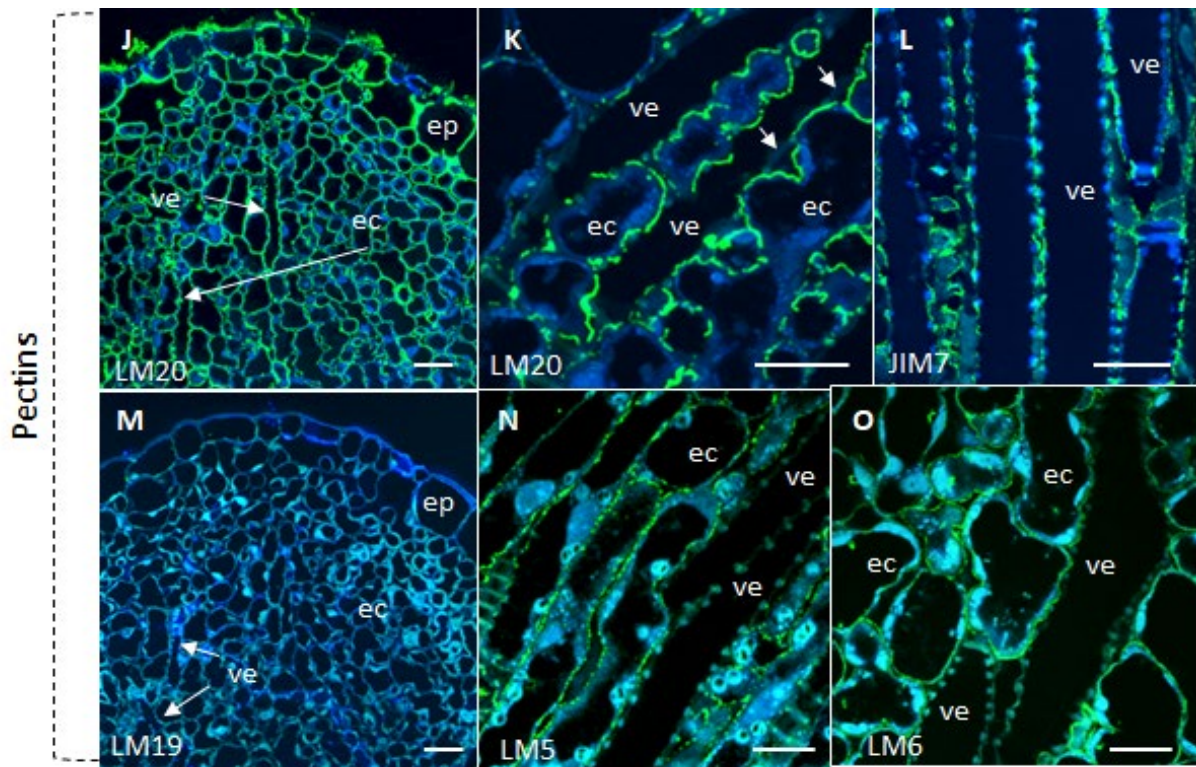


Fig. 3 (2/2). Localisation of xylans (A-C), xyloglucans (D-I), methylated (J-L), acidic homogalacturonans pectins (M) and lateral chains of galactans (N) and arabinans (O) of rhamnogalacturonan I using indirect immunofluorescence. LM10 (A), LM11 (B), LM28 (C), LM25 (D-F), LM24 (G), LM15 (H-I), LM20 (J-K), JIM7 (L), LM19 (M), LM5 (N) and LM6 (O) binding sites to sagittal sections of hydathodes. Each image is the overlay of two channels: the green channel (emission light between 500 and 550 nm) corresponds to the signal of the Alexa488 probe coupled to the secondary antibodies and the blue channel (between 410 nm and 470 nm) corresponds to the cell walls autofluorescence (using a 405 nm laser diode for excitation) enabling visualization of morphology. Legends: ve, vessel element; ec, epithelium; ep, epiderm. Scale bars: 10 μm (A), 20 μm (B-E, G-M), 5 μm (F, N-O).

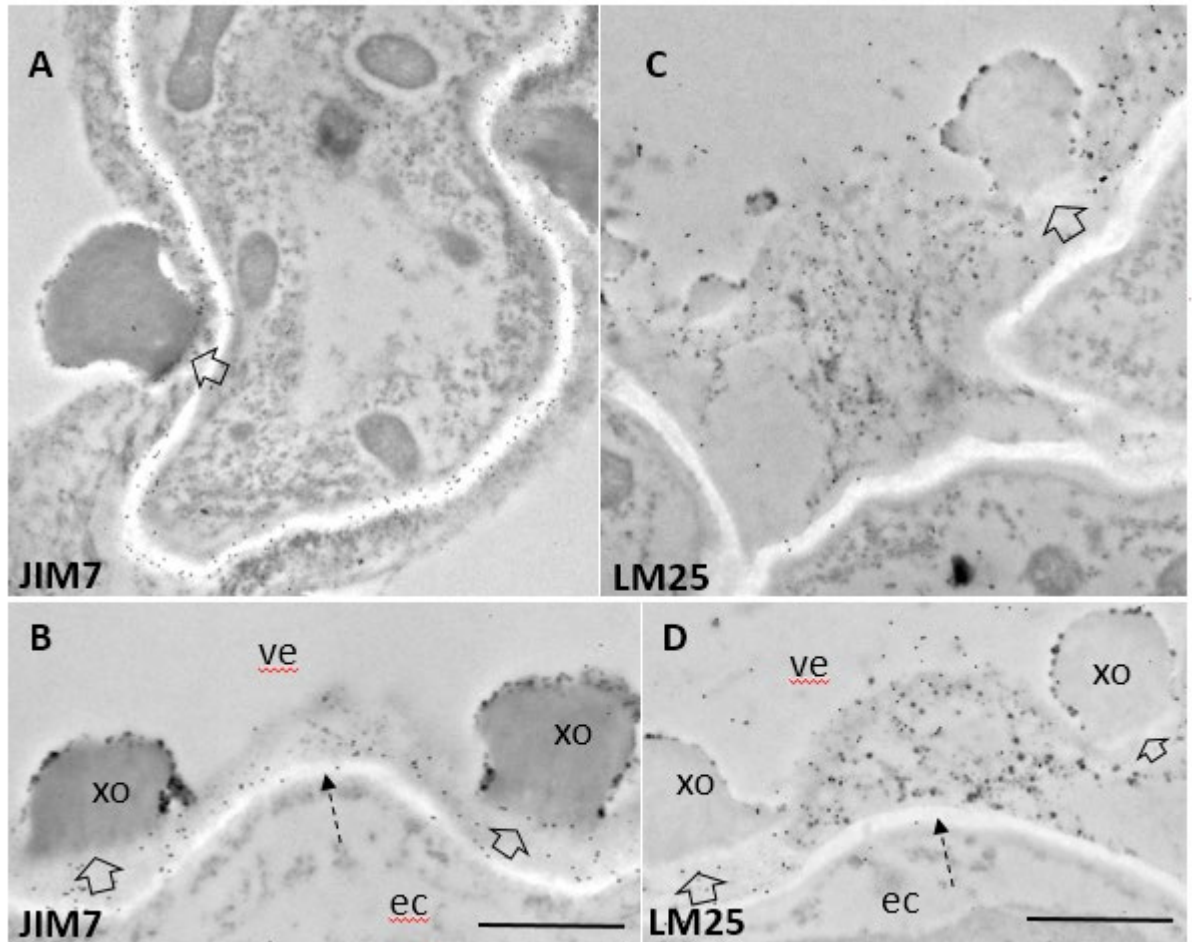


Fig.4. Immunogold detection of JIM7 and LM25 binding sites. Location of the JIM7 (A-B) and of LM25 binding sites (C-D). Sections were contrasted with UranylLess. Legends: ve, vessel element; ec, epithem cell; xo, xylem ornamentations; Dashed and open arrows indicate the epithem cell walls and the basis of the xylem ornamentations, respectively. Scale bars: 1 μ m.

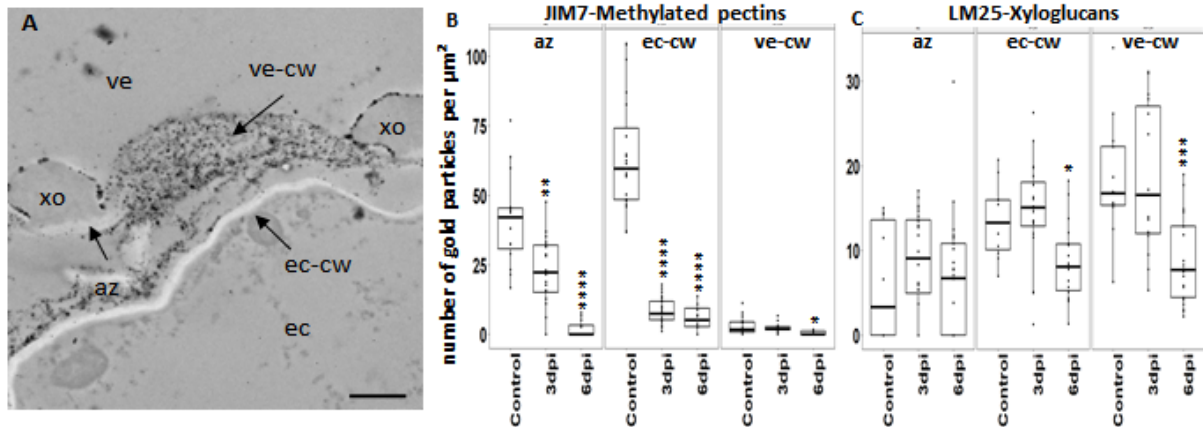


Fig. 5. Immunogold detection of methylated HG pectins and xyloglucans binding sites at 3 and 6 days post inoculation with *Xanthomonas campestris* var. *campestris*. (A) Sections of vessel element and epithem cell junction contrasted with UranylLess. (B) Quantification of the JIM7 (partially methylated HG pectins) and (C) LM25 binding sites (Xyloglucans). Legends: cw, cell wall; ec, epithem cells; ve, vessel element; xo, xylem ornamentations; arrows indicate the epithem cell walls (ec-cw), the basis of the xylem ornamentations (az) and the vessel element cell wall (ve-cw). Scale bars: 1 μm . ns: not significant; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.

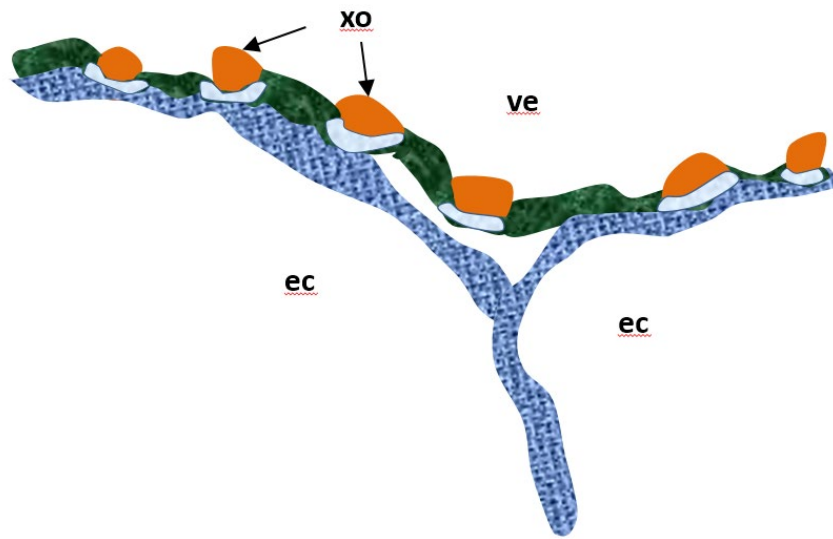


Fig.6. Distribution of non-cellulosic polysaccharides within different wall-domains along the hydathode vessel elements. Epithem cell wall domain (dark blue areas) was mainly composed of methylated HGs with both D-galactan and L-arabinan lateral chains of RGI. The vessel element primary cell wall domain between xylem ornamentations (green areas) was mainly composed of xyloglucan (xylosyl residues). Xylem ornamentations were composed of xylan-enriched domain at the top (orange areas) and of a methylated pectin-enriched domain at their basis (light blue areas). Legends: ec, epithem cells; ve, vessel element; is, intercellular space; xo, xylem ornamentations.

Supplementary data

Table S1. List of differentially expressed genes (FDR<0.001) in hydathodes compared to mesophyll tissues. *B.oleracea* genome gene ID, *Arabidopsis* closest homolog AGI, *Arabidopsis* gene abbreviation, putative function of *Arabidopsis* homolog, log₂FC including heatmap from red color to blue color for gene more and less expressed in hydathode, respectively, normalized counts in hydathodes (H) and mesophyll (M) and functional reference are given.

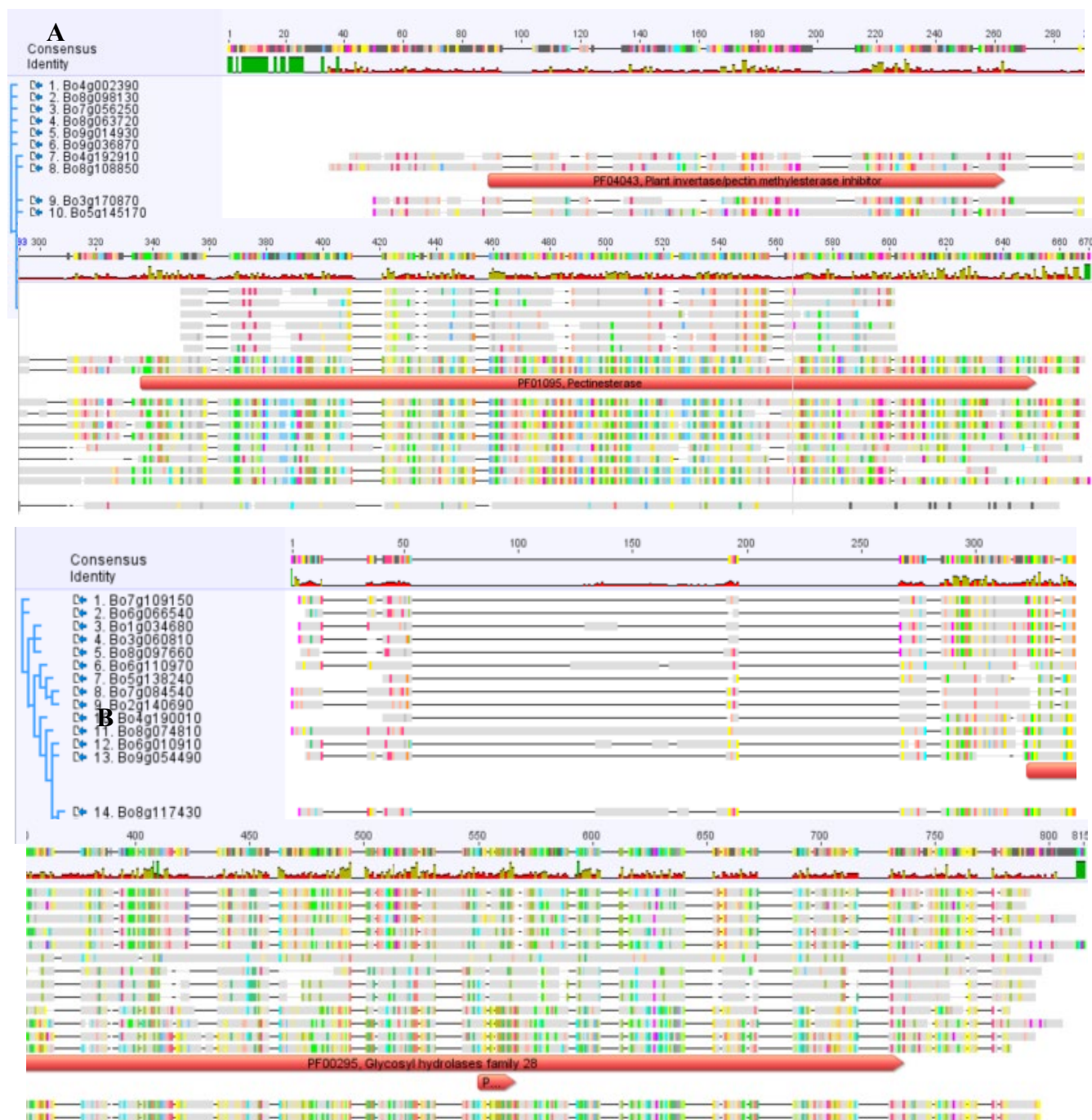
Samples and references	Shared DEGs more expressed in given tissue (total DEGs)	Shared DEGs more expressed in hydathodes in this study	%
<i>Yagi et al., 2020 (Manually excised hydathodes compared to leaf margin)</i>			
Hydathode	47 (69)	40	85
Mesophyll	0 (4)	0	0
<i>Kim et al., 2021(Single cell)</i>			
Hydathode	33 (98)	31	94
Mesophyll	189 (1287)	40	21
Vascular	431 (2012)	155	36
Epiderm	177 (727)	93	53
Guard cell	80 (690)	50	63

Table S2. Summary of transcriptomic analysis results with *Arabidopsis* hydathodes enriched gene samples.

Table S3. List of cauliflower DEGs more expressed in hydathode compared to *Arabidopsis* homologs in two other studies. *B.oleracea* genome gene ID, *Arabidopsis* AGI closest homolog, log₂FC, TAIR annotation and presence (YES) of gene in given study are presented.

Bol	Arabidopsis AGI homolog	Log ₂ FC	TAIR10 annotation	DEG in Yagi et al, 2020	DEG in Kim et al, 2021
Chlorogenesis					
Bol003330	AT4G37870	1.7	PCCL phosphoenolpyruvate carboxylase 1	YES	
Cell wall					
Bol0162880	AT5G62150	6.2	pectinoglycan-binding LysM domain-containing protein	YES	YES
Bol014800	AT5G62150	4.2	pectinoglycan-binding LysM domain-containing protein	YES	YES
Bol003190	AT1G02460	8.2	Pectin lyase-like superfamily protein	YES	
Bol0117430	AT1G02460	3.6	Pectin lyase-like superfamily protein	YES	
Bol054490	AT1G65710	4.2	PGL1, Pectin lyase-like superfamily protein	YES	YES
Bol040690	AT3G27400	4.9	Pectin lyase-like superfamily protein	YES	
Bol084540	AT3G27400	3.0	Pectin lyase-like superfamily protein	YES	
Bol063720	AT1G4890	2.9	Plant invertase/pectin methylsterase inhibitor superfamily protein		YES
N metabolism					
Bol0190740	AT2G41220	1.1	glutamate synthase 2	YES	
Hormone					
Bol037660	AT2G45210	3.8	SA, GAI1, SAUR36, SAUR: like auxin-responsive protein family		YES
Bol010340	AT5G11320	3.9	AtYUC4, Flavin-binding monooxygenase family protein	YES	
Bol062260	AT1G19540	-3.2	jasmonic acid carboxylmethyltransferase	YES	
Stress					
Bol036660	AT2G43590	6.7	Chitinase family protein	YES	
Bol0194450	AT2G43590	2.4	Chitinase family protein	YES	
Bol0194460	AT2G43610	3.5	Chitinase family protein	YES	YES
Bol043560	AT5G33355	3.0	Defensin-like (DEFL) family protein		
Bol0150370	AT3G05730	7.2	defensin-like protein	YES	YES
Bol083670	AT3G54420	9.0	homolog of carrot EP3-3 chitinase		YES
Bol083650	AT3G54420	4.5	homolog of carrot EP3-3 chitinase		YES
Bol005030	AT2G19990	3.9	PR-1 like pathogenesis-related protein-1-like protein	YES	YES
Polyamine					
Bol018140	AT5G19530	0.7	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily	YES	
Misc.					
Bol037220	AT1G62510	12.2	Bifunctional inhibitor: lipid transfer protein/seed storage 2S albumin	YES	YES
Bol02928010	AT1G62510	-4.0	Bifunctional inhibitor: lipid transfer protein/seed storage 2S albumin	YES	YES
Bol005970	AT5G44390	7.8	ABBE25, FAD-binding Berberine family protein		YES
RNA					
Bol060520	AT3G51060	9.1	AtSTY1_SRS1_STY1_Lateral root primordium (LRP) protein	YES	
Bol061900	AT3G51060	6.2	AtSTY1_SRS1_STY1_Lateral root primordium (LRP) protein	YES	
Bol017860	AT4G36260	8.4	SRS2_STY2_Lateral root primordium (LRP) protein-related		YES
Bol005730	AT4G36260	7.6	SRS2_STY2_Lateral root primordium (LRP) protein-related		YES
Bol065040	AT5G66350	4.6	SHL_Lateral root primordium (LRP) protein-related	YES	YES
Bol0161240	AT5G66970	1.6	TCP5_TEGOSINTE BRANCHED 1, cycloides and PCF trans	YES	
Bol004230	AT4G01730	4.7	AtWRKY47_WRKY47_WRKY family transcription factor		YES
Bol010870	AT4G23550	10.2	ATWRKY29_WRKY29_WRKY family transcription factor	YES	YES
Bol0163850	AT4G23550	6.5	ATWRKY29_WRKY29_WRKY family transcription factor	YES	YES
Bol069910	AT2G24260	-6.5	DRDP1_LRL1_LIRHL1-like 1	YES	
Bol0138630	AT3G25710	2.3	basic helix-loop-helix 32	YES	
Enzyme					
Bol011930	AT4G32950	11.3	Protein phosphatase 2C family protein		YES
Bol084110	AT2G04160	1.2	AIR3_Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	YES	YES
Minor CHO metabolism					
Bol010580	AT4G18010	0.8	myo-inositol polyphosphate 5-phosphatase 2		YES
Signaling					
Bol0104540	AT4G23300	7.6	CRK22_cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein) kinase	YES	
Bol0050590	AT1G25390	3.8	Protein kinase superfamily protein		YES
Bol0101310	AT1G66830	2.0	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	YES	
Transport					
Bol0143250	AT1G26230	1.0	ATPUP1_PUP1_purine permease 1	YES	
Bol0109330	AT4G24120	2.3	ATYSL1_YSL1_YELLOW STRIPE like 1	YES	
Bol037550	AT4G24120	1.0	ATYSL1_YSL1_YELLOW STRIPE like 1	YES	
Bol0154250	AT4G24120	0.9	ATYSL1_YSL1_YELLOW STRIPE like 1	YES	
Bol069040	AT1G68570	2.4	AtNPF3.1_NPF3.1_Major facilitator superfamily protein	YES	
Bol0107010	AT1G68570	1.0	AtNPF3.1_NPF3.1_Major facilitator superfamily protein	YES	
Bol061060	AT1G68570	0.7	AtNPF3.1_NPF3.1_Major facilitator superfamily protein	YES	
Bol0130050	AT3G45650	1.9	nitrate excretion transporter 1	YES	
Bol037640	AT5G55930	4.1	oligopeptide transporter 1		YES
Bol021130	AT5G55930	-1.6	oligopeptide transporter 1		YES
Bol061460	AT5G45380	0.7	urea-proton symporter DEGRADATION OF UREA 3 (DUR3)		YES
Bol0112690	AT1G68090	8.3	nitrate transporter 2.1		YES
Bol008770	AT1G68090	5.2	nitrate transporter 2.1		YES
Bol010850	AT1G68090	3.3	nitrate transporter 2.1		YES
Bol0121660	AT1G78000	2.9	sulfate transporter 1.2	YES	
Not assigned					
Bol0605510	AT5G46730	2.2	glycine-rich protein	YES	
Bol0610890	AT1G65500	4.5	transmembrane protein		YES
Bol0137750	AT3G10120	2.0	hypothetical protein	YES	YES
Bol0144160	AT3G10120	1.6	hypothetical protein	YES	YES
Bol014640	AT3G14060	2.6	hypothetical protein		YES
Bol0138380	AT3G25640	4.4	MLZU-KUSSEI-like protein (Protein of unknown function, DUF)	YES	
Bol0107360	AT4G21215	4.9	transmembrane protein	YES	
Bol023990	AT4G21215	1.7	transmembrane protein	YES	
Bol00136010	AT5G44670	1.1	GALS2_Domain of unknown function (DUF23)	YES	
Bol0609520	AT5G48500	-3.0	pathogenic type III effector avirulence factor Avr- <i>AmRst-c</i> har	YES	

Fig. S1. (A) Alignment using MUSCLE of cauliflower hydathode DEGs encoding Pectin Methyl Esterases (PME), Pectin Methyl Esterase Inhibitors (PMEI) and pectin Acetyl Esterase (PAE) protein sequences. **(B)** Alignment of cauliflower hydathode DEGs encoding Pectin lyase Pectin lyase (PL), PolyGalacturonase (PG) protein sequences.



Annexe III. Liste des lignées HEM phénotypées en triplicat (358 sur 884)

^a p-value genotype : probabilité que les différences entre phénotype (entre Col-0 et les HEM individuels) soient due au hasard, testé avec le modèle décrit dans le **Chapitre 5 Matériels et Méthodes**.

^b « - » : non significatif ; « . » : p-val = 0,1 ; « * » : p-val = 0,05 ; « ** » : p-val = 0,01 ; « *** » : p-val = 0,001.

^c « more » : la lignée possède plus d'hydathodes que Col-0, « less » : la lignée possède moins d'hydathodes que Col-0, d'après D. Vasselon et P. Laufs (IJPB).

Genotype	Mean log(CFU/g FW)	Standard-deviation log(CFU/g FW)	P-value genotype ^a	Significativity ^b	Experiment number	Hydathode phenotype ^c
Col-0	7,820	0,367			11-12-17	
Col-0	7,971	0,189			13-15-18	
Col-0	7,860	0,263			13-15-19	
Col-0	8,017	0,472			2-12-19	
Col-0	8,012	0,464			2-12-16	
Col-0	8,063	0,281			3-14-17	
Col-0	7,594	0,304			5-10-16	
Col-0	7,860	0,303			6-10-18	
Oy-0	8,218	0,471	0,00007	***	11-12-17	
Oy-0	8,374	0,306	0,00016	***	13-15-18	
Oy-0	8,267	0,285	0,00315	**	13-15-19	
Oy-0	8,267	0,285	0,00129	**	13-15-19	
Oy-0	8,290	0,370	0,01127	*	2-12-16	
Oy-0	8,228	0,363	0,07591	.	2-12-19	
Oy-0	8,491	0,240	0,00001	***	3-14-17	
Oy-0	8,248	0,189	0,00000	***	5-10-16	
Oy-0	8,344	0,282	0,00007	***	6-10-18	
EH1S1B461	7,719	0,493	0,86181	-	13-15-19	more
EH1S1B465	7,988	0,215	0,41216	-	13-15-19	
EH1S1B469	8,191	0,143	0,01244	*	13-15-19	
EH1S1B473	7,703	0,193	0,27665	-	13-15-19	
EH1S1B479	7,531	0,379	0,16071	-	13-15-19	
EH1S1B480	7,411	0,233	0,05845	.	13-15-19	
EH1S1B483	8,313	0,367	0,00003	***	13-15-19	

EH1S1B486	7,607	0,201	0,15376	-	13-15-19	
EH1S1B493	7,725	0,369	0,57797	-	13-15-19	more
EH1S1B495	7,734	0,201	0,35283	-	13-15-19	more
EH1S1B499	7,619	0,268	0,18746	-	13-15-19	
EH1S1B504	7,464	0,496	0,13984	-	13-15-19	
EH1S1B507	8,655	0,082	0,00000	***	13-15-19	
EH1S1B508	7,445	0,322	0,07601	.	13-15-19	
EH1S1B513	8,230	0,711	0,00000	***	13-15-19	
EH1S1B514	8,161	0,023	0,03687	*	13-15-19	
EH1S1B520	7,474	0,494	0,18500	-	13-15-19	
EH1S1B521	7,503	0,369	0,12367	-	13-15-19	
EH1S1B523	8,188	0,121	0,01510	*	13-15-19	
EH1S1B524	7,314	0,340	0,04795	*	13-15-19	
EH1S1B530	8,089	0,279	0,04687	*	13-15-19	more
EH1S1B531	7,856	0,156	0,75758	-	13-15-19	
EH1S1B534	8,038	0,518	0,01361	*	13-15-19	
EH1S1B536	7,682	0,323	0,34137	-	13-15-19	
EH1S1B542	7,581	0,545	0,31670	-	13-15-19	
EH1S1B546	7,830	0,263	0,76445	-	13-15-19	more
EH1S1B549	7,950	0,167	0,70544	-	13-15-19	
EH1S1B551	7,883	0,335	0,66630	-	13-15-19	
EH1S1B552	8,263	0,417	0,00008	***	13-15-19	
EH1S1B553	7,556	0,066	0,09666	.	13-15-19	more
EH1S1B584	7,945	0,219	0,63569	-	13-15-19	
EH1S1B585	8,067	0,405	0,03304	*	13-15-19	more
EH1S1I459	8,540	0,705	0,00000	***	13-15-19	more
EH1S1I471	7,542	0,328	0,13776	-	13-15-19	more
EH1S1I496	7,347	0,196	0,04228	*	13-15-19	
EH2S1B547	8,141	0,312	0,01346	*	13-15-19	more
EH2S1B582	7,540	0,536	0,35621	-	13-15-19	more
ES1M5S03001	8,016	0,497	0,99602	-	2-12-19	
ES1M5S03002	7,477	0,325	0,02231	*	2-12-19	
ES1M5S03003	8,073	0,184	0,78319	-	2-12-19	
ES1M5S03004	8,204	0,567	0,37189	-	2-12-19	

ES1M5S03005	7,567	0,218	0,04832	*	2-12-19	
ES1M5S03007	7,929	0,573	0,66983	-	2-12-19	
ES1M5S03009	8,078	0,135	0,76629	-	2-12-19	
ES1M5S03010	9,100	0,302	0,00029	***	2-12-19	
ES1M5S03011	8,312	0,231	0,17079	-	2-12-19	
ES1M5S03012	8,513	0,263	0,03230	*	2-12-19	less
ES1M5S03013	7,957	0,308	0,77166	-	2-12-19	
ES1M5S03015	7,771	0,315	0,24695	-	2-12-19	more
ES1M5S03018	8,488	0,626	0,04024	*	2-12-19	
ES1M5S03019	8,829	0,143	0,00228	**	2-12-19	
ES1M5S03020	8,774	0,377	0,00357	**	2-12-19	
ES1M5S03021	7,740	0,628	0,19615	-	2-12-19	
ES1M5S03022	8,079	0,471	0,76207	-	2-12-19	
ES1M5S03023	8,528	0,219	0,02850	*	2-12-19	
ES1M5S03025	7,948	0,584	0,73769	-	2-12-19	
ES1M5S03026	7,950	0,476	0,74554	-	2-12-19	
ES1M5S03028	7,575	0,628	0,05161	.	2-12-19	
ES1M5S03029	7,978	0,667	0,85145	-	2-12-19	
ES1M5S03030	8,600	0,099	0,01532	*	2-12-19	
ES1M5S03034	7,750	0,112	0,21196	-	2-12-19	
ES1M5S03037	9,024	0,311	0,00051	***	2-12-19	
ES1M5S03042	8,119	0,662	0,62120	-	2-12-19	
ES1M5S03044	8,112	0,373	0,64217	-	2-12-19	
ES1M5S03045	8,570	0,228	0,01993	*	2-12-19	
ES1M5S03046	7,986	0,047	0,88061	-	2-12-19	
ES1M5S03047	7,351	0,327	0,00763	**	2-12-19	
ES1M5S03048	7,982	0,700	0,86761	-	2-12-19	more
ES1M5S03049	8,320	0,156	0,16046	-	2-12-19	
ES1M5S03050	8,062	0,280	0,82312	-	2-12-19	
ES1M5S03051	8,253	0,587	0,26372	-	2-12-19	
ES1M5S03052	7,925	0,392	0,65644	-	2-12-19	
ES1M5S03053	8,163	0,508	0,48152	-	2-12-19	
ES1M5S03054	8,177	0,203	0,44115	-	2-12-19	
ES1M5S03055	8,660	0,403	0,00923	**	2-12-19	

ES1M5S03056	7,900	0,674	0,57396	-	2-12-19	
ES1M5S06101	7,886	0,171	0,43040	-	13-15-18	
ES1M5S06102	8,119	0,531	0,18367	-	13-15-18	
ES1M5S06103	7,833	0,103	0,21322	-	13-15-18	
ES1M5S06104	8,001	0,110	0,77345	-	13-15-18	
ES1M5S06105	8,150	0,253	0,11420	-	13-15-18	
ES1M5S06106	8,289	0,401	0,01270	*	13-15-18	more
ES1M5S06110	8,708	0,412	0,00005	***	13-15-18	
ES1M5S06111	7,963	0,392	0,93892	-	13-15-18	more
ES1M5S06112	8,147	0,306	0,12007	-	13-15-18	
ES1M5S06113	7,716	0,198	0,03514	*	13-15-18	
ES1M5S06114	8,393	0,315	0,00261	**	13-15-18	
ES1M5S06115	7,714	0,103	0,03403	*	13-15-18	
ES1M5S06116	8,360	0,360	0,00425	**	13-15-18	
ES1M5S06117	8,229	0,335	0,03307	*	13-15-18	
ES1M5S06118	8,102	0,117	0,23354	-	13-15-18	
ES1M5S06119	7,932	0,231	0,71544	-	13-15-18	
ES1M5S06120	8,266	0,361	0,01824	*	13-15-18	
ES1M5S06123	7,765	0,299	0,07569	.	13-15-18	
ES1M5S06124	8,032	0,266	0,56871	-	13-15-18	
ES1M5S06125	8,226	0,171	0,03457	*	13-15-18	more
ES1M5S06126	7,957	0,216	0,89673	-	13-15-18	
ES1M5S06127	8,168	0,197	0,08663	.	13-15-18	
ES1M5S06128	7,658	0,335	0,01381	*	13-15-18	
ES1M5S06129	7,821	0,323	0,17906	-	13-15-18	
ES1M5S06130	8,482	0,289	0,00076	***	13-15-18	more
ES1M5S06131	7,985	0,240	0,89026	-	13-15-18	more
ES1M5S06132	7,942	0,200	0,78853	-	13-15-18	
ES1M5S06133	8,444	0,578	0,00126	**	13-15-18	
ES1M5S06134	8,311	0,682	0,00904	**	13-15-18	
ES1M5S06135	8,683	0,347	0,00007	***	13-15-18	
ES1M5S06136	8,587	0,265	0,00020	***	13-15-18	
ES1M5S06137	8,107	0,243	0,21809	-	13-15-18	
ES1M5S06138	8,274	0,247	0,01610	*	13-15-18	

ES1M5S06139	8,278	0,219	0,01518	*	13-15-18	
ES1M5S06140	7,873	0,380	0,36485	-	13-15-18	more
ES1M5S06141	7,483	0,346	0,00105	**	13-15-18	
ES1M5S06142	7,897	0,035	0,48876	-	13-15-18	
ES1M5S06144	7,891	0,038	0,45750	-	13-15-18	
ES1M5S06145	7,893	0,471	0,46697	-	13-15-18	more
ES1M5S06146	8,188	0,530	0,06365	.	13-15-18	
ES1M5S06147	7,749	0,283	0,05903	.	13-15-18	
ES1M5S06148	8,076	0,289	0,33106	-	13-15-18	more
ES1M5S06149	8,341	0,060	0,00573	**	13-15-18	
ES1M5S06150	7,797	0,131	0,12493	-	13-15-18	
ES1M5S06152	8,134	0,623	0,14568	-	13-15-18	
ES1M5S10001	8,199	0,637	0,00707	**	3-14-17	less
ES1M5S10002	8,053	0,262	0,49883	-	3-14-17	
ES1M5S10003	8,211	0,298	0,02564	*	3-14-17	
ES1M5S10004	7,917	0,406	0,06448	.	3-14-17	
ES1M5S10005	8,347	0,152	0,00686	**	3-14-17	less
ES1M5S10007	7,324	0,092	0,00000	***	3-14-17	
ES1M5S10008	8,116	0,124	0,47230	-	3-14-17	
ES1M5S10009	8,095	0,171	0,97848	-	3-14-17	less
ES1M5S10010	8,157	0,109	0,21555	-	3-14-17	
ES1M5S10011	7,971	0,300	0,88316	-	3-14-17	
ES1M5S10012	8,490	0,610	0,00007	***	3-14-17	
ES1M5S10013	7,938	0,117	0,11510	-	3-14-17	
ES1M5S10015	8,062	0,331	0,31564	-	3-14-17	
ES1M5S10016	7,800	0,409	0,04693	*	3-14-17	
ES1M5S10017	8,284	0,189	0,01009	*	3-14-17	
ES1M5S10018	8,294	0,162	0,03196	*	3-14-17	
ES1M5S10019	8,085	0,396	0,59193	-	3-14-17	less
ES1M5S10020	8,509	0,113	0,00036	***	3-14-17	less
ES1M5S10021	8,042	0,260	0,65987	-	3-14-17	
ES1M5S10022	8,128	0,103	0,47165	-	3-14-17	
ES1M5S10023	8,067	0,428	0,69460	-	3-14-17	less
ES1M5S10024	7,998	0,575	0,83856	-	3-14-17	

ES1M5S10025	8,142	0,297	0,46986	-	3-14-17	less
ES1M5S10026	8,359	0,500	0,00079	***	3-14-17	
ES1M5S10027	8,703	0,567	0,00000	***	3-14-17	
ES1M5S10028	8,898	0,156	0,00000	***	3-14-17	
ES1M5S10029	8,335	0,316	0,00218	**	3-14-17	more
ES1M5S10030	8,141	0,025	0,36666	-	3-14-17	
ES1M5S10031	7,670	0,176	0,00082	***	3-14-17	
ES1M5S10032	7,984	0,375	0,77932	-	3-14-17	
ES1M5S10033	8,416	0,386	0,00059	***	3-14-17	more
ES1M5S10035	8,113	0,332	0,13751	-	3-14-17	
ES1M5S10036	7,931	0,235	0,30470	-	3-14-17	less
ES1M5S10037	7,382	0,138	0,00001	***	3-14-17	less
ES1M5S10038	8,161	0,073	0,25706	-	3-14-17	
ES1M5S10039	8,457	0,166	0,00039	***	3-14-17	
ES1M5S10040	7,991	0,216	0,27840	-	3-14-17	
ES1M5S10041	8,159	0,273	0,17750	-	3-14-17	
ES1M5S10042	8,266	0,348	0,01108	*	3-14-17	
ES1M5S10043	8,106	0,220	0,25063	-	3-14-17	
ES1M5S10044	7,760	0,594	0,02490	*	3-14-17	
ES1M5S10045	8,365	0,282	0,00125	**	3-14-17	
ES1M5S10046	7,846	0,167	0,04597	*	3-14-17	more
ES1M5S10047	8,244	0,092	0,09559	.	3-14-17	
ES1M5S10048	7,541	0,295	0,00035	***	3-14-17	
ES1M5S10051	7,773	0,338	0,00560	**	3-14-17	
ES1M5S10052	8,480	0,157	0,00054	***	3-14-17	
ES1M5S10115	7,379	0,214	0,43320	-	5-10-16	
ES1M5S10116	8,171	0,504	0,00690	**	5-10-16	less
ES1M5S10120	8,196	0,310	0,01386	*	5-10-16	
ES1M5S10121	7,906	0,173	0,10858	-	5-10-16	
ES1M5S10122	7,653	0,490	0,77310	-	5-10-16	
ES1M5S10125	8,125	0,407	0,02688	*	5-10-16	
ES1M5S10126	7,967	0,516	0,07700	.	5-10-16	
ES1M5S10127	8,039	0,295	0,09290	.	5-10-16	
ES1M5S10128	7,537	0,282	0,89010	-	5-10-16	

ES1M5S10129	8,069	0,332	0,01934	*	5-10-16	
ES1M5S10130	7,646	0,456	0,64323	-	5-10-16	
ES1M5S10133	8,041	0,174	0,05357	.	5-10-16	
ES1M5S10134	8,523	0,714	0,00514	**	5-10-16	more
ES1M5S10135	7,801	0,185	0,30304	-	5-10-16	
ES1M5S10136	7,735	0,528	0,20312	-	5-10-16	less
ES1M5S10137	8,519	0,390	0,00067	***	5-10-16	less
ES1M5S10138	7,580	0,287	0,93733	-	5-10-16	
ES1M5S10139	7,754	0,279	0,30006	-	5-10-16	
ES1M5S10140	7,804	0,454	0,45292	-	5-10-16	
ES1M5S10141	7,421	0,251	0,44974	-	5-10-16	less
ES1M5S10142	8,040	0,366	0,05097	.	5-10-16	
ES1M5S10143	7,629	0,243	0,66794	-	5-10-16	
ES1M5S10144	7,887	0,380	0,14513	-	5-10-16	
ES1M5S10145	7,885	0,225	0,14542	-	5-10-16	
ES1M5S10146	8,068	0,153	0,03562	*	5-10-16	
ES1M5S10147	7,994	0,554	0,03232	*	5-10-16	
ES1M5S10148	8,086	0,414	0,01796	*	5-10-16	less
ES1M5S10149	8,130	0,209	0,03487	*	5-10-16	
ES1M5S10150	8,051	0,435	0,01857	*	5-10-16	less
ES1M5S10151	8,015	0,689	0,02792	*	5-10-16	
ES1M5S10153	7,841	0,286	0,27740	-	5-10-16	
ES1M5S10155	7,527	0,334	0,88971	-	5-10-16	
ES1M5S10156	8,252	0,127	0,00739	**	5-10-16	
ES1M5S10158	7,786	0,275	0,28114	-	5-10-16	
ES1M5S10159	7,763	0,524	0,20893	-	5-10-16	more
ES1M5S10160	7,900	0,359	0,15190	-	5-10-16	
ES1M5S10161	7,815	0,361	0,15965	-	5-10-16	
ES1M5S10162	8,096	0,333	0,06314	.	5-10-16	
ES1M5S10163	7,885	0,420	0,09324	.	5-10-16	
ES1M5S10165	7,400	0,466	0,72769	-	5-10-16	
ES1M5S10166	7,875	0,475	0,44657	-	5-10-16	
ES1M5S10167	7,832	0,469	0,20776	-	5-10-16	
ES1M5S10168	8,336	0,264	0,00366	**	5-10-16	

ES1M5S10169	7,884	0,406	0,21705	-	5-10-16	
ES1M5S10170	8,465	0,683	0,00439	**	5-10-16	more
ES1M5S10173	8,614	0,324	0,00098	***	6-10-18	less
ES1M5S10174	8,015	0,299	0,31914	-	6-10-18	
ES1M5S10176	8,286	0,175	0,02791	*	6-10-18	
ES1M5S10177	8,147	0,830	0,11933	-	6-10-18	
ES1M5S10178	8,208	0,319	0,12069	-	6-10-18	less
ES1M5S10179	8,750	0,177	0,00050	***	6-10-18	less
ES1M5S10180	8,218	0,474	0,12258	-	6-10-18	less
ES1M5S10181	7,951	0,458	0,76096	-	6-10-18	
ES1M5S10182	8,207	0,182	0,05633	.	6-10-18	less
ES1M5S10183	8,166	0,196	0,05376	.	6-10-18	
ES1M5S10185	8,006	0,332	0,62358	-	6-10-18	less
ES1M5S10186	7,905	0,276	0,95495	-	6-10-18	
ES1M5S10189	7,894	0,233	0,67985	-	6-10-18	less
ES1M5S10190	8,221	0,163	0,08231	.	6-10-18	
ES1M5S10191	8,192	0,211	0,10589	-	6-10-18	less
ES1M5S10193	8,530	0,115	0,00234	**	6-10-18	less
ES1M5S10195	7,731	0,262	0,51310	-	6-10-18	less
ES1M5S10197	7,846	0,143	0,87639	-	6-10-18	
ES1M5S10199	7,593	0,245	0,13490	-	6-10-18	
ES1M5S10201	8,404	0,389	0,02103	*	6-10-18	less
ES1M5S10203	7,843	0,124	0,93246	-	6-10-18	
ES1M5S10204	7,977	0,247	0,59235	-	6-10-18	
ES1M5S10205	8,477	0,290	0,00233	**	6-10-18	
ES1M5S10206	8,044	0,246	0,43107	-	6-10-18	less
ES1M5S10208	8,196	0,234	0,11290	-	6-10-18	
ES1M5S10210	8,073	0,447	0,52215	-	6-10-18	
ES1M5S10211	8,369	0,388	0,01081	*	6-10-18	
ES1M5S10213	8,158	0,378	0,22104	-	6-10-18	
ES1M5S10215	8,166	0,316	0,18461	-	6-10-18	
ES1M5S10216	7,994	0,165	0,33301	-	6-10-18	
ES1M5S10217	8,463	0,252	0,00334	**	6-10-18	less
ES1M5S10219	7,980	0,274	0,62603	-	6-10-18	less

ES1M5S10221	8,697	0,502	0,00198	**	6-10-18	
ES1M5S10222	8,421	0,081	0,00818	**	6-10-18	
ES1M5S10224	8,337	0,448	0,05916	.	6-10-18	
ES1M5S10225	8,216	0,485	0,04362	*	6-10-18	
ES1M5S10226	8,407	0,489	0,00382	**	6-10-18	
ES1M5S10227	8,213	0,308	0,07629	.	6-10-18	
ES1M5S10228	8,717	0,353	0,00046	***	6-10-18	
ES1M5S10229	7,843	0,369	0,77976	-	6-10-18	
ES1M5S10231	7,897	0,289	0,68414	-	6-10-18	less
ES1M5S10234	8,068	0,180	0,30343	-	6-10-18	
ES1M5S10235	8,158	0,623	0,03844	*	6-10-18	
ES1M5S10236	8,814	0,382	0,00005	***	11-12-17	
ES1M5S10238	7,696	1,004	0,39326	-	11-12-17	less
ES1M5S10239	7,995	0,756	0,23735	-	11-12-17	
ES1M5S10240	8,168	0,805	0,03297	*	11-12-17	
ES1M5S10241	7,697	0,394	0,39628	-	11-12-17	
ES1M5S10242	7,814	0,727	0,96513	-	11-12-17	
ES1M5S10243	8,121	0,475	0,05749	.	11-12-17	
ES1M5S10244	7,811	0,200	0,95061	-	11-12-17	
ES1M5S10245	7,971	0,651	0,30217	-	11-12-17	
ES1M5S10246	7,895	0,841	0,60161	-	11-12-17	
ES1M5S10247	7,963	0,628	0,32957	-	11-12-17	
ES1M5S10252	7,775	0,605	0,74946	-	11-12-17	
ES1M5S10253	7,850	0,570	0,83277	-	11-12-17	
ES1M5S10254	7,927	0,341	0,45781	-	11-12-17	
ES1M5S10256	8,103	0,749	0,07111	.	11-12-17	
ES1M5S10258	7,878	0,484	0,68523	-	11-12-17	
ES1M5S10259	8,327	0,397	0,00514	**	11-12-17	less
ES1M5S10261	7,885	0,554	0,64778	-	11-12-17	
ES1M5S10262	8,204	0,673	0,02150	*	11-12-17	
ES1M5S10263	8,205	0,863	0,02125	*	11-12-17	
ES1M5S10264	7,763	0,676	0,68642	-	11-12-17	
ES1M5S10265	8,333	0,205	0,00481	**	11-12-17	
ES1M5S10269	7,417	0,339	0,01710	*	11-12-17	less

ES1M5S10270	7,823	0,193	0,98172	-	11-12-17	
ES1M5S10271	7,887	0,877	0,63819	-	11-12-17	
ES1M5S10272	7,753	0,251	0,63793	-	11-12-17	
ES1M5S10273	7,764	0,756	0,69537	-	11-12-17	
ES1M5S10274	8,143	0,346	0,04412	*	11-12-17	
ES1M5S10275	8,070	0,583	0,10430	-	11-12-17	less
ES1M5S10276	7,738	0,559	0,56489	-	11-12-17	
ES1M5S10277	8,143	0,369	0,04415	*	11-12-17	less
ES1M5S10278	8,126	0,614	0,05395	.	11-12-17	
ES1M5S10280	8,353	0,578	0,00386	**	11-12-17	
ES1M5S10283	8,012	0,192	0,19774	-	11-12-17	
ES1M5S10284	7,959	0,887	0,34102	-	11-12-17	
ES1M5S10285	8,490	0,441	0,00091	***	11-12-17	less
ES1M5S10288	7,683	0,424	0,34549	-	11-12-17	
ES1M5S10289	8,018	0,728	0,18659	-	11-12-17	
ES1M5S10291	7,796	0,334	0,86718	-	11-12-17	
ES1M5S10292	7,972	0,364	0,30162	-	11-12-17	less
ES1M5S10293	8,056	0,681	0,12158	-	11-12-17	
ES1M5S10294	8,426	0,426	0,00176	**	11-12-17	less
ES1M5S10295	7,940	0,509	0,40937	-	11-12-17	
ES1M5S10296	7,466	0,551	0,03038	*	11-12-17	
ES1M5S10299	7,674	0,517	0,31905	-	11-12-17	
ES1M5S10302	7,998	0,557	0,22966	-	11-12-17	
ES1M5S11001	8,166	0,524	0,36819	-	2-12-16	
ES1M5S11003	7,909	0,226	0,54407	-	2-12-16	
ES1M5S11004	7,839	0,361	0,31473	-	2-12-16	
ES1M5S11005	8,188	0,805	0,30483	-	2-12-16	
ES1M5S11006	8,397	0,154	0,04194	*	2-12-16	
ES1M5S11008	8,232	0,437	0,20893	-	2-12-16	
ES1M5S11009	8,136	0,097	0,46356	-	2-12-16	
ES1M5S11010	8,519	0,360	0,01226	*	2-12-16	
ES1M5S11011	8,297	0,481	0,11230	-	2-12-16	
ES1M5S11012	8,004	0,084	0,96221	-	2-12-16	
ES1M5S11013	7,817	0,181	0,26032	-	2-12-16	

ES1M5S11014	8,421	0,471	0,03260	*	2-12-16	
ES1M5S11015	8,213	0,398	0,24664	-	2-12-16	
ES1M5S11016	8,619	0,202	0,00461	**	2-12-16	
ES1M5S11017	8,198	0,132	0,28116	-	2-12-16	
ES1M5S11018	8,153	0,360	0,40808	-	2-12-16	
ES1M5S11024	7,997	0,307	0,92793	-	2-12-16	
ES1M5S11026	8,181	0,093	0,32442	-	2-12-16	
ES1M5S11028	7,528	0,104	0,01554	*	2-12-16	
ES1M5S11029	8,128	0,248	0,49050	-	2-12-16	
ES1M5S11030	7,932	0,208	0,63483	-	2-12-16	
ES1M5S11032	8,082	0,326	0,67467	-	2-12-16	
ES1M5S11033	8,108	0,179	0,56697	-	2-12-16	
ES1M5S11034	7,652	0,057	0,05383	.	2-12-16	more
ES1M5S11035	8,204	0,466	0,26558	-	2-12-16	
ES1M5S11037	8,528	0,070	0,01119	*	2-12-16	
ES1M5S11041	8,333	0,256	0,07944	.	2-12-16	
ES1M5S11042	7,346	0,275	0,00269	**	2-12-16	
ES1M5S11044	8,543	0,519	0,00964	**	2-12-16	
ES1M5S11045	8,087	0,109	0,65560	-	2-12-16	
ES1M5S11046	8,238	0,511	0,19661	-	2-12-16	
ES1M5S11048	7,973	0,265	0,81600	-	2-12-16	
ES1M5S11051	8,261	0,140	0,15844	-	2-12-16	
ES1M5S11053	7,793	0,290	0,21117	-	2-12-16	
ES1M5S11054	8,038	0,317	0,87325	-	2-12-16	
ES1M5S11055	8,389	0,341	0,04525	*	2-12-16	more
ES1M5S11056	8,233	0,348	0,20687	-	2-12-16	
ES1M5S11057	8,101	0,181	0,59742	-	2-12-16	
ES1M5S11059	7,922	0,284	0,59529	-	2-12-16	
ES1M5S11061	8,179	0,596	0,32897	-	2-12-16	more
ES1M5S11062	8,135	0,201	0,46750	-	2-12-16	
ES1M5S11063	8,269	0,333	0,14716	-	2-12-16	
ES1M5S11064	8,156	0,321	0,39797	-	2-12-16	
ES1M5S11065	8,584	0,251	0,00649	**	2-12-16	
ES1M5S11066	8,034	0,433	0,89359	-	2-12-16	

ES1M5S11068	8,115	0,306	0,54025	-	2-12-16	
ES1M5S11069	8,095	0,262	0,70386	-	2-12-19	
ES1M5S11070	8,173	0,228	0,45104	-	2-12-19	
ES1M5S11071	8,163	0,248	0,48204	-	2-12-19	
ES1M5S11073	8,359	0,319	0,11733	-	2-12-19	
ES1M5S11074	8,370	0,154	0,10781	-	2-12-19	
ES1M5S11075	8,475	0,403	0,04471	*	2-12-19	
ES1M5S11077	7,965	0,338	0,80109	-	2-12-19	
ES1M5S11079	8,162	0,106	0,48268	-	2-12-19	less
ES1M5S11080	7,716	0,523	0,16404	-	2-12-19	
ES1M5S11081	7,843	0,444	0,40571	-	2-12-19	

Annexe IV. Genome announcement

Genome sequences of 17 strains from 8 races of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
MRA00279-22

Caroline Bellenot, Sébastien Carrère, Carine Gris, Laurent D. Noël and Matthieu Arlat

Contribution :

Pour cette publication décrivant le séquençage et l'annotation de 17 souches de Xcc, j'ai effectué la vérification des données et produit le tableau. J'ai participé à l'écriture et à la relecture de ce manuscrit.



Genome Sequences of 17 Strains from Eight Races of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

AQ: title

AQ: au  Caroline Bellenot,^{a,b,c} Sébastien Carrère,^{a,b,c} Carine Gris,^{a,b,c} Laurent D. Noël,^{a,b,c} Matthieu Arlat^{a,b,c}AQ: info ^aINRAE, UMR 441, Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes-Environnement, Castanet-Tolosan, France
^bCNRS, UMR 2594, Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes-Environnement, Castanet-Tolosan, France
^cUniversité de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

ABSTRACT *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is a group of phytopathogenic bacteria causing black rot disease on Brassicaceae crops. Here, we report on draft genome sequences of 17 strains representing eight of nine known races of this pathogen, including the pathotype strain CFBP 6865.

AQ: B **G**enomic analysis is a powerful approach to study the diversity and evolution of virulence determinants of pathogenic bacteria (1, 2). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is the causal agent of black rot disease, affecting many crop plants from the Brassicaceae family (3).
AQ: C *X. campestris* pv. *campestris* strains have been organized into nine races based on symptoms caused on a set of host and nonhost plants (3). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) allowed the classification of *X. campestris* pv. *campestris* strains into seven genomic clades (clades A to G) (4), which is not congruent with the race classification. Here, we present
T1 the genome sequences of 17 *X. campestris* pv. *campestris* strains (Table 1), including the pathotype strain CFBP 6865. These strains were isolated from different crop varieties or subspecies
AQ: D of *Brassica oleracea* and *Brassica rapa* between 1958 and 2002, in Australia, Belgium, China, France, or Germany. They belong to four of the seven genomic clades and are representative of eight of the nine known races. All of these strains were obtained from the International Centre for Microbial Resources-French Collection for Plant-Associated Bacteria (CIRM-CFBP),
AQ: E National Research Institute for Agriculture, Food, and the Environment (INRAE).

The *X. campestris* pv. *campestris* strains were grown overnight in MOKA-rich medium (4 g/L yeast extract, 8 g/L Casamino Acids, 2 g/L K₂HPO₄, and 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O) at 28°C. From these cultures, genomic DNA was extracted with a Wizard genomic DNA purification kit (Promega). Genomic DNA libraries were prepared using a NEXTflex PCR-free DNA-sequencing kit (PerkinElmer) for most strains and a NEBNext kit (New England BioLabs) for strains CFBP 119, CFBP 4953, CFBP 4956, CFBP 6863, CN19, and CN20. All libraries were constructed following the manufacturers' instructions. *X. campestris* pv. *campestris* total genomic DNA (including chromosome and plasmids) was sequenced on an Illumina HiSeq 2000 platform (2 × 101-bp paired-end reads) or a Genome Analyzer_{ix} system (2 × 76-bp paired-end reads) (for strains CFBP 119, CFBP 4953, CFBP 4956, CFBP 6863, CN19, and CN20). Several assemblies were produced using the SOAPdenovo assembler (5) with incremental *k*-mer sizes (starting with a *k*-mer length corresponding to one-third of the read length, to a maximum of 99 nucleotides [nt], with a step of 4 nt). The resulting contigs were scaffolded using the Velvet assembler (6) (parameters: `-cov_cutoff 5 -min_contig_length 100 -max_divergence 0.05 -exportFiltered yes -exp_cov auto`) using the same *k*-mer range. A final round with SOAPGapCloser (parameter: `-p 31`) was performed to fill in the gaps, and the remaining redundancy (misassembled contigs) was removed using MegaBLAST-based identification. Genome sequences were annotated using the default parameters of the EuGene-P annotation pipeline to identify RNAs and protein-coding genes (7). The completeness of the genomes was assessed with BUSCO v5.1.2 (default parameters), using the *xanthomonadales_odb10* data set (8, 9) (Table 1).

Editor David A. Baitrus, University of Arizona
Copyright © 2022 Bellenot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
Address correspondence to Matthieu Arlat, matthieu.arlat@inrae.fr.
The authors declare no conflict of interest.
Received 18 March 2022
Accepted 16 May 2022

AQ: A

TABLE 1 Description of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains reported and statistics for the sequencing and assembly of their genomes

Strain	CFBP designation ^a	Clade ^b	Ra ce ^c	Date of isolation	Host	Country of isolation	No. of reads	Genome size (bp)	Genome coverage (X)	No. of contigs	N ₅₀ (bp)	GC content (%)	BUSCO completeness (%)	No. of coding sequences	GenBank accession no.	SRA accession no.	DOI no.
CFBP 1119	CFBP 7156	A	4	1967	<i>Brassica oleracea</i>	France	10,035,656	5,060,825	320	141	80,681	65.0	99.3	4,305	AVEU000000000.1/ SRP322641	10.25794/reference/um8maue7	
CFBP 1124	CFBP 1119	A	1	1967	<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis	France	35,046,928	5,008,837	1,063	74	183,459	64.6	99.9	4,22	CBVE000000000.1/ SRP322638	10.25794/reference/njvnm70	
CFBP 1712	CFBP 1124	C	8	1967	<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis	France	7,211,603	4,997,962	240	103	149,591	65.6	99.7	4,436	AVEV000000000.1/ SRP322639	10.25794/reference/yih1qnpb	
CFBP 1713	CFBP 1712	E	5	1975	<i>Brassica oleracea</i> cv. Capitata	France	17,215,274	5,015,961	553	129	79,498	64.9	98.6	4,461	AVDC000000000.1/ SRP322649	10.25794/reference/dnvsfr18	
CFBP 4953	CFBP 1713	E	5	1975	<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis	France	18,408,662	5,041,610	739	89	151,632	64.4	99.4	4,491	AVDM000000000.1/ SRP322642	10.25794/reference/rmbgyely	
CFBP 4954	CFBP 4953		7	1999	<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis cv. Cortes	Belgium	32,918,799	5,052,992	991	83	163,533	64.7	99.9	4,562	CBVF000000000.1/ SRP322648	10.25794/reference/nmnnv_mqq	
CFBP 4955	CFBP 4954		6	1999	<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis cv. Aviso	Belgium	6,433,757	5,073,734	204	149	66,639	65.1	99.4	4,496	AVDE000000000.1/ SRP322643	10.25794/reference/fkxlurkw	
CFBP 4956	CFBP 4955	E	9	1999	<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis cv. Aviso	Belgium	4,239,839	5,136,167	138	142	84,609	65.1	99.7	4,6	AVDF000000000.1/ SRP322645	10.25794/reference/c02vneut	
CFBP 5130	CFBP 4956		4	1999	<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis cv. Spacestar	Belgium	37,480,089	4,965,880	1,148	125	109,963	64.5	99.8	4,396	CBVG000000000.1/ SRP322646	10.25794/reference/rx9gmcmt	
CFBP 5683	CFBP 5130	A	7	1979	<i>Brassica sp.</i>	France	9,232,935	5,056,538	295	129	93,783	64.9	99.7	4,561	AVDG000000000.1/ SRP322647	10.25794/reference/016191q	
CFBP 6863	CFBP 5683	E	3	1979	<i>Brassica oleracea</i>	France	2,579,478	5,030,566	82	184	51,279	65.4	98.8	4,492	AVDH000000000.1/ SRP322644	10.25794/reference/0sr1ne3k	
CFBP 6865	CFBP 6863		9	1958	<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis	Germany	32,059,044	5,001,025	975	94	173,153	64.5	99.7	4,458	CBVH000000000.1/ SRP322661	10.25794/reference/shkh_1dj	
CFBP 6865R ^d	CFBP 6865		5	1975	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	Australia	16,397,066	5,166,940	916	24	415,646	63.7	99.6	4,657	AVDT000000000.1/ SRP322662	10.25794/reference/uce57l_	
CN01	CFBP 8237	A	1	2002	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	China	20,801,984	5,030,897	836	75	179,901	64.3	99.9	4,543	AVDN000000000.1/ SRP322694	10.25794/reference/zzeit6q	
CN10	CFBP 8244	B	7	2002	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	China	19,211,549	4,958,955	784	101	124,175	64.5	99.5	4,411	AVDR000000000.1/ SRP322708	10.25794/reference/h5nghmsn	
CN19	CFBP 8251	B	4	2002	<i>Brassica oleracea</i> var. alboglabra	China	32,316,246	4,958,083	992	113	115,047	64.4	99.5	4,422	CBVC000000000.1/ SRP322706	10.25794/reference/ez20luoj	
CN20	CFBP 8251		1	2002	<i>Brassica oleracea</i> var. alboglabra	China	31,554,774	5,084,276	944	115	116,198	64.5	99.6	4,551	CBVD000000000.1/ SRP322707	10.25794/reference/e3ex38nh	

^a Strains are available in the CIRP-CFBP (www.cirm-cfbp.fr/page/Home).

^b Clades based on AFLP of *X. campestris* pv. *campestris* strains reported by Guy et al. (4).

^c Races as described previously by Vicente and Holub (3).

^d Pathotype strain.

Data availability. The genome sequences were deposited in GenBank, and the raw reads were deposited in the Sequence Read Archive (SRA); their accession numbers are listed in Table 1. The genome annotations are available under the DOI numbers provided in Table 1.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the CIRM-CFBP for providing the strains. We are grateful to Perrine David (HM Clause, France) for the race typing of *X. campestris* pv. *campestris* strains performed in the framework of the Brassichax project (Limagrain).

C.B. was funded by a PhD grant from the ANR NEPHRON (grant ANR-18-CE20-0020-01) and CNRS. S.C., C.G., L.D.N., and M.A. were supported by the ANR XANTHOMIX (grant ANR-2010-GENM-013-02) and NEPHRON (grant ANR-18-CE20-0020-01). This study is set within the frameworks 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).

AQ: F

REFERENCES

- Allen JP, Snitkin E, Pincus NB, Hauser AR. 2021. Forest and trees: exploring bacterial virulence with genome-wide association studies and machine learning. *Trends Microbiol* 29:621–633. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.12.002>.
- Straub C, Colombi E, McCann HC. 2021. Population genomics of bacterial plant pathogens. *Phytopathology* 111:23–31. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0412-RVW>.
- Vicente JG, Holub EB. 2013. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Mol Plant Pathol* 14:2–18. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x>.
- Guy E, Genissel A, Hajri A, Chabannes M, David P, Carrere S, Lautier M, Roux B, Boureau T, Arlat M, Poussier S, Noël LD. 2013. Natural genetic variation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathogenicity on *Arabidopsis* revealed by association and reverse genetics. *mBio* 4:e00538-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00538-12>.
- Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, He G, Chen Y, Pan Q, Liu Y, Tang J, Wu G, Zhang H, Shi Y, Liu Y, Yu C, Wang B, Lu Y, Han C, Cheung DW, Yiu S-M, Peng S, Xiaoqian Z, Liu G, Liao X, Li Y, Yang H, Wang J, Lam T-W, Wang J. 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Gigascience* 1:18. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-18>.
- Zerbino DR, Birney E. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 18:821–829. <https://doi.org/10.1101/gr.074492.107>.
- Sallet E, Roux B, Sauviac L, Jardinaud M-F, Carrère S, Faraut T, de Carvalho-Niebel F, Gouzy J, Gamas P, Capela D, Bruand C, Schiex T. 2013. Next-generation annotation of prokaryotic genomes with EuGene-P: application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. *DNA Res* 20:339–354. <https://doi.org/10.1093/dnares/dst014>.
- Seppy M, Manni M, Zdobnov EM. 2019. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness, p 227–245. *In* Kollmar M (ed), *Gene prediction: methods and protocols*. Springer, New York, NY.
- Waterhouse RM, Seppy M, Simão FA, Manni M, Ioannidis P, Klioutchnikov G, Kriventseva EV, Zdobnov EM. 2018. BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. *Mol Biol Evol* 35:543–548. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx319>.