



HAL
open science

Etude du lien entre la biosynthèse de la cellulose et le contrôle de l'intégrité de la paroi végétale

Julien Renou

► **To cite this version:**

Julien Renou. Etude du lien entre la biosynthèse de la cellulose et le contrôle de l'intégrité de la paroi végétale. Biologie végétale. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS428 . tel-04334443

HAL Id: tel-04334443

<https://theses.hal.science/tel-04334443v1>

Submitted on 11 Dec 2023

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.

Etude du lien entre la biosynthèse de la cellulose et le contrôle de l'intégrité de la paroi végétale

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°567 Sciences du végétal : du gène à l'écosystème
Spécialité de doctorat : Biologie

Thèse présentée et soutenue à Versailles, le 31 octobre 2018, par

Julien Renou

Composition du Jury :

Marianne Delarue PR, Université Paris-Sud – IPS2	Présidente
Stéphanie Robert AP, Umea Plant Science Centre – SLU	Rapporteuse
Richard Berthomé CR, Toulouse Agri Campus – LIPM	Rapporteur
Olivier Van Wuytswinkel PR, Université de Picardie Jules Verne – BIOPI	Examineur
Samantha Vernhettes DR, INRA Versailles – IJPB	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Ces trois années de thèse ont été très riches d'un point de vue professionnel et personnel. De nombreuses personnes ont participé à l'accomplissement de cette expérience humaine et je tiens à les remercier.

Je souhaite tout d'abord dire un grand merci à Samantha qui m'encadré depuis mon stage de Master 2 et m'a accompagné dans mon cheminement professionnel. Merci pour ton soutien sans faille, ton aide précieuse et ta disponibilité. Tu as toujours été à l'écoute, m'aidant à résoudre mes problèmes professionnels ou personnels. Ces années de thèse en ta compagnie m'ont beaucoup apporté.

Je souhaite également remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail : Stéphanie Robert et Richard Berthomé en qualité de rapporteurs et Marianne Delarue et Olivier Van Wuytswinkel en tant qu'examineurs. Merci également aux membres de mes comités de thèse, Mathilde Fagard, Magalie Uyttewaal, Jérôme Pelloux et Sébastien Thomine pour m'avoir aidé à orienter mes travaux de recherche.

Je tiens à remercier les membres de mon équipe de la Paroi primaire, pour m'avoir éduqué en tant que jeune chercheur et avoir instauré une ambiance de travail saine et agréable au laboratoire. Merci donc à Herman pour ses idées et son enthousiasme, à Martine pour sa bienveillance, à Alexis pour sa gentillesse, à Thierry pour sa patience et son calme, à Aline et à Fabien pour leur sympathie et leur aide précieuse. I would like also to thank my non-french friends in the lab. Thank you Tia for your happiness and your kindness, Ying and Veronica for your help and thanks to all the researchers who were visiting our lab. I want to say a special thanks to Fan: you helped me so many times, always listening my problems and I know I'll miss our discussions. Je tiens enfin à remercier Marjolaine qui m'a supporté dans son bureau pendant toutes ses années. Tu as égaillé mes journées au laboratoire et je ne te remercierai jamais assez pour toute l'aide que tu m'as fournie. Que la force soit avec toi...

Merci également à toutes les personnes qui m'ont aidé de prêt ou de loin dans mes expériences. Merci à Grégory et Emilie de la plateforme de chimie pour avoir analysé mes échantillons. Merci à François, Jérôme et Laurent pour m'avoir accueilli à Amiens et m'avoir permis de réaliser des expériences dans leurs locaux. Merci à Olivier, Adeline et Katia pour m'avoir aidé en microscopie confocale. Merci aux équipes qui gèrent la culture des plantes en serre et au personnel de laverie qui m'ont facilité la tâche pour mener à bien mes expériences.

Je tiens également à remercier tous les collègues qui ont permis que ces trois ans de thèse se déroulent dans un cadre agréable. Merci aux doctorants, post-doctorants et autres non titulaires pour avoir organisé et animé des soirées, des repas et toutes sortes

d'animations après le travail. Merci aux bro', Fadi et Olivier mais aussi à Noémie, Nicolas et bien d'autres pour m'avoir soutenu et être devenu des amis précieux.

Mes remerciements vont aussi à famille et mes amis qui m'ont permis de changer d'air quand il le fallait et qui ont toujours été d'un appui indéfectible. Merci donc à mes parents, mes frères, mes grands-parents et toute ma famille d'être présents à mes côtés. Merci aux amis que je n'ai pas vus autant que j'aurai voulu pendant ces trois ans mais qui ont toujours su m'apporter soutien et réconfort (promis, je continuerai à m'habiller comme un arbre).

Enfin, merci à Isabelle qui aura été ma plus belle découverte et qui ensoleille mes journées.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
1.1. Composition de la paroi végétale.....	2
1.1.1. Cellulose	2
1.1.2. Hémicelluloses.....	4
1.1.3. Pectines	4
1.1.4. Protéines.....	6
1.1.5. Autres composés remarquables.....	7
1.2. Rôle de la paroi dans la croissance	9
1.2.1. Les mécanismes de croissance.....	9
1.2.2. Modèle d'étude pour la croissance : l'hypocotyle d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
1.3. Cellulose : biosynthèse <i>in situ</i>	15
1.3.1. Cellulose synthase (CESA).....	15
1.3.2. Transport et régulation de l'activité des CESA.....	19
1.3.3. Autres protéines accompagnant le CSC	24
1.4. Perturbation de la biosynthèse de la cellulose.....	28
1.4.1. Stress affectant la biosynthèse de cellulose.....	28
1.4.2. Inhibition chimique de la biosynthèse de cellulose	33
1.5. Le contrôle de l'intégrité pariétale.....	41
1.5.1. Signalisation lors d'une perturbation pariétale.....	41
1.5.2. Différents types de récepteurs de la paroi	43
1.5.3. Régulation de la perception de la paroi	50
1.6. Objectifs de la thèse.....	52
2. RESULTATS.....	53
2.1. Caractérisation d'un nouvel inhibiteur de la biosynthèse de la cellulose (CBI) : l'Hypostuntine.....	53
2.1.1. Résumé	53
2.1.2. Manuscrit en préparation qui sera soumis dans The Plant Cell	54
2.2. Impact des CBI sur l'organisation et la composition de la paroi	55
2.2.1. Inhibiteurs de la croissance de l'hypocotyle	55

2.2.2.	Impact des CBI sur la dynamique et la localisation du CSC.....	55
2.2.3.	Mise en évidence des modifications pariétales engendrées par les CBI avec la micro-spectroscopie FT-IR	58
2.2.4.	Impact de certains CBI sur la structure des pectines et hémicelluloses	61
2.2.5.	Etude immunohistochimique de l'impact des CBI sur l'état de méthylestérification des pectines	63
2.3.	Rôle des CESA de paroi primaire dans la résistance aux CBI.....	66
2.3.1.	Tests de résistance croisés aux CBI de mutants <i>cesa</i>	66
2.3.2.	Nouvelles constructions génétiques pour mieux comprendre le rôle des CESA dans le mode d'action des CBI	68
2.4.	Perception et voies de signalisation associées aux CBI.....	69
2.4.1.	Tests de résistance de mutants affectés pour certains récepteurs	69
2.4.2.	Détermination des voies de signalisation induites par les CBI	72
2.4.3.	Effet secondaire des CBI sur la paroi : lignification ectopique et accumulation de callose	75
3.	DISCUSSION GENERALE	77
3.1.	Un nouvel inhibiteur, l'Hypostuntine, n'agit pas comme les autres CBI identifiés	78
3.1.1.	Peut-on réellement identifier l'Hypostuntine comme un CBI ?	78
3.1.2.	Le mode d'action de l'Hypostuntine	78
3.1.3.	Conclusions et perspectives	80
3.2.	Les CBI perturbent différemment la paroi	81
3.2.1.	Différentes perturbations de la paroi par les CBI	81
3.2.2.	Comment l'impact des CBI sur la paroi est-il perçu ?.....	82
3.3.	Place des CESA de paroi primaire dans la réponse aux CBI.....	84
3.3.1.	Le CSC est-il la cible directe des CBI ?.....	84
3.3.2.	Distinction entre les isoformes de CESA	85
3.4.	Conclusion finale.....	86
4.	MATERIEL ET METHODES.....	87
4.1.	Matériel vivant.....	87
4.1.1.	Matériel végétal.....	87
4.1.2.	Conditions de culture et traitements des plantes	87
4.1.3.	Mesure des hypocotyles	88
4.1.4.	Souches et cultures bactériennes	88
4.2.	Analyses pariétales.....	89
4.2.1.	Microspectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)	89

4.2.2.	Analyses biochimiques de la paroi.....	89
4.2.3.	Empreinte des xyloglucanes par OLigo Mass Profiling (OLIMP).....	90
4.3.	Histochimie.....	91
4.3.1.	Immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les pectines	91
4.3.2.	Colorations histochimiques.....	92
4.4.	Imagerie confocale.....	93
4.4.1.	Visualisation et analyse des GFPCESA par microscopie spinning disk.....	93
4.4.2.	Visualisation des coupes immunohistochimiques.....	93
4.5.	Génotypage.....	94
4.5.1.	Extraction d'ADN génomique	94
4.5.2.	Quantification de l'ADN extrait.....	94
4.5.3.	Amplification de l'ADN par PCR (polymerase chain reaction)	94
4.5.4.	Visualisation des produits PCR sur gel d'agarose	95
4.5.5.	Séquençage de l'ADN	95
4.6.	Analyse de l'expression de gènes par RT-qPCR.....	96
4.7.	Constructions génétiques par recombinaison <i>in vitro</i>	97
4.7.1.	Mutagenèse de <i>CESA1</i> et de <i>CESA3</i>	97
4.7.2.	Transformation des bactéries par électroporation.....	97
4.7.3.	Extraction d'ADN plasmidique.....	97
4.7.4.	Transformation des plantes par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	98
4.8.	Analyses statistiques.....	98
5.	BIBLIOGRAPHIE	99

ANNEXES

ABBREVIATIONS

ABA: Acide abscissique

ACC: Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

AFM: Microscope à force atomique

AGP: Protéines de type arabinogalactane

AHK: Histidine kinases

AIR: Résidu alcool insoluble

ANOVA: Analyse de la variance

ANSES: Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ATP: Adénosine tri-phosphate

BAK1: BRI-associated kinase 1

BC1: Brittle Culm 1

BcsA: Cellulose synthase A

BcsB: Cellulose synthase B

BIN2: BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2

BR: Brassinostéroïde

BRI1: BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1

BUPS1,2: BUDDHA'S PAPER SEAL 1 et 2

BZR1: BRASSINAZOLE RESISTANT 1

C17: Compound 17

CAZymes: Carbohydrate-active enzyme

CBI: Inhibiteurs de biosynthèse de la cellulose

CBM: Carbohydrate-Binding Domain

CC: Companion of Cellulose synthase

CESA: Cellulose synthase

CGA: CGA 325'615

CME: Clathrin-mediated endocytosis

CMT: Microtubules corticaux

COB: COBRA

CRE1: Cytokinin receptor 1

CrRLK1L: *Catharanthus roseus* receptor-like kinase1-like
CSC: Complexe de cellulose synthase
CSI1: Cellulose Synthase Interacting 1
CSL: Cellulose synthase-like
CSR: Class Specific Region
CTL: Chitinase-like
CVY1: CURVY1
DAMPs: Damage-associated molecular patterns
DCB: 2,6-dichlorobenzonitrile
DMSO: Diméthylsulfoxyde
dNTP : Désoxyribonucléotides triphosphatés
ECD: Domaine extracellulaire
ECH: ECHIDNA
EGF: Epidermal Growth Factor
EPG: Endo- α (1,4)polygalacturonase
EXT: Extensines
FER: FERONIA
FLS2: Flagellin Sensing 2
FTIR: Microspectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
GalA: Acide Galacturonique
GEF: Guanine Exchange Factor
GFP: Green Fluorescent Protein
GPI: Glycosylphosphatidylinositol
GRP: Glycoprotéines riches en glycine
H/PRP: Protéines riches en hydroxyproline et proline
HERK1/HERK2: HERCULES Receptor Kinase 1 et 2
HG: Homogalacturonane
HPTS: 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt
HRAC: Herbicide Resistance Action Committee
HRGP: Glycoprotéines riches en hydroxyproline
HS: Hypostuntine
IXR1: ISOXABEN RESISTANT 1
IXR2: ISOXABEN RESISTANT 2
JA: Acide Jasmonique
KOR1: KORRIGAN 1

LLG1: Lorelei-like AGP 1
LTP: Protéine de transfert lipidique
LysM-PRR: PRR à motif de lysine
MAP: Protéine associée aux microtubules
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MASC/SmaCC: Compartiment contenant des celluloses synthases et associé aux microtubules
MBD: Microtubule Binding Domain
MCA: MID1 Complementing Activity
MHDP: m-hydroxydiphényle
MIK2: Male Discoverer 1-interacting receptor like kinase 2
MSL: Small conductance-Like
MYB46RE: MYB46-responsive cis-regulatory element
NLR: Nucleotide-binding-site-leucine-rich repeat receptor
NO: Oxyde nitrique
NST1: NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR
OG: Oligogalacturonides
OLIMP: OLigo Mass Profiling
PAE: Pectines acétyl-estérases
PAMP: Pathogen associated molecular pattern
PBS: Tampon phosphate salin
P-CR: Plant Conserved Region
PCR: Réaction en chaîne par polymérase
PDF1-2: Plant Defensin 1-2
PEPR1/2: Plant Elicitor Peptide Receptor 1/2
PG: Polygalacturonase
PI4K: Phosphatidylinositols kinases
PL: Pectate lyase
PME: Pectines méthyl-estérases
PMEI: Pectin methylesterase inhibitors
PPR: Pentatricopeptide repeat protein
PR: Pathogenesis-related protein
PRR: Pattern recognition receptors
PTI: Pattern Triggered Immunity
RALF: Rapid Alkalinisation Factors

RE: Réticulum endoplasmique
RG-I: Rhamnogalacturonane-I
RG-II: Rhamnogalacturonane-II
RIPK: RPM1-induced protein kinase
RLK: Récepteurs kinases
RLP: Récepteurs-like protéines
ROP: Rho GTPase of plant
ROS: Espèces réactive de l'oxygène
RT-qPCR: PCR quantitative en temps réel
SMRE: MYB-responsive elements
SND1: SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN
SOS5: Salt-Overly Sensitive 5
TGN: Réseau *trans*-golgien
THE1: THESEUS1
UBI4: *POLYUBIQUITINE 4*
UDP: Uridine diphosphate
WAK: Wall-associated kinases
XTH: Xyloglucanes transglycosylase/hydrolase
YFP: Yellow Fluorescent Protein

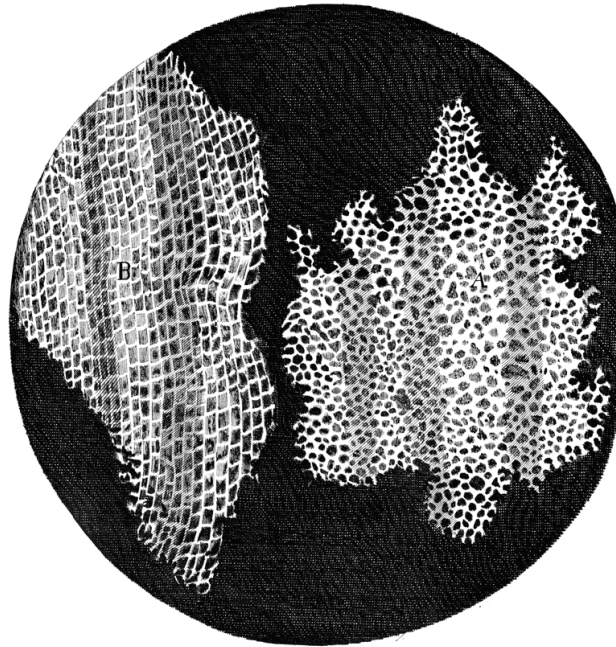


Figure 1. Dessin de la première observation de cellules au microscope

Ce dessin représente l'observation de coupes transversale (A) et longitudinale (B) d'un morceau de liège. En 1665, Robert Hooke décrit dans son ouvrage *Micrographia* y décrit des cellules entourées de parois, identifiant pour la première fois ces structures chez les végétaux.

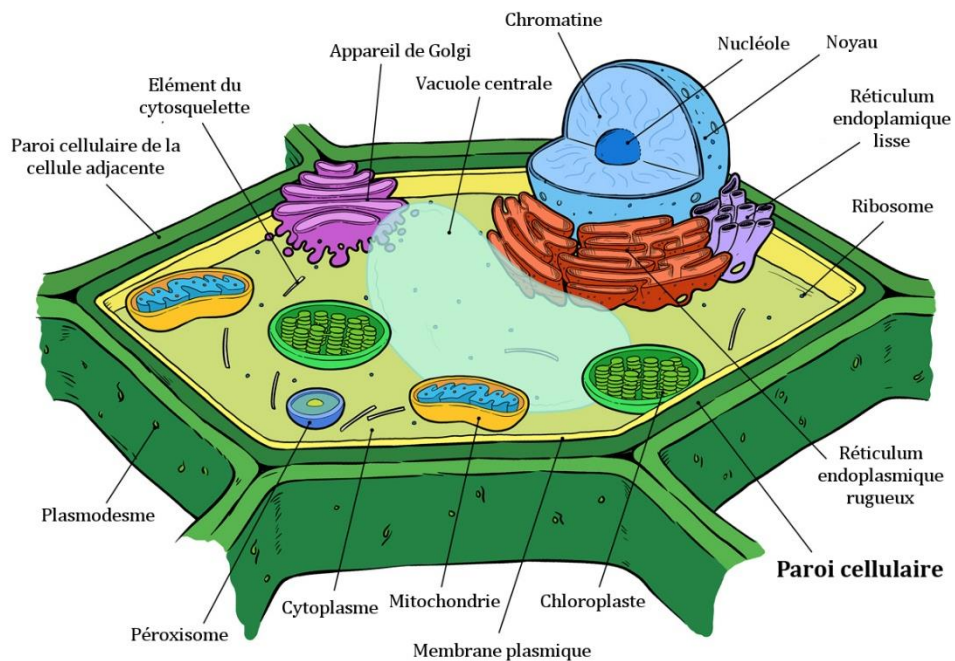


Figure 2. Schéma d'une cellule végétale

La cellule végétale est constituée de différents compartiments caractéristiques. Elle est entourée d'une paroi qui est séparée des parois des cellules adjacentes par la lamelle moyenne. Illustration adaptée de Tim Vandevall

1. INTRODUCTION

Les végétaux sont des organismes photosynthétiques qui jouent un rôle majeur dans les écosystèmes. Comme pour tout être vivant, l'unité fonctionnelle de base des plantes est la cellule. Elle est décrite pour la première fois par Robert C. Hooke qui observa des coupes de liège grâce à un microscope rudimentaire (Hooke, 1665) (Figure 1). Il identifia alors des structures lui rappelant les cellules d'un monastère délimitées par des parois. Ainsi, la notion de cellule fut inventée et en même temps, la première paroi végétale fut décrite dans la littérature. Cet élément structural entourant la cellule est une caractéristique du règne végétal même si d'autres organismes comme les procaryotes ou les mycètes possèdent leur propre version de paroi. Au cours de l'évolution, la paroi des végétaux s'est modifiée pour s'adapter à leur environnement (Sørensen et al., 2010). On retrouve donc aujourd'hui une grande diversité en termes de composition et de structure des parois végétales (Popper et al., 2011).

Chaque cellule végétale est entourée d'une paroi qui assure un soutien mécanique permettant le maintien de l'organisme entier (Boudaoud, 2010) (Figure 2). En effet, contrairement aux animaux, les plantes sont peu mobiles et ne possèdent pas de squelette, exosquelette ou structure analogue. La paroi végétale va alors permettre d'isoler partiellement et de protéger les cellules de l'environnement extérieur, source de stress. D'un autre côté, la rigidité pariétale permet de s'opposer à la pression de turgescence interne aux cellules qui ont tendance à repousser les limites de celles-ci (Niklas, 1992). C'est ce support mécanique assuré par la paroi qui permet aux végétaux de résister à la force de gravité et explique que certains Séquoia géants puissent atteindre des hauteurs de plus de 90 m.

La paroi végétale est également très dynamique et a la capacité d'évoluer en fonction des besoins de la plante. Lors de la croissance, les cellules grandissent en même temps que leurs parois. La synthèse pariétale est alors constante et de nouveaux constituants peuvent être ajoutés. En modulant la composition et la structure de cette paroi néoformée, il est alors possible d'influencer le taux de croissance, la forme des cellules et de répondre à des stress biotiques (e.g. pathogènes ou herbivores) ou abiotiques (e.g. hydrique, thermique, salin) (Tenhaken, 2014 ; Lionetti, Métraux, 2014).

Une part importante de la biomasse terrestre provient des plantes et la paroi végétale en particulier représente une source de carbone renouvelable considérable (Verbančič et al., 2018). Elle constitue une part élevée du bois, des céréales et des autres plantes cultivées. L'ingénierie liée à la paroi végétale a donc un fort intérêt du point de vue agronomique et pour de nombreuses industries : papeterie, matériaux de construction, alimentation et biocarburants. L'étude des mécanismes de synthèse, de remodelage et de dégradation de la paroi végétale s'inscrit donc dans ce contexte économique afin d'améliorer la qualité, le rendement et de pérenniser la production de biomasse dans une situation de stress environnementaux (Burton, Fincher, 2014 ; Pauly, Keegstra, 2008).

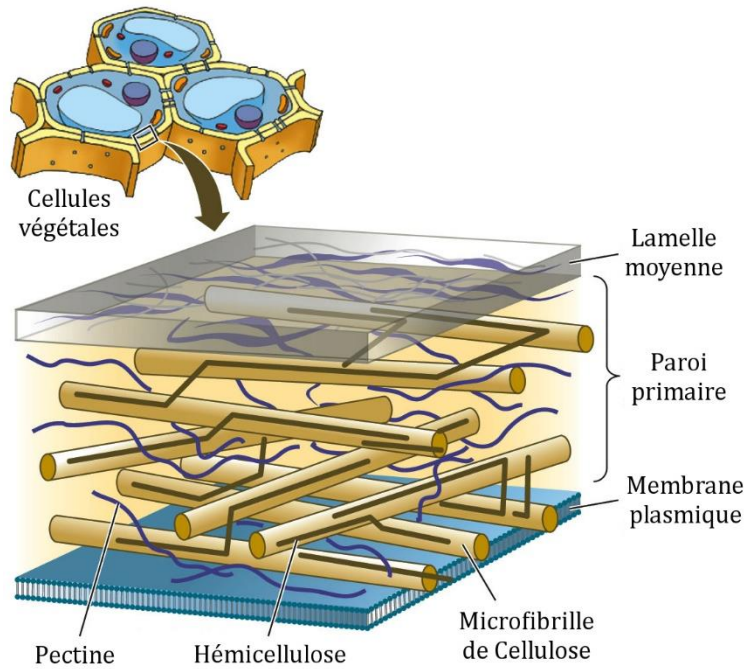


Figure 3. Structure simplifiée de la paroi primaire

Schéma de la paroi primaire représentant les trois polysaccharides majeurs qui la compose : cellulose, hémicelluloses et pectines. Adapté de *Life, The Science of Biology* (9^{ème} ed., Sinauser Associates)

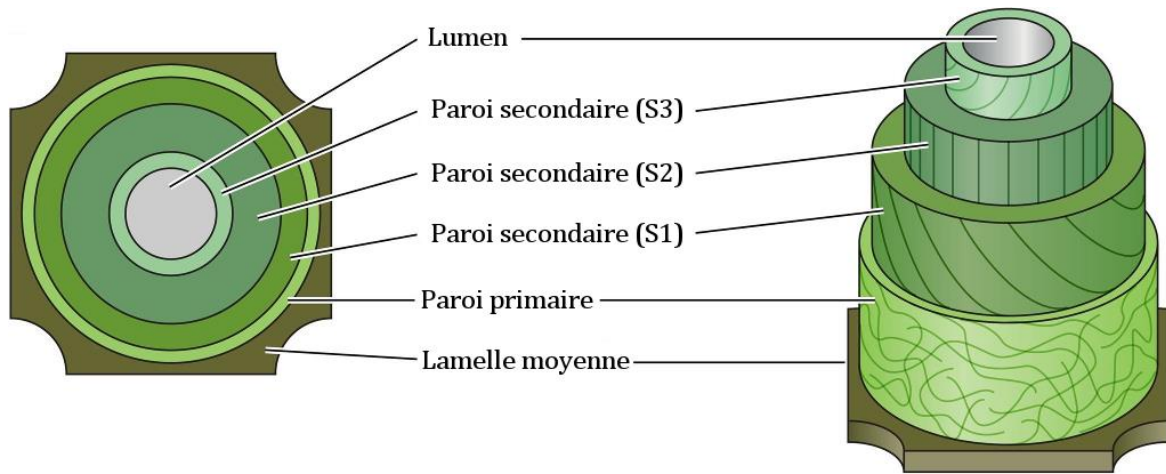


Figure 4. Structure simplifiée de la paroi secondaire

La paroi secondaire est accolée à la paroi primaire et généralement composée de différentes couches ajoutées successivement. Echelle non représentative, adapté de Rytioja et al. (2014)

1.1. Composition de la paroi végétale

Même si la composition de la paroi diffère selon l'espèce, le stade de développement et l'état de stress de la plante, sa structure est composée majoritairement d'eau et d'un enchevêtrement de polysaccharides, glucides complexes constitués d'un assemblage d'oses simples. Trois polysaccharides sont majoritaires dans la paroi : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines (Figure 3). Des protéines, des ions et d'autres composés d'incrustation telles les lignines, la callose, la subérine ou des cires peuvent aussi la composer.

Deux types de paroi sont définies et ont des compositions différentes : la paroi primaire qui est caractéristique des jeunes cellules qui se divisent et s'allongent et la paroi secondaire est déposée lorsque cet allongement est terminé. La paroi primaire correspond en masse sèche à 15-40% de cellulose, 30-50% de pectines et 20-30% d'hémicelluloses (Cosgrove, Jarvis, 2012) (Figure 3). Ces proportions ainsi que le type d'hémicelluloses ou de pectines varient beaucoup selon les espèces (Doblin et al., 2010). A la suite de la mitose, les deux cellules se séparent en formant une cloison appelée la lamelle moyenne (Sticklen, 2008). Cette dernière est essentiellement composée de pectines et dépourvue de cellulose (Knox et al., 1990). Elle assure la cohésion cellulaire mais peut aussi permettre des échanges intracellulaires du fait de la présence de jonctions entre les cellules, les plasmodesmes (Keegstra, 2010). La paroi secondaire apparaît quant à elle lorsque que la cellule est mature, à la fin de l'expansion cellulaire. Elle n'est visible que dans certains tissus et va se superposer à la paroi primaire vers l'intérieur de la cellule (Figure 4). Elle est faiblement hydratée et la synthèse de ses constituants est coordonnée et diffère de la paroi primaire (Meents et al., 2018). On y retrouve notamment 60 à 98% de cellulose, responsable d'une rigidité accrue. Lors de la formation de la paroi secondaire, des lignines vont imprégner progressivement toute la paroi (Fromm et al., 2003). La cellule a alors atteint sa taille finale et la lignification entraîne son asphyxie. Il ne reste plus qu'une paroi rigide et épaisse qui devient imperméable : c'est le cas par exemple des vaisseaux conducteurs de sève.

1.1.1. Cellulose

La cellulose est le composé majoritaire de la paroi végétale puisqu'elle représente jusqu'à 98% de la paroi totale en masse sèche (Meinert, Delmer, 1977). Elle est présente dès la formation de la plaque cellulaire lors des divisions cellulaires (Miart et al., 2014). C'est le polymère d'origine organique le plus abondant sur terre avec une production par la biosphère de plusieurs centaines de milliards de tonnes par an. Il est synthétisé par de nombreux organismes, des procaryotes comme *Escherichia coli* ou les cyanobactéries jusqu'aux eucaryotes avec certains mycètes et bien évidemment les plantes. Au cours de l'évolution, la capacité à synthétiser la cellulose a donc été conservée et a certainement conféré un avantage indéniable pour la survie des espèces.

D'un point de vue chimique, la cellulose est un homopolymère puisque les monomères qui la composent sont de même nature. C'est un β -1,4-glucane c'est-à-dire

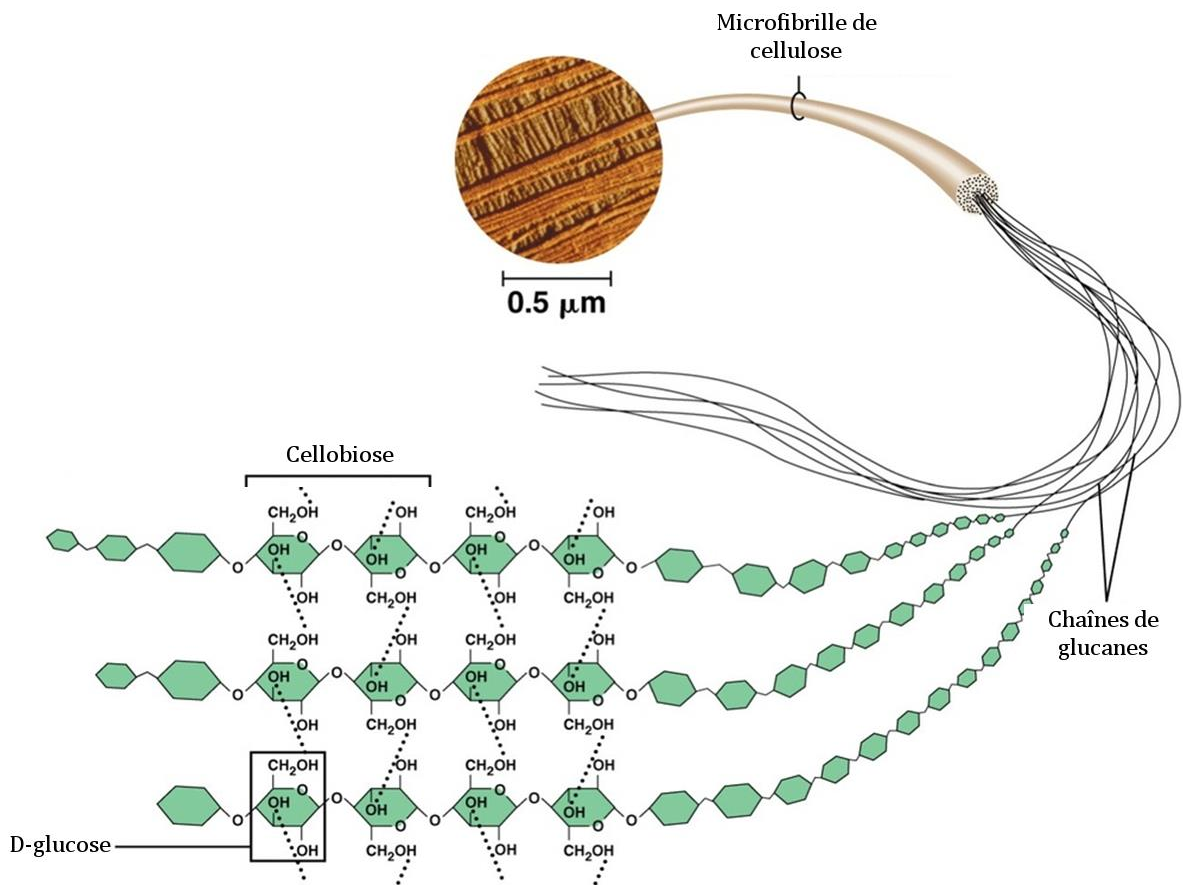


Figure 5. La cellulose, un homopolymère de glucose

Les microfibrilles de cellulose sont constituées de chaînes de glucanes. Les monomères de D-glucose sont liés par des liaisons de type β-1,4 et le motif élémentaire de la cellulose est appelé cellobiose. Adapté de © 2011 Pearson Education, Inc.

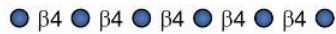
qu'elle est composée d'un enchaînement de D-glucoses liés les uns aux autres par des liaisons de type β -1,4 (Figure 5). Ce genre de liaison s'explique par le fait que chaque glucose est positionné à 180° par rapport à son voisin. Le motif élémentaire de ce polymère correspond donc à ce dimère de glucoses et est appelé cellobiose. Le degré de polymérisation c'est-à-dire le nombre de glucoses par chaîne est très variable et influe sur la résistance du polymère : de 500 monomères dans la paroi des jeunes cellules en développement jusqu'à 10 000 dans les fibres de coton.

La cellulose a la particularité d'être synthétisée *in situ* directement au niveau de la membrane plasmique. Plusieurs chaînes de glucoses sont alors polymérisées en même temps et vont pouvoir s'assembler via des liaisons faibles pour former des microfibrilles (Figure 5). Ces dernières constituent un réseau qui va charpenter la paroi végétale. Le nombre de chaînes par microfibrilles n'est pas clairement établi (Nixon et al., 2016). Des observations par microscopie électronique de parois primaires du cotonnier et du rosier suggèrent que les microfibrilles de cellulose sont composées de 12 à 25 chaînes (Chanzy et al., 1978, 1979). Des études plus récentes de cristallographie par diffraction aux rayons X et par résonance magnétique nucléaire en phase solide montrent que les microfibrilles de cellulose comprennent entre 18 ou 24 chaînes chez les plantes supérieures (Newman et al., 2013 ; Fernandes et al., 2011 ; Wang, Hong, 2015). Enfin, Vandavasi et al. (2016) ont étudié la formation *in vitro* du complexe permettant la synthèse de cellulose dans la paroi primaire et en ont déduit un modèle avec des microfibrilles de 18 chaînes de glucoses. Il est cependant tout à fait envisageable que ce paramètre évolue selon les types de parois, de cellules ou d'espèces considérées.

Enfin, un autre paramètre important de la cellulose est sa cristallinité (Nishiyama, 2009 ; Höfte et al., 2007). La cellulose contient de nombreux groupes hydroxyle qui engendrent des liaisons hydrogènes inter- et intra-moléculaires. La cellulose va alors adopter une forme semi-cristalline avec des zones dites cristallines où les chaînes de glucoses sont bien organisées et liées entre elles et des zones dites amorphes, vers l'extérieur des microfibrilles, où les chaînes sont désorganisées. On distingue d'ailleurs en chimie différents types de cellulose cristalline selon leur profil de diffraction aux rayons X (Pérez, Mazeau, 2004). Celle de type I est la cellulose native, présente chez les êtres vivants et se décline sous la forme $I\alpha$ et $I\beta$. Ces deux formes se distinguent par leur profil de liaisons hydrogènes et sont souvent toutes deux présentes en même temps. La forme $I\beta$ est plutôt prédominante chez les plantes terrestres tandis que la forme $I\alpha$ est plus détectée au niveau de la cellulose des algues et des bactéries. La cellulose de type II dite régénérée est obtenue à partir de solutions ou par mercerisation de la cellulose I (procédé industriel). Elle est beaucoup plus stable que la cellulose I. Les celluloses de type III et IV sont obtenues par traitement des deux premières et ont aussi une bonne stabilité.

L'orientation des microfibrilles est aussi un autre paramètre fondamental pour contrôler la croissance anisotrope (voir partie 1.2.1). Pendant l'élongation cellulaire, les microfibrilles de cellulose sont déposées en couches successives et les orientations de ces

Cellulose



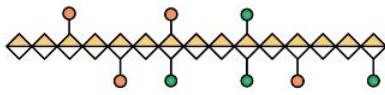
Callose



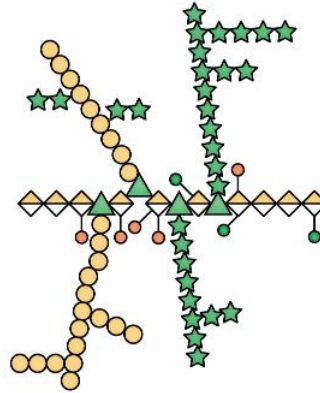
Xyloglucane



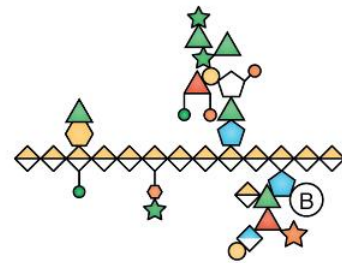
Homogalacturonane



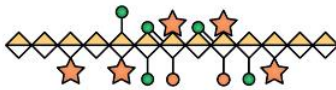
Rhamnogalacturonane I



Rhamnogalacturonane II



Xylogalacturonane



Monomères et décorations

GalA	Gal	Rha	Ara	O-Acetyl
Borate	Fuc	Kdo	GlcA	O-Methyl
Ace	Apio	Xyl	Glc	

Figure 6. Structure des principaux polysaccharides de la paroi

La cellulose, les hémicelluloses (principalement Xyloglucane) et les pectines (dont Homogalacturonane, Rhamnogalacturonane I et II ainsi que Xylogalacturonane) sont composés de différents monomères et décorations, assemblés en chaînes linéaires ou ramifiées. Abréviations : GalA = acide galacturonique, Gal = galactose, Rha = rhamnose, Ara = arabinose, Fuc = fucose, Kdo = acide 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonique, GlcA = acide glucuronique, Ace = acide acérique, Xyl = xylose, Glc = Glucose. Adapté de Lampugnani et al. (2018)

couches changent progressivement ce qui permet de créer des parois polylamellées (Refrégier et al., 2004 ; Anderson et al., 2009). Il a été montré que les microfibrilles de cellulose de la face externe des cellules de l'épiderme de l'hypocotyle cultivé à la lumière sont déposées en parallèle des microtubules corticaux (CMT). Et les CMT subissent des rotations qui pourraient expliquer la structure polylamellée de la paroi (Chan et al., 2007 ; Lloyd, Chan, 2008 ; Chan et al., 2010) (voir aussi Figure 36 – chapitre Résultats). Pendant la formation du bois, les microfibrilles de cellulose sont aussi déposées au niveau de la paroi secondaire en trois couches consécutives (S1, S2 et S3) (Figure 4). A l'intérieur de chaque couche, les microfibrilles sont hautement organisées et parallèles et de la même façon que pour le dépôt de la paroi primaire, les angles sont différents entre les différentes couches (Plomion et al., 2001 ; Doblin et al., 2010 ; Zhong, Ye, 2015). Cette organisation peut néanmoins changer chez certaines espèces végétales ou en fonction des conditions environnementales.

1.1.2. Hémicelluloses

Les hémicelluloses correspondent à un groupe de polysaccharides très variés. Ils représentent à eux seuls jusqu'à 50% de la paroi totale (en masse sèche). Ce sont des hétéropolymères de nombreux monosaccharides et on retrouve des xyloglucanes, des xylanes, des glucomannanes, des mannanes ou encore des β -1,3/ β -1,4-glucanes (Scheller, Ulvskov, 2010). Pour les dicotylédones comme *Arabidopsis thaliana*, les hémicelluloses majoritaires de la paroi primaire sont les xyloglucanes (Figure 6). Contrairement à la cellulose, la polymérisation des hémicelluloses se déroule dans l'appareil de Golgi grâce à différentes enzymes dont celles de la famille des cellulose synthases-like (CSL) (Pauly et al., 2013). En ce qui concerne les xyloglucanes, les CSL C s'associent à la membrane golgienne avec des xylosyltransférases pour constituer le squelette du polysaccharide. De nombreuses autres enzymes vont alors permettre d'ajouter les décorations jusqu'à la libération du polymère dans la paroi (Pauly, Keegstra, 2016). D'un point de vue mécanique, les hémicelluloses sont très peu cristallisés mais sont capables d'interagir avec les microfibrilles de cellulose via des liaisons faibles. Plusieurs hypothèses sont envisagées pour expliquer le lien direct ou indirect entre les hémicelluloses et la cellulose (D J Cosgrove, 2005), notamment des liaisons hydrogènes ou le piégeage des hémicelluloses dans les microfibrilles en formation. Des études récentes proposent un modèle avec des points de jonctions entre cellulose et hémicellulose (Cosgrove, 2018 ; Daniel J. Cosgrove, 2016 ; Zhang et al., 2015). A ces endroits précis, les polymères sont fortement liés et permettent de former un réseau solide responsable en partie des propriétés biomécaniques de la paroi.

1.1.3. Pectines

Les pectines correspondent à un groupe complexe de polysaccharides composant 30 à 50% de la paroi totale. Elles sont aussi le composant majoritaire de la lamelle moyenne. Le monomère majoritaire des pectines est l'acide galacturonique. Comme les

hémicelluloses, les pectines peuvent présenter des motifs saccharidiques avec des chaînes latérales composées de différents sucres.

Trois types de pectines sont majoritairement présents chez les plantes : les homogalacturonanes (HG), les rhamnogalacturonanes I (RG-I) et les rhamnogalacturonanes II (RG-II) (Figure 6). Des décorations de xyloses sur des HG ont également pu être identifiées chez *Arabidopsis thaliana* mais la fonction de ces xylogalacturonanes n'est à ce jour pas définie (Zandleven et al., 2007). La structure des pectines est en tout cas très dépendante du type cellulaire et des espèces considérés. Les HG sont des homopolymères d'acides galacturoniques avec des liaisons α -1,4 et sont les plus abondants dans la paroi chez la plupart des végétaux. Ils peuvent être décorés de groupes méthyle en C6 ou acétyle en C2 et C3 (Ridley et al., 2001). Les HG sont polymérisés comme les autres pectines dans l'appareil de Golgi et secrétés dans la paroi sous une forme hautement méthylestérifiée et acétylée. Il a d'ailleurs été montré que les protéines ECHIDNA (ECH) et les protéines YIP4 sont nécessaires pour la sécrétion à la fois des pectines et des xyloglucanes, via le réseau *trans*-golgien (TGN) (Gendre et al., 2011, 2013). Les HG sont par la suite plus ou moins déméthylestérifiés et déacétylés grâce à différentes enzymes de la paroi : respectivement les pectines méthyl-estérases (PME) et pectines acétyl-estérases (PAE) (Senechal et al., 2014 ; Ludivine Hocq et al., 2017). Les rhamnogalacturonanes sont quant à eux des hétéropolymères formés de différents saccharides dont l'acide galacturonique et le L-rhamnose. Les RG-I ont des chaînes latérales simples composées d'arabinanes, de galactanes ou d'arabinogalactanes tandis que les RG-II ont beaucoup d'embranchements et peuvent être composés de 12 monosaccharides différents (Saffer, 2018).

Les pectines ont la capacité de retenir l'eau et former ainsi un gel qui va imprégner la paroi végétale. En effet, les monomères d'acides galacturoniques sont chargés négativement et vont avoir tendance à se lier aux molécules d'eau. Des ions calcium (Ca^{2+}) présents dans la paroi, se lient notamment aux groupes carboxyles des HG déméthylestérifiés, liant ainsi les pectines entre elles (Grant et al., 1973 ; Morris et al., 1982). Ces structures dites en « boîte à œuf » emprisonnent davantage les molécules d'eau, ce qui crée un gel pectique. Un autre phénomène responsable de la liaison des pectines entre elles est la présence d'ions borate (B^-) réagissant avec les monomères de D-apioses des RG-II (O'Neill et al., 2001). Enfin, les pectines peuvent aussi interagir avec la cellulose et les hémicelluloses *in vitro* (Zykwinska et al., 2005 ; Cornuault et al., 2015). Si les pectines et les hémicelluloses se lient toutes deux aux microfibrilles de cellulose, leur participation aux propriétés biomécaniques de la paroi pourrait être redondante et expliquerait par exemple qu'en réduisant la quantité de HG, les xyloglucanes deviennent plus rigides (Phyo et al., 2017 ; Saffer, 2018).

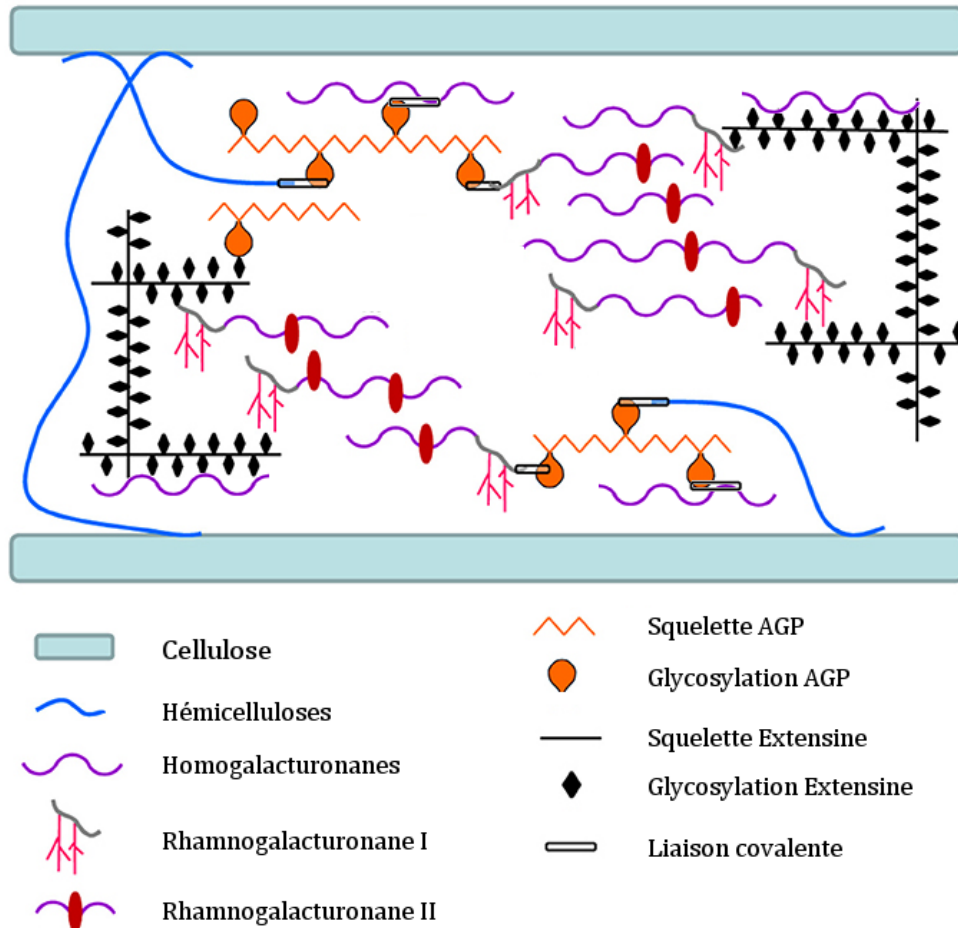


Figure 7. Schéma illustrant les interactions entre les polysaccharides pariétaux et les protéines structurales

Ce modèle résume les différentes interactions supposées ou démontrées entre les protéines riches en hydroxyproline (HRGP) et les polysaccharides pariétaux. Les glycosylations de ces protéines structurales leur permettraient de se lier avec les pectines (Homogalacturonanes, Rhamnogalacturonanes I et II) et les hémicelluloses. AGP : Arabinogalactane protéine. Adapté de Hijazi et al. 2014

1.1.4. Protéines

Des protéines sont aussi présentes dans la paroi avec des proportions de l'ordre de 5 à 10% (en masse sèche). Elles interagissent souvent avec les polysaccharides et ont des rôles très variés dont beaucoup sont encore inconnus.

1.1.4.1. Protéines structurales

De nombreuses protéines dans la paroi n'ont pas d'activité enzymatique connue mais sont fortement glycosylées et peuvent alors interagir avec les polysaccharides pariétaux (Figure 7). On distingue plusieurs familles de protéines structurales avec les glycoprotéines riches en glycine (GRP) et celles riches en hydroxyproline (HRGP). Cette dernière famille est généralement subdivisée en trois catégories : les extensines (EXT), les protéines de type arabinogalactane (AGP) et les protéines riches à la fois en hydroxyproline et proline (H/PRP). Toutes ces protéines ont des degrés de glycosylation variables mais nécessaires pour leur fonctionnement (Velasquez et al., 2011 ; Showalter, Basu, 2016). En ce qui concerne les GRP, leurs structures sont diverses mais elles contiennent toutes plus de 60% de glycine en motifs répétés (Ringli et al., 2001). La fonction des GRP dans la paroi n'est pas clairement connue mais il a été montré qu'elles pouvaient jouer un rôle dans la perception et la tolérance à plusieurs stress biotiques ou abiotiques (Czolpinska, Rurek, 2018).

Les HRGP ont été beaucoup plus étudiés et correspondent à une très large famille protéique (Hijazi et al., 2014). De nombreuses analyses mettent en évidence le rôle des EXT dans la rigidité de la paroi (Lamport et al., 2011). Elles présentent des glycosylations au niveau de motifs serine-hydroxyproline fortement répétés ainsi que des tyrosines leur conférant à l'instar du collagène des animaux, la possibilité de se lier entre elles (Epstein, Lamport, 1984 ; Velasquez et al., 2011). Ces liaisons irréversibles sont induites par des peroxydases en présence de H₂O₂ et peuvent être favorisées lors de stress biotiques pour rigidifier la paroi (Bradley et al., 1992 ; Raggi et al., 2015). De plus, les EXT contiennent des lysines positivement chargés qui pourraient se lier avec les groupes carboxyles des HG chargés négativement. Cela a été observé *in vitro* et lors de la formation de la nouvelle paroi en fin de division cellulaire (Valentin et al., 2010 ; Cannon et al., 2008). Chormova et Fry (2016) ont également montré que les EXT pouvaient favoriser *in vitro* la dimérisation des RG-II via l'utilisation d'ions B⁻.

Les AGP contiennent jusqu'à 90% de glucides ainsi que des motifs alanine/serine-hydroxyproline. Ils contribuent aussi à la rigidité pariétale et des travaux récents ont montré qu'ils peuvent se lier aux EXT via des ions Ca²⁺ ou B⁻ (Tan et al., 2018). Les interactions entre AGP et polysaccharides sont possibles : les résidus rhamnose des AGP avec les pectines de type RG-I ou HG et des résidus arabinose avec des hémicelluloses (Hijazi et al., 2014). Griffiths et al. (2014) ont montré qu'une protéine chimérique contenant un domaine AGP, SOS5 (Salt-Overly Sensitive 5), peut interagir avec les pectines pour moduler l'adhérence du mucilage dans la graine. Ces résultats

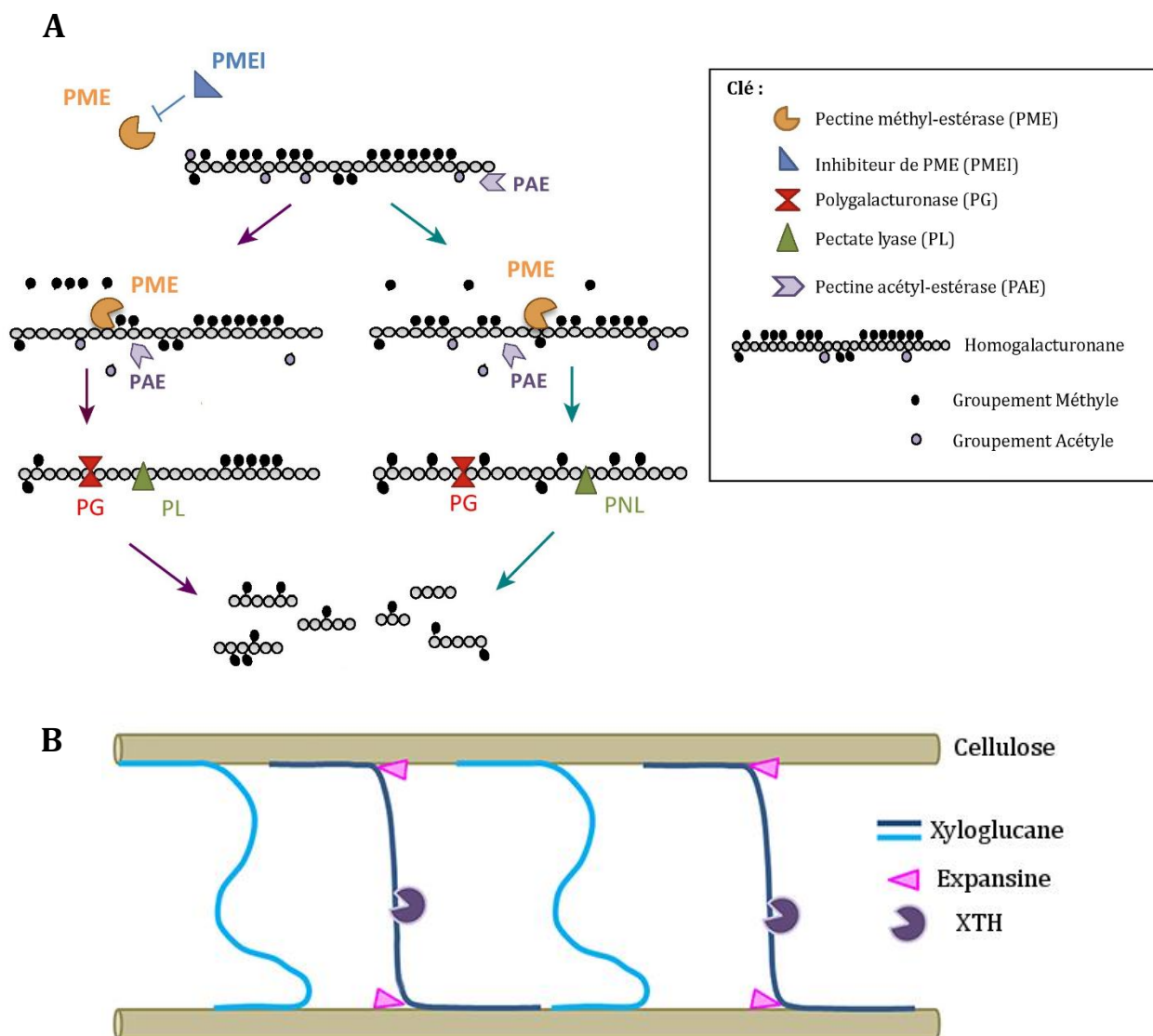


Figure 8. Mode d'action des protéines remodelant la paroi

(A) Enzymes agissant sur les homogalacturonanes Il existe deux possibilités : à gauche, la déméthylestérification s'opère en bloc (flèches violettes) tandis qu'à droite, elle s'effectue aléatoirement (flèches bleues). Les PG et PL agissent par la suite. Adapté de Hocq et al. 2017

(B) Protéines agissant sur les hémicelluloses (Xyloglucanes majoritairement). Les xyloglucanes transglycosylases/hydrolases (XTH) hydrolysent le polymère tandis que certaines expansines ont un rôle supposé dans la liaison entre cellulose et xyloglucane. Adapté de Tenhaken et al. 2015

montrent l'importance de ces protéines structurales dans le développement à travers la modulation de la structure pariétale.

1.1.4.2. Enzymes de remodelage pariétal

La paroi végétale étant une structure changeante, de nombreuses enzymes y sont présentes. Certains constituants comme la cellulose sont synthétisés directement dans la paroi - *in muro* - à l'aide d'enzymes qui vont par exemple gérer la polymérisation et l'agencement des polymères. A l'inverse d'autres enzymes pourront dégrader ou modifier les polysaccharides afin d'ajuster la composition de la paroi et réguler son expansion (Ludivine Hocq et al., 2017 ; Daniel J. Cosgrove, 2016). On retrouve pour les HG les PME et PAE régulant l'état de méthylestérification et d'acétylation, les polygalacturonases (PG) et pectate lyases (PL) digérant les polymères. Ces enzymes agissent en synergie dans la paroi, régulant finement la matrice de pectines (Sénéchal et al., 2014) (Figure 8A). En ce qui concerne les hémicelluloses et en particulier les xyloglucanes, on trouve les xyloglucanes transglycosylases/hydrolases (XTH) qui coupent le polymère et permettent son remodelage ainsi que d'autres enzymes hydrolysant les décorations (Pauly et al., 2013) (Figure 8B). Enfin plusieurs cellulases ou endo- β 1,4-glucanases ont été identifiées chez les plantes et sont capables d'hydrolyser en partie la cellulose lors du développement (Daniel J Cosgrove, 2016). L'une d'entre elles prend d'ailleurs part à la biosynthèse du polymère (voir partie 1.3.3.1)

Une autre famille de protéines participant au remodelage de la paroi est celle des expansines. Elles favorisent la croissance cellulaire et ont un optimum d'activité en milieu acide. Leur fonction précise d'un point de vue moléculaire n'est pas clairement définie (Daniel J Cosgrove, 2016). Plusieurs études laissent à penser qu'elles affaibliraient les liaisons non covalentes entre les polysaccharides (Daniel J. Cosgrove, 2005). On distingue les α et β -expansines selon leur rôle supposé. Les premières entraînent le relâchement de la paroi sans activité catalytique démontrée tandis que les dernières interagissent avec certains hémicelluloses en solubilisant des HG et des arabinoxylanes chez les graminées (Tabuchi et al., 2011 ; Daniel J Cosgrove, 2016). Il a cependant été montré que les expansines interagissaient avec les microfibrilles de cellulose (Georgelis et al., 2012 ; T Wang et al., 2013). Tout ceci laisse penser que les expansines pourraient déstabiliser les liaisons non covalentes entre la cellulose et les autres constituants pariétaux (Cosgrove, 2018) (Figure 8B).

1.1.5. Autres composés remarquables

Certains composants sont plus accessoires et vont être uniquement présents dans la paroi de certains tissus ou à certains stades de développement. L'état de stress de la plante peut également engendrer la production de composants moins communs.

1.1.5.1. Callose

La callose est un polysaccharide présent dans la paroi végétale au niveau de cellules spécialisées et/ou lors de stress. C'est un homopolymère constitué de D-glucoses liés par

des liaisons de type β -1.3 avec certains embranchements en β -1.6. Tout comme la cellulose, la callose s'assemble au niveau de la membrane plasmique sous forme de microfibrilles mais moins bien organisées que celles observées pour la cellulose (Chen, Kim, 2009). Une famille d'enzymes, les callose synthases, sont responsables de sa biosynthèse et il a été montré récemment qu'elle pouvait être coordonnée avec la synthèse de cellulose (Schneider et al., 2016).

Chez les plantes supérieures, la callose est notamment impliquée dans des processus liés au développement : lors de la formation de la plaque cellulaire pour la division des cellules (Thiele et al., 2009), dans la paroi du grain de pollen et pour la formation du tube pollinique (Shi et al., 2016) ou encore pour réguler l'ouverture de pores dont les plasmodesmes (De Storme, Geelen, 2014) ou les stomates (Galatis, Apostolakis, 2010). Il a été montré que la callose pouvait être produite de manière ectopique au niveau de la paroi lors de stress biotiques ou abiotiques. L'exemple le plus flagrant est la formation de papilles majoritairement constituées de callose lors d'infection par des mycètes (Ellinger et al., 2013). Le pathogène cherche à pénétrer dans les cellules via leur appressorium et la callose située en dessous va permettre aux cellules de renforcer leur paroi et d'apporter une résistance à l'invasion. Nishimura et al. (2003) ont montré que la mutation d'une callose synthase pouvait de façon surprenante aussi augmenter la résistance au pathogène en activant les voies de signalisation de l'acide salicylique.

1.1.5.2. Lignines

Les lignines sont des polymères de nature phénolique qui constituent les parois des spermaphytes uniquement. Présentes dans les cellules du bois, elles présentent un intérêt pour de nombreuses industries. Trois types de phénylpropanoïdes composent majoritairement les lignines : les alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique. Les proportions et l'agencement de ces monolignols varient très fortement selon le type de paroi (on distingue alors différentes lignines). La voie de biosynthèse de ces unités est complexe, dérive de la phénylalanine et est hautement régulée (Barros et al., 2015).

Les lignines sont des composés d'incrustation car elles sont synthétisées lorsque la paroi est déjà développée et vont imprégner celle-ci. De nature hydrophobe, les lignines vont rendre la paroi imperméable entraînant progressivement la mort des cellules. C'est cette propriété qui permet notamment au bois d'avoir une bonne conduction de la sève brute via les vaisseaux du xylème (Boyce et al., 2004). Il a également été montré que des lignines ectopiques pouvaient être accumulées dans les parois lors de stress biotiques ou abiotiques (Moura et al., 2010). Par exemple en perturbant la biosynthèse de la cellulose, il est possible de stimuler la lignification de la paroi (Caño-Delgado et al., 2003).

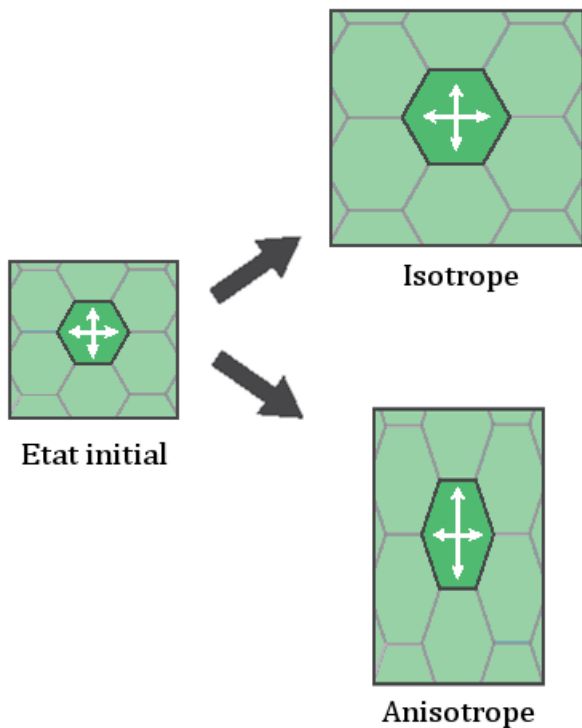
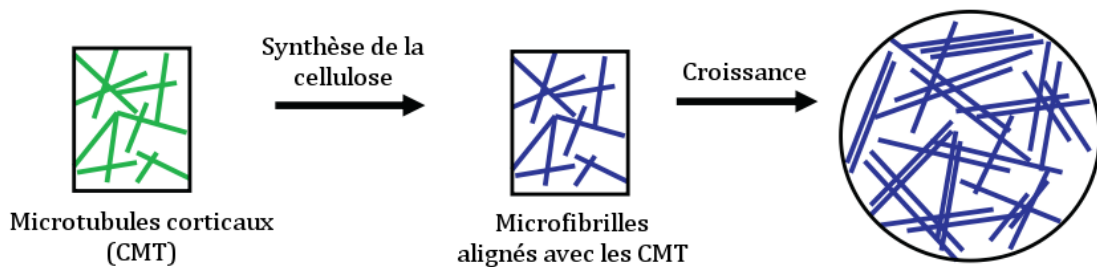


Figure 9. Deux modes d'expansion cellulaire

L'expansion cellulaire est équivalente dans toutes les directions lors de la croissance isotrope. La croissance anisotrope présente quant à elle un axe de croissance préférentiel. Schéma adapté de Prusinkiewicz et al. (2012)

A



B

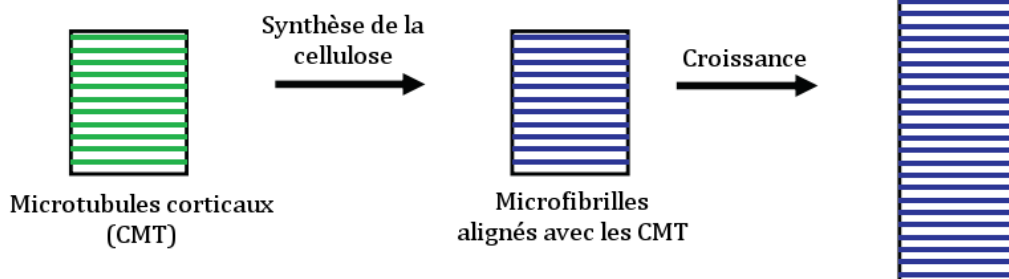


Figure 10. L'orientation des microtubules corticaux influence l'expansion cellulaire

Modèles expliquant les différences d'expansion cellulaire. L'orientation des microtubules corticaux (CMT) influence celle des microfibrilles de cellulose. Contrairement à la croissance isotrope (A), les cellules anisotropes (B) en cours d'élongation ont des CMT perpendiculaires à l'axe de croissance. Les microfibrilles vont également présenter cette orientation. Adapté de Hamada (2012)

1.2. Rôle de la paroi dans la croissance

Contrairement aux animaux, la croissance des végétaux est constante toute au long de leur vie. Pour cela, deux phénomènes entrent en jeu : des divisions cellulaires pour acquérir de nouvelles cellules et une maturation de ces cellules avec une croissance et une différenciation au sein d'un tissu. Ces processus sont finement régulés au cours du développement de la plante et peuvent permettre de répondre aux contraintes liées à leur environnement.

La croissance des cellules résulte de l'augmentation de leur volume et de la synthèse de nouveaux constituants. D'un côté, la cellule vivante a une pression interne majoritairement liée à des différences de potentiels hydriques entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. L'eau contenue dans la vacuole va alors engendrer une pression de turgescence qui tend à repousser les limites de la cellule et est en conditions normales comprise entre 3 et 10 bars (Wei, Lintilhac, 2007). D'un autre côté, c'est la paroi qui va permettre de contenir cette tension interne et peut supporter des tensions jusqu'à 60 bars (Carpita, 1985). La plasticité de la paroi (capacité à prendre une forme de manière réversible) est donc un facteur qui permet l'accroissement du volume cellulaire. Au cours de la vie d'une cellule, sa paroi est constamment remodelée afin d'ajuster sa croissance.

1.2.1. Les mécanismes de croissance

Il existe deux types d'expansion cellulaire : la croissance isotrope et la croissance anisotrope (Green, 1965). La première est définie par une expansion cellulaire équivalente dans toutes les directions. À l'inverse, lors de la croissance anisotrope, il y a élongation cellulaire selon un axe préférentiel (Figure 9). Les mécanismes qui contrôlent l'élongation cellulaire sont régulés dans le temps et dans l'espace.

1.2.1.1. Les microtubules corticaux, un facteur clé de la croissance

Les CMT sont des éléments essentiels pour contrôler la morphogenèse chez les plantes supérieures (Fisher, Cyr, 1998 ; Burk et al., 2001 ; Hamant et al., 2008 ; Boudaoud, 2010). L'orientation des microfibrilles de cellulose varie au cours de l'élongation cellulaire. En effet chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que dans l'hypocotyle et dans la zone d'élongation racinaire, les microfibrilles de cellulose nouvellement synthétisées adoptent une orientation perpendiculaire à l'axe d'élongation (Crowell et al., 2010 ; Kerstens et al., 2001). Ainsi, l'élongation cellulaire est favorisée selon un axe préférentiel (Figure 10). Cette orientation des microfibrilles est étroitement corrélée à celle des CMT (Elizabeth Faris Crowell et al., 2011). Cette relation entre ces deux réseaux n'est pas nouvelle puisque dès 1962, Green émet l'hypothèse qu'il y a dans le cytoplasme des éléments à la périphérie des cellules qui déterminent l'orientation des microfibrilles de cellulose afin de déterminer la forme finale des cellules (Green, 1962 ; Ledbetter, Porter, 1963). Cette théorie de l'alignement entre les microfibrilles de cellulose et les CMT a été supportée par de nombreuses études bien que dans certains

cas, l'orientation des CMT ne permettait pas de prévoir l'orientation des microfibrilles de cellulose (Hepler, Newcomb, 1964 ; Baskin, 2001 ; Sugimoto et al., 2003 ; Wasteneys, 2004). Plusieurs modèles ont été proposés quant au rôle des CMT sur l'orientation des microfibrilles de cellulose : (1) les complexes synthétisant la cellulose sont directement ou indirectement liés aux CMT (2) les CMT définissent des rails dans lesquels les complexes se trouvent (Heath, 1974 ; Giddings, Staehelin, 1991). Les récentes découvertes de protéines telles que CSI1 (voir partie 1.3.3.3) sont en faveur de l'hypothèse 1 montrant que les CMT interagissent avec les protéines qui synthétisent la cellulose.

1.2.1.2. L'apoplaste, un réservoir d'ions

L'espace extracellulaire comprenant les parois et l'espace entre les cellules, nommé l'apoplaste, joue un rôle fondamental dans la croissance car c'est un espace riche en eau et en solutés. Dans l'apoplaste, les concentrations ioniques peuvent varier à l'interface de la membrane plasmique (Grinon, Sentenac, 1991) or elles sont critiques pour le contrôle des interactions entre polysaccharides. En présence d'ions Ca^{2+} , des structures en boîtes à œufs peuvent se former *in vitro* avec les acides galacturoniques déméthylesterifiés chargés négativement (Ralet et al., 2001). La formation d'une telle structure pourrait affecter la rhéologie de la paroi c'est-à-dire ses propriétés mécaniques sous l'effet d'une contrainte appliquée (Basak, Bandyopadhyay, 2014 ; Schuster et al., 2011). *In vivo*, la déméthylesterification des pectines participe à la formation de la lamelle moyenne et permet le renforcement de la paroi dans le cas de la maturation des tubes polliniques (Parre, Geitmann, 2005). Néanmoins, Vogler et al. (2013) ont montré que cette rigidification peut provenir uniquement de la géométrie propre au tube pollinique. Le rôle des gels pectiques en présence de Ca^{2+} dans les cellules en expansion n'est pas clair. Pour l'algue verte *Chara corallina*, il a été montré que la présence de HG déméthylesterifiés permet de contrôler le taux de croissance (Boyer, 2009) : les accélérations et décélérations successives de croissance sont expliquées par l'ajout *in muro* de nouvelles pectines déméthylesterifiées venant lier les Ca^{2+} disponibles au niveau de la paroi. Les pectines déjà en place sont alors déméthylesterifiées et cela provoque un relâchement pariétal local. Si le rôle des pectines pour la croissance est indéniable (Peaucelle et al., 2011), la formation de ces structures en boîtes à œufs *in vivo* est encore largement débattu (L Hocq et al., 2017). D'autres ions dans l'apoplaste influencent aussi la croissance. Comme décrit précédemment, les ions B^{-} favorisent la liaison des AGP aux EXT (Tan et al., 2018) et la dimerisation des RG-II, renforçant la paroi (Voxeur, Fry, 2014 ; Chormova, Fry, 2016). Un défaut au niveau de ce lien B^{-} -RG-II provoque d'ailleurs des problèmes de croissance chez *Arabidopsis thaliana* (O'Neill et al., 2001).

On observe également *in muro*, lors de la croissance, des oscillations des concentrations en Ca^{2+} , en espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que du pH (Monshausen et al., 2009 ; Wolf et al., 2012).

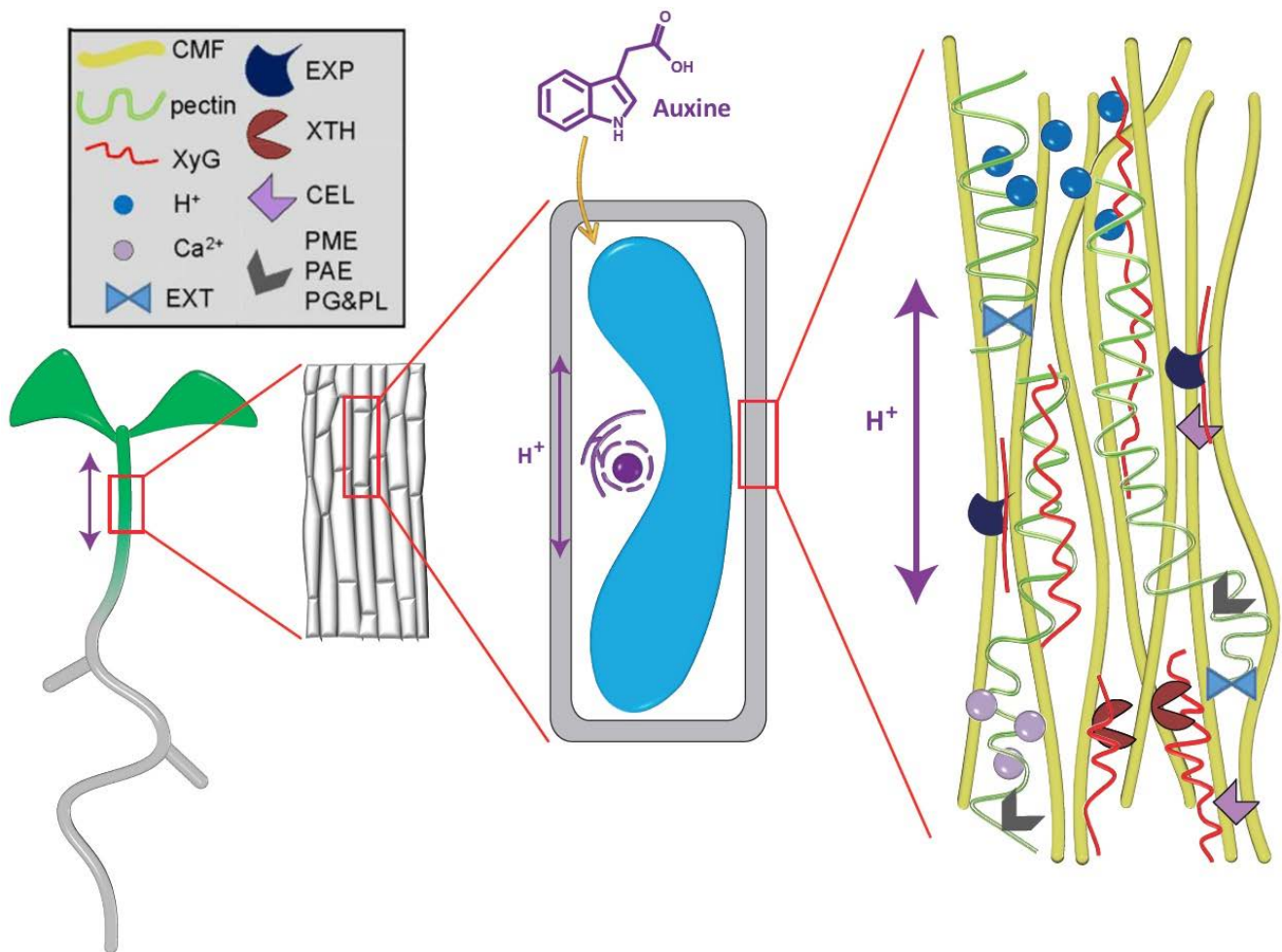


Figure 11. Rôle de l'auxine et du pH dans l'allongement cellulaire

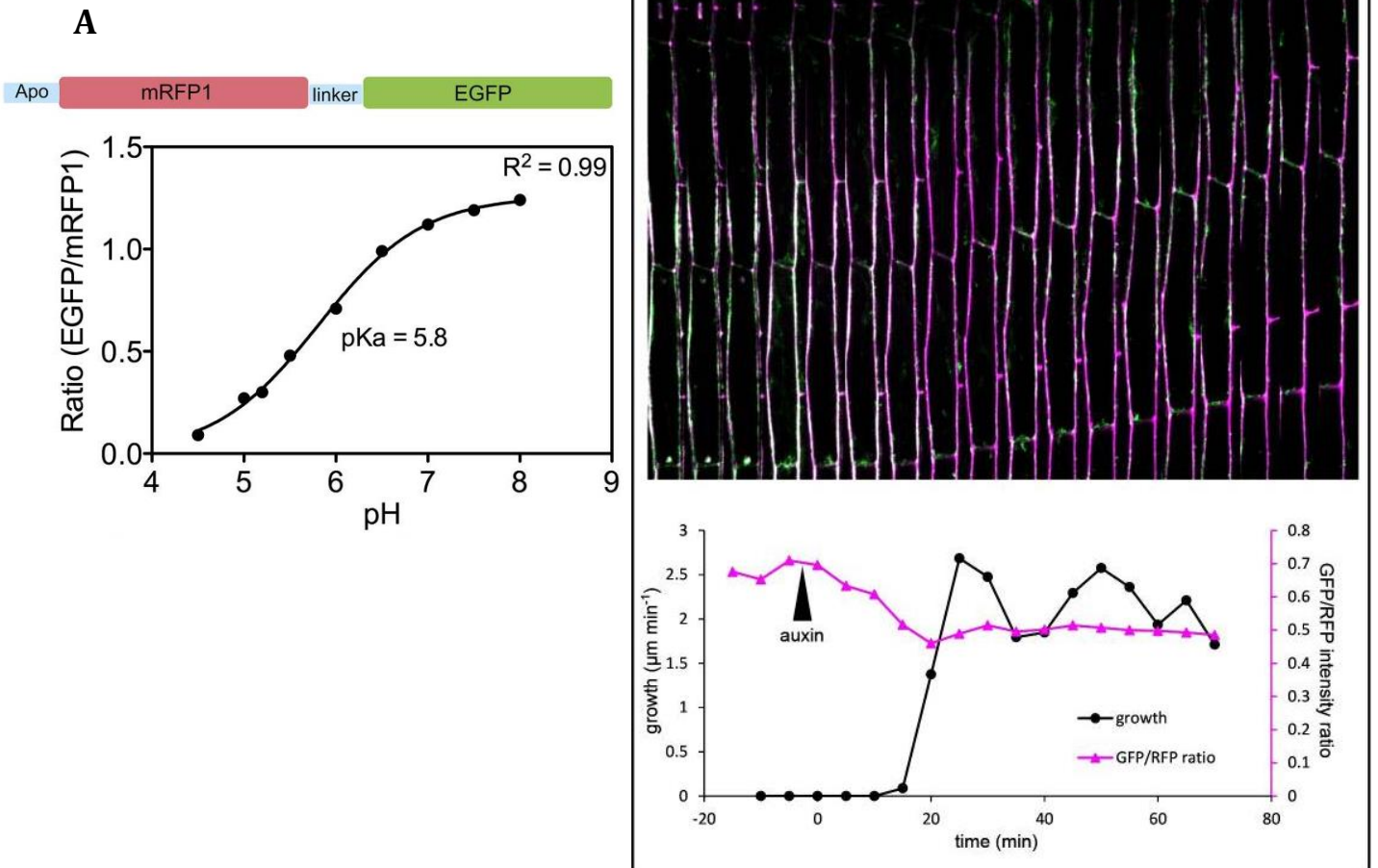
La théorie de la croissance acide ou « acid growth theory » repose sur l'activation de pompes à protons par une signalisation auxinique induisant une acidification de de l'apoplaste. Les activités des enzymes pariétales vont alors être régulées et cela favorise le relâchement pariétal nécessaire à l'élongation cellulaire. Des différences dans les modes d'action peuvent être observées pour la racine. Abréviations : CMF = microfibrilles de cellulose, XyG = xyloglucane, EXT = extansine, EXP = expansine, XTH = xyloglucanes transglycosylases/hydrolases, CEL = endoglucanase (cellulase), PME = pectine méthylestérase, PAE = pectine acétylestérase, PG = polygalacturonase, PL = pectine lyase. Schéma adapté de Majda et al. (2018)

1.2.1.3. Le pH apoplastique contrôle l'allongement cellulaire

Le pH est en effet un facteur primordial pour la croissance car il contrôle l'activité de nombreuses enzymes. Bien qu'il y ait des variations entre les espèces et les organes étudiés, les valeurs moyennes de pH dans l'apoplaste sont comprises entre 4,5 et 7 (Yu et al., 2000). Depuis les années 70s, de nombreuses études tendent à montrer que l'acidification de l'apoplaste induit l'élongation cellulaire et donc la croissance des tissus : c'est la théorie de la croissance acide ou « the acid growth theory » (Rayle, Cleland, 1970). Celle-ci propose deux étapes : (1) l'auxine induit un efflux de protons vers l'apoplaste et (2) cette acidification active des protéines pariétales impliquées dans le relâchement de la paroi (Figure 11).

Ce modèle se vérifie bien au niveau de l'hypocotyle (partie de tige en dessous des cotylédons d'une plantule) et des parties aériennes. Une accélération de croissance y est observée lorsque des plantes sont incubées avec différents tampons acides (Rayle, Cleland, 1970) ou par l'ajout d'auxine exogène (Hager et al., 1971 ; Cleland, 1975). L'acidification de l'apoplaste serait causée par l'activation des pompes à protons de type H⁺-ATPases à la membrane plasmique transférant les protons du cytoplasme vers l'apoplaste (Bibikova et al., 1998 ; Brummer et al., 1984). Ces pompes à protons sont d'ailleurs activées par phosphorylation suite à l'ajout d'auxine (Takahashi et al., 2012 ; Haruta et al., 2015). Plusieurs protéines pH-dépendantes sont impliquées dans la croissance dont les expansines (Mcqueen-mason et al., 1992 ; Daniel J. Cosgrove, 2005). L'acidification de l'apoplaste stimule alors les expansines qui s'y trouvent, favorisant ainsi le relâchement de la paroi. En ce qui concerne la racine, la théorie de la croissance acide est plus complexe et plus discutée. Certains travaux suggèrent que l'acidification de l'apoplaste par l'activation des pompes à protons favoriserait la croissance racinaire (Lado et al., 1976 ; Moloney et al., 1981 ; Rayle, Cleland, 1992). L'ajout de tampons acides dans le milieu de culture de plantules de maïs (*Zea mays*) stimule la croissance de la zone apicale de la racine (Winch, Pritchard, 1999). D'autres études montrent des effets contradictoires du pH sur la racine. Il est connu depuis longtemps que l'ajout d'auxine exogène dans un milieu de culture inhibe la croissance racinaire (Chadwick, Burg, 1967 ; Sauer et al., 2013). De plus, une alcalinisation de l'apoplaste a été observée au niveau de la racine lors de la croissance (Mulkey, Evans, 1981 ; Spiro et al., 2002 ; Pacheco-Villalobos et al., 2016). L'auxine stimule ou inhibe la croissance selon les tissus mais les différences observées peuvent aussi provenir des concentrations utilisées : racines et tiges peuvent toutes deux être régulées de la même manière mais pas à des concentrations équivalentes (Dünser, Kleine-Vehn, 2015). Lorsque l'auxine favorise l'expansion cellulaire, c'est une acidification qui semble toujours être observée.

Des études plus récentes ont permis l'observation *in vivo* de variations subtiles de pH. Gjetting et al. (2012) ont développé un bio-senseur de pH, appelé pHusion, avec une version apoplastique et une autre cytosolique (Figure 12A). Ils ont ainsi pu observer l'alcalinisation de la racine après ajout d'une concentration importante d'auxine exogène. Fendrych et al. (2016) ont quant à eux utilisé ce senseur dans l'hypocotyle et mis en



évidence la coordination entre reprise de croissance et acidification de l'apoplaste (Figure 12B). Monshausen et al. (2011) ont utilisé un marqueur du pH ainsi qu'un biosenseur du Ca^{2+} cytosolique pour montrer le rôle de ce dernier dans les dynamiques de pH en lien avec l'auxine. Il est en effet connu que le Ca^{2+} du cytoplasme régule les pompes à protons (Lino et al., 1998 ; Cho et al., 2012) et modulerait par la même occasion la croissance cellulaire. Enfin, Barbez et al. (2017) ont utilisé un autre colorant indicateur du pH (HPTS = 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt) et ont montré que l'auxine de nature endogène entraîne une acidification de l'apoplaste avec une stimulation de la croissance dans la racine alors que l'ajout d'auxine exogène entraîne l'effet inverse. Ces marqueurs sont de bons outils permettant une meilleure compréhension du paradoxe de la théorie de la croissance acide.

1.2.1.4. Rôle des pectines dans l'élongation cellulaire

De nombreuses études mettent en avant un rôle des pectines dans la croissance (Palin, Geitmann, 2012 ; Wolf et al., 2012 ; L Hocq et al., 2017). Les enzymes modifiant les HG (pectines principales de la paroi) sont des acteurs potentiels intervenant dans la théorie de la croissance acide. Leur état de méthylestérification contrôlé par les PME est un facteur primordial pour la croissance (Peaucelle et al., 2011 ; Braybrook et al., 2012). Lorsqu'on utilise des pectines méthylestérifiées comme substrats, les PME déméthylestérifient les pectines en produisant des protons et du méthanol (Senechal et al., 2014) (Figure 13). Le pH apoplastique va donc chuter d'une part grâce à l'activation des pompes à protons mais aussi grâce à l'activité des PME *in muro*. Ce changement de pH a des conséquences directes sur ces PME : (1) modifier l'activité des PME libres qui fonctionnent plutôt à des pH alcalins (Cameron et al., 2008 ; Pelletier et al., 2010), (2) augmenter leurs liaisons aux protéines PMEI (pectin methylesterase inhibitors) qui empêchent leur activité (Balestrieri et al., 1990 ; Jolie et al., 2010) et (3) perturber le mode d'action des PME (Denès et al., 2000 ; Goldberg et al., 2001). Il y a donc une discordance entre l'activité des PME favorable aux pH basiques et l'acidification de l'apoplaste pour la croissance. Cependant il a été montré qu'il pouvait y avoir une alcalinisation transitoire de l'apoplaste une minute après un stimulus mécanique comme par exemple au cours de la ré-orientation de la racine (Felle et al., 2009 ; Richter et al., 2009). Le mode d'action des PME n'est pas encore bien connu mais on peut imaginer que des phases de transition à pH alcalin dans l'apoplaste permettraient d'activer les PME. Il est assumé que ces enzymes sont processives – c'est-à-dire catalysant des réactions en chaîne – comme celles décrites chez les bactéries (Johansson et al., 2002 ; Mercadante et al., 2013). Ce mode d'action va permettre de créer des régions assez longues de HG déméthylestérifiés. Ces pectines déméthylestérifiées sont aussi les substrats de polygalacturonases (PG) qui les hydrolysent et fonctionnent à des pH acides (Zohdi, Amid, 2013 ; Xiao et al., 2014). On peut donc supposer que les PME agissent dans un premier temps afin de générer les substrats appropriés pour les PG qui influencent alors la matrice pectique et donc potentiellement les propriétés de la paroi. Il a été montré par ailleurs que l'ajout de PG provenant du pathogène *Aspergillus oryzae* améliore l'action des expansines et favorise la croissance de l'hypocotyle (Zhao et al., 2008). De plus, les mutants *pgx1* affectés dans

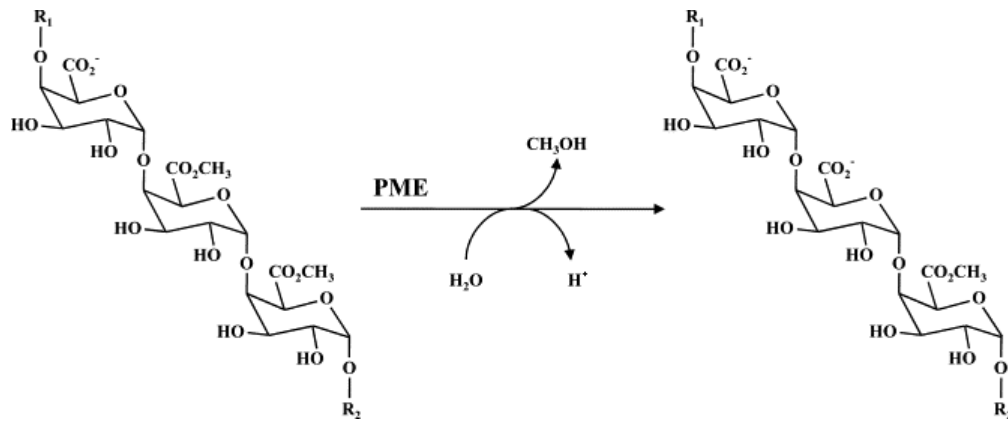


Figure 13. Déméthylestérification des homogalacturonanes par les PME

La réaction de déméthylestérification d'un groupement méthyle d'un HG entraîne la production d'une molécule de méthanol et d'un proton. Cette réaction engendre donc l'acidification de l'apoplaste. Schéma adapté de Jolie et al. (2010)

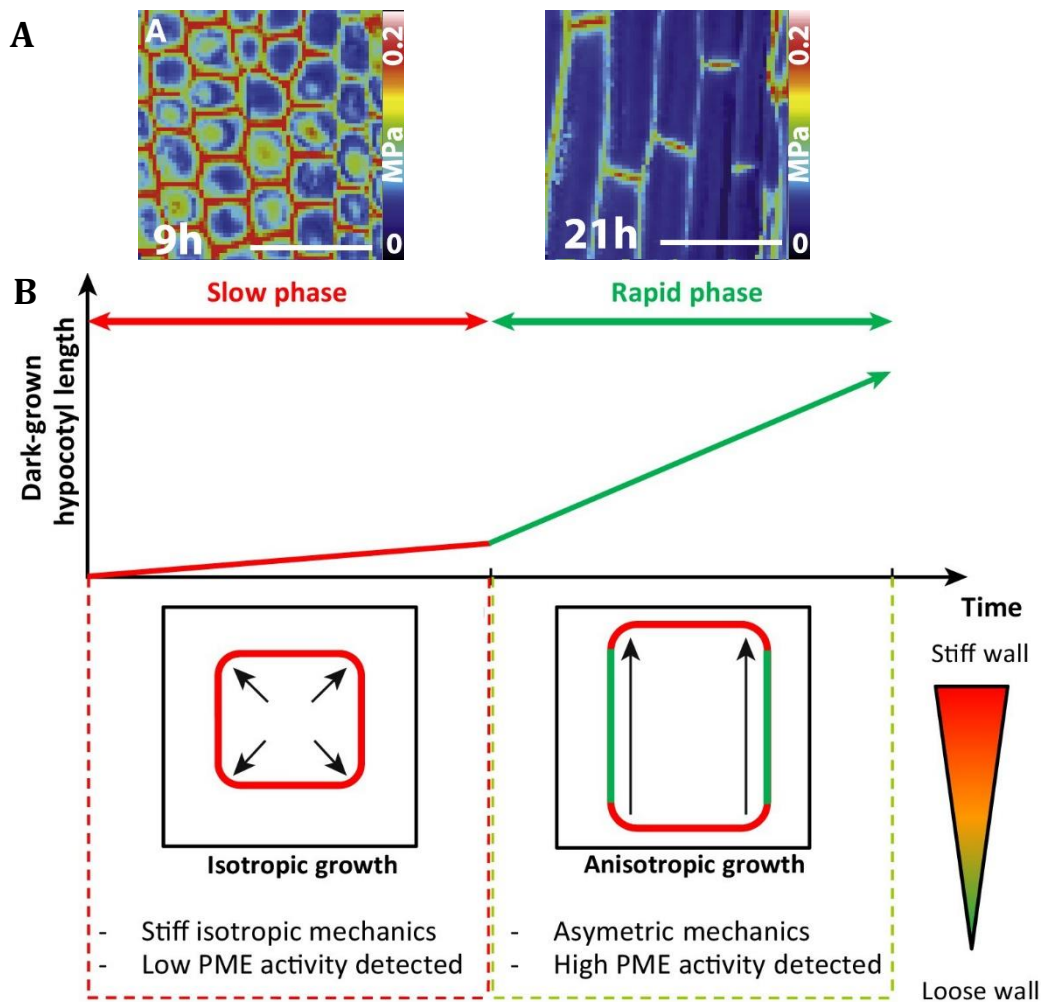


Figure 14. Impact de l'état de méthylestérification des HG sur la croissance de l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana* cultivé à l'obscurité

(A) Mesure de la rigidité pariétale par AFM (Atomic Force Microscopy) au niveau des cellules du haut de l'hypocotyle (gauche) ayant une croissance isotrope et des cellules plus en bas de l'hypocotyle (droite) présentant une croissance anisotrope. Barre d'échelle = 50 μ m. Issu de Peaucelle et al. (2015)

(B) Schéma illustrant les deux phases de croissance observées dans l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana* cultivé à l'obscurité. Adapté de Hocq et al. (2017)

une PG présentent des phénotypes nains avec une altération de l'expansion cellulaire (Xiao et al., 2014). En ce qui concerne l'acétylation des HG et les PAE, rien n'a encore été démontré et leur rôle n'est pas clairement connu (Philippe et al., 2017). En revanche, des défauts d'acétylation des xyloglucanes par la protéine ESK1 entraînent des problèmes de croissance et de réponses aux stress (Ramírez et al., 2018).

1.2.2. Modèle d'étude pour la croissance : l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana*

L'hypocotyle cultivé à l'obscurité est un bon modèle pour étudier les phénomènes de croissance car il existe différentes phases de croissance pour l'hypocotyle étiolé (une phase lente et une phase d'accélération de la croissance après 48h d'imbibition) et il a été montré qu'il existe un gradient de croissance : les cellules du bas sont les premières à s'allonger (Gendreau et al., 1997 ; Refrégier et al., 2004). L'expression de plusieurs gènes impliqués dans le remodelage des pectines est changée au moment de la phase de transition de croissance de l'hypocotyle et cela se répercute sur la composition de la paroi (Pelletier et al., 2010). La composition des HG semble jouer un rôle important durant cette transition.

1.2.2.1. Pectines et propriétés mécaniques pariétales

Récemment il a été montré que le degré de méthylestérification des HG contribue aux changements des propriétés mécaniques de la paroi. Contrairement à ce que l'on pouvait attendre, la demethylesterification des pectines (connue auparavant pour son rôle dans la formation des structures en boîtes à œufs) provoque un relâchement pariétal dans les jeunes cellules du méristème (Peaucelle et al., 2011) ou de l'hypocotyle (Peaucelle et al., 2015). Les cellules de petite taille qui ne grandissent pas encore très vite possèdent des pectines hautement méthylestérifiées (Sobry et al., 2005 ; Peaucelle et al., 2008). En sur-exprimant la PME5 d'*Arabidopsis thaliana*, on provoque l'accumulation de pectines déméthylestérifiées associée à une augmentation de l'élasticité pariétale, mesurée par AFM (Atomic Force Microscopy) (Peaucelle et al., 2011, 2015) (Figure 14). Ce changement débute par la déméthylestérification des pectines des parois longitudinales. Les propriétés mécaniques de ces parois sont alors modifiées : elles deviennent plus déformables. La cellule commence à s'allonger ce qui engendre un stress mécanique au niveau des parois longitudinales. Les microtubules corticaux tapissant la membrane plasmique à l'intérieur de la cellule sont capables de se réorienter dans la direction du stress mécanique maximal subi par la cellule (Uyttewaal et al., 2012). Ils vont alors se réorienter de manière perpendiculaire à l'axe de croissance. L'alignement des microfibrilles de cellulose est étroitement corrélé à celui des CMT (Baskin, 2001). Les nouvelles microfibrilles formées vont alors être aussi orientées perpendiculairement à l'axe d'élongation, modifiant d'autant plus les contraintes mécaniques au niveau des parois longitudinales de la cellule. La croissance anisotrope de la cellule est alors stimulée. Ainsi selon les études *in vivo* et *in vitro*, la déméthylestérification des pectines peut engendrer soit une rigidification soit un

relâchement pariétal en fonction du contexte. Les mécanismes de contrôle ne sont pas encore connus. Cela pourrait être dû en partie aux activités spécifiques des différentes isoformes de PME, PG et de PL (Ludivine Hocq et al., 2017). Il est tout à fait plausible que ces régulations se fassent à des localisations très locales dans la paroi, permettant des régulations très fines des mécanismes d'expansion cellulaire.

1.2.2.2. Régulation spatio-temporelle de la croissance

Il est également important de considérer la croissance d'une cellule dans son contexte c'est-à-dire au sein d'un tissu. Dans les hypocotyles de plantules étiolées d'*Arabidopsis thaliana*, il a été observé des différences d'orientation des CMT et microfibrilles de cellulose entre les parois de la face externe de l'épiderme et celles de la face interne du tissu (Elizabeth Faris Crowell et al., 2011 ; Chan, 2012). Au niveau de la face interne de l'épiderme d'hypocotyle, l'orientation des CMT est toujours perpendiculaire par rapport à l'axe de l'élongation alors qu'au niveau de la face externe, il n'y a pas de d'orientation préférentielle. Toutefois, au niveau de la face externe, il existe une réorientation des CMT lorsqu'il y a une croissance rapide des cellules. Ces résultats suggèrent que la croissance anisotrope doit être contrôlée au niveau de l'organe en entier et ne peut pas être expliquée seulement par les propriétés mécaniques de la face externe de l'épiderme.

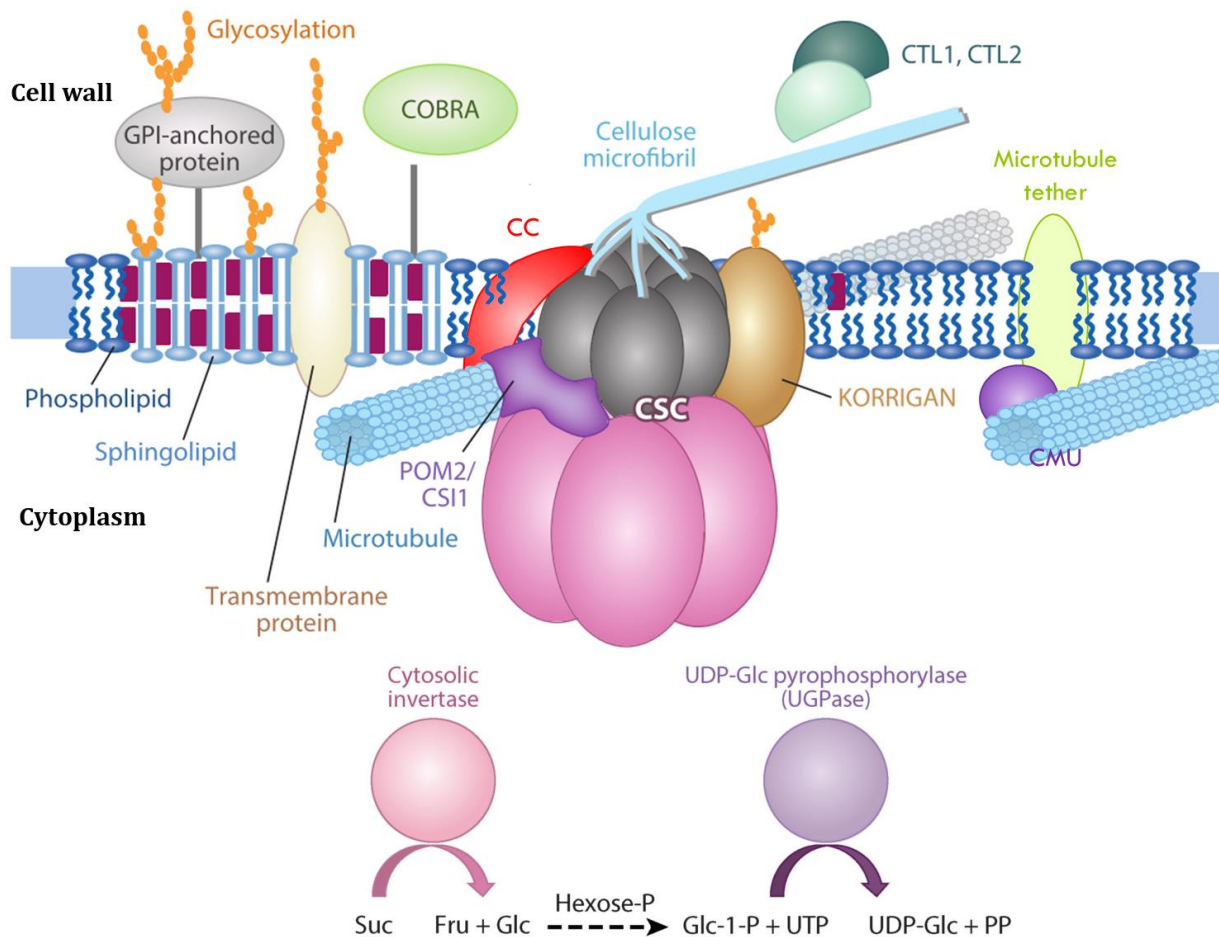


Figure 15. Schéma illustrant les différentes protéines impliquées dans la synthèse de la cellulose

L'enzyme clé de la biosynthèse de la cellulose, la sous-unité catalytique de cellulose synthase (CESA), est organisée en complexe à la membrane plasmique (CSC : cellulose synthase complex) et entourée par de nombreuses protéines qui l'assistent. Les invertases et UGPases cytosoliques fournissent l'UDP-glucose (UDP-Glc) nécessaire pour la polymérisation. Le CSC, transmembranaire ajoute les monomères de glucose. La protéine KORRIGAN peut couper les chaînes de glucanes libérant la microfibrille de cellulose synthétisée tandis que les CTL et COBRA influencent la cristallinité de la cellulose. Les protéines CC, CSI1 et CMU permettent de guider le déplacement du CSC à la membrane plasmique en utilisant les microtubules corticaux. Adapté de McFarlane et al. (2014)

1.3. Cellulose : biosynthèse *in situ*

La synthèse des différents constituants pariétaux fait intervenir de nombreux gènes, bien conservés dans l'évolution (Fangel et al., 2012). On dénombre chez les plantes de nombreuses enzymes agissant sur les glucides aussi appelées CAZymes (carbohydrate-active enzyme, <http://www.cazy.org/>) (Lombard et al., 2014) avec par exemple plus de 1120 gènes identifiés à ce jour pour *Arabidopsis thaliana*. On retrouve en particulier deux grandes familles de CAZymes pour les polysaccharides de la paroi : d'une part les glycosyltransférases (EC 2.4.1.x) qui vont ajouter des monomères aux macromolécules et d'autre part les glycosylhydrolases (EC 3.2.1.x) qui vont les dégrader. L'action combinée de ces deux groupes d'enzymes permet la biosynthèse et le recyclage des constituants pariétaux.

Contrairement aux pectines et aux hémicelluloses, la biosynthèse de la cellulose a lieu exclusivement *in muro* (Figure 15). Le substrat de la réaction de polymérisation est l'UDP-Glucose qui a plusieurs origines possibles (Kumar, Turner, 2015). Le saccharose issu de la photosynthèse et transporté dans toute la plante peut être converti en fructose et glucose par des invertases cytosoliques. Différentes voies métaboliques permettent alors l'obtention de Glucose-1-phosphate qui est utilisé par l'UDP-Glucose pyrophosphorylase pour produire l'UDP-Glucose. Une autre enzyme permet sa production : la saccharose synthase. Celle-ci convertit directement le saccharose en UDP-Glucose et Fructose. La présence de cette enzyme pour fournir le substrat à la biosynthèse de cellulose est très controversée (Baroja-Fernandez et al., 2012 ; Smith et al., 2012) même si ce lien a historiquement été montré pour la synthèse des fibres de coton (Amor et al., 1995).

Un autre facteur qui pourrait permettre la biosynthèse de la cellulose serait l'utilisation de stérols membranaires pour initier la polymérisation. Il a été montré que des lipides ancrés dans la membrane plasmique d'*Agrobacterium tumefaciens* étaient impliqués dans la synthèse de cellulose (Matthysse et al., 1995). Pour les plantes, seules des études *in vitro* sur les fibres de coton ont mis en évidence que des amorces de sitostérol- β -glucoside pouvaient amorcer la biosynthèse (Peng et al., 2002). A ce jour, rien n'a été démontré *in vivo* même s'il semble indéniable que les stérols ont un lien avec la synthèse de la cellulose chez les plantes supérieures puisque des mutants affectés dans la biosynthèse des stérols présentent des déficiences en cellulose (Schrack et al., 2012).

1.3.1. Cellulose synthase (CESA)

L'enzyme clé qui ajoute un monomère de glucose lors de la polymérisation est la sous-unité catalytique de cellulose synthase (CESA) (EC 2.4.1.12), située à la membrane plasmique. Des enzymes ayant des activités similaires sont présentes chez de nombreuses bactéries (Römmling, 2002) et des similarités de séquences existent entre elles et les CESA. Son organisation sous forme de complexe et les différentes protéines qui s'y associent permettent de contrôler finement la polymérisation de la cellulose.

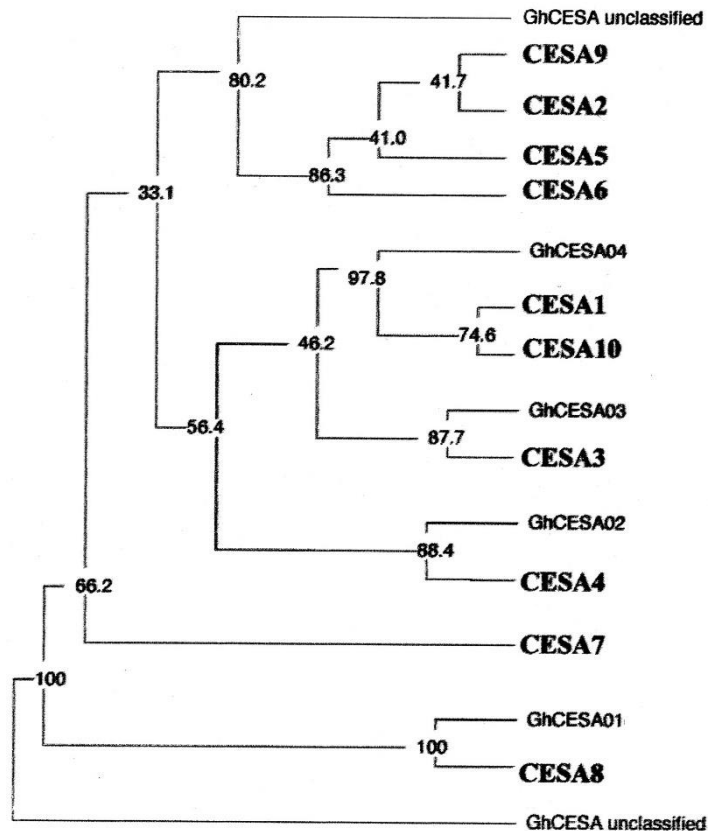


Figure 16. Famille multigénique des Cellulose synthase

Arbre phylogénétique des CESA d'*Arabidopsis thaliana* et du cotonnier (*Gossypium hirsutum*) basé sur l'alignement de leurs séquences protéiques. Les nombres situés au niveau des nœuds correspondent aux valeurs de « bootstrap » (pourcentage de robustesse du nœud). Ce cladogramme est enraciné avec une protéine GhCESA non classifiée. Issu de Fagard et al. (2000) et Desprez et al. (2002)

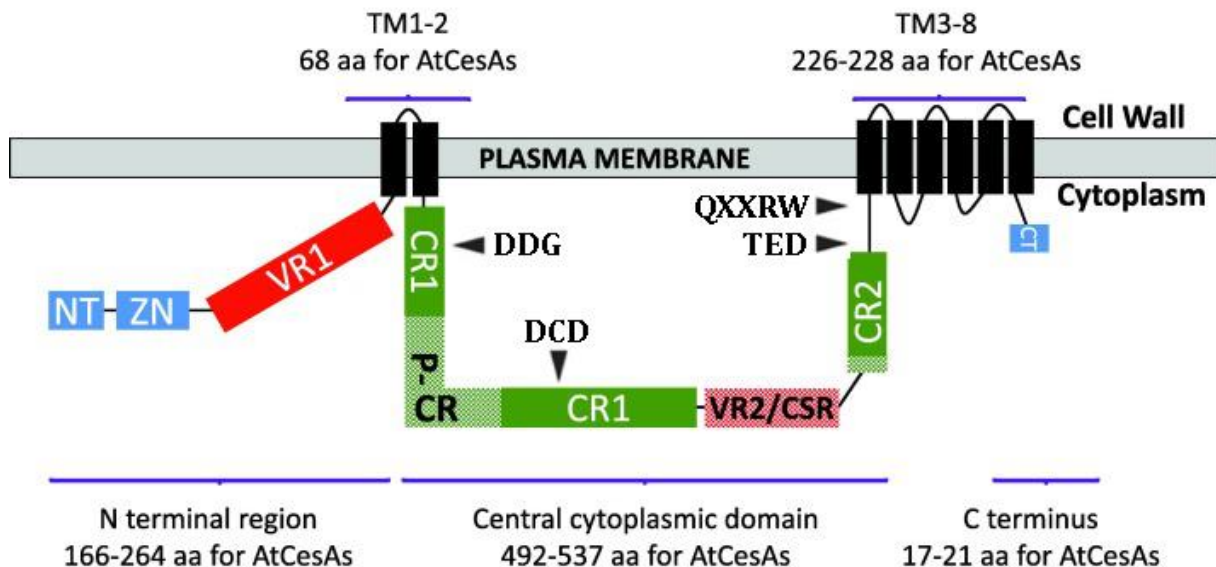


Figure 17. Structure protéique des CESA à la membrane plasmique

Les grandes zones cytoplasmiques et transmembranaires (TM) sont représentées avec la taille en acide aminés (aa) pour les protéines d'*Arabidopsis thaliana*. Les domaines caractéristiques des CESA sont indiqués avec les motifs d'acides aminés nécessaires à l'activité de la protéine. Les régions variables (VR) et bien conservées (CR) sont indiquées. Adapté de Kumar et al. (2015)

1.3.1.1. Famille multigénique des CESA

Les premières CESA identifiées chez les plantes supérieures concernaient le cotonnier et ont pu être mises en évidence par comparaison avec les enzymes bactériennes ayant la même activité de polymérisation (Pear et al., 1996). On dénombre pour les végétaux terrestres pas loin de 90 gènes de CESA identifiés dans plus de 11 espèces, des bryophytes avec *Physcomitrella patens* jusqu'aux angiospermes avec *Populus trichocarpa* ou *Arabidopsis thaliana* (Carroll, Specht, 2011). On retrouve pour une même espèce plusieurs isoformes qui jouent des rôles différents. Ainsi, 10 isoformes de CESA sont identifiées chez *Arabidopsis thaliana* (Figure 16). Il a été montré que la plupart de ces formes sont indispensables pour la synthèse de la cellulose, certaines mutations étant létales pour le gamétophyte (Persson et al., 2007). Des différences au niveau du profil d'expression des gènes de CESA ont également été observées (Holland et al., 2000 ; Tran, Roberts, 2016).

1.3.1.2. Structure des CESA

La structure des CESA est plus ou moins bien conservée, on retrouve certaines séquences communes et d'autres plus spécifiques (Figure 17) : la CSR (Class Specific Region) caractérise la classe de CESA dans la famille multigénique tandis que la P-CR (Plant Conserved Region) est présente chez les végétaux et non chez les bactéries. En effet, de nombreuses études se sont intéressées à la séquence des gènes bactériens responsables comme les CESA de la production de cellulose et appelés Bacterial cellulose synthase A et B (BcsA et BcsB). Les protéines BcsA et BcsB sont assemblées en complexe mais seule BcsA polymérise la cellulose et est insérée dans la membrane plasmique comme les CESA. La protéine BcsB est quant à elle à l'extérieur, dans le périplasme et guiderait la chaîne de glucoses qui se polymérise. Des similarités structurelles ont été mises en évidence entre les CESA et BcsA (Kumar, Turner, 2015) :

- Deux zones transmembranaires. Une est proche de la région N-terminale et une autre proche de la région C-terminale.
- Une grande zone cytoplasmique centrale contenant le domaine catalytique supposé. Pour les plantes, on y trouve aussi les séquences CSR et P-CR.

En ce qui concerne les plantes, la région transmembranaire en position N-terminale composée de deux hélices est plus petite qu'en C-terminale où le nombre généralement admis de six hélices transmembranaires a été récemment questionné par Slabaugh et al. (2014). Si une de ces hélices ne serait pas transmembranaire mais dans le cytoplasme, cela correspondrait mieux à ce qui est observé pour la structure 3D de BcsA. On trouve uniquement chez les végétaux un motif à doigt de zinc près de la zone N-terminale qui pourrait jouer un rôle dans l'organisation des CESA à la membrane plasmique (voir partie 1.3.1.1.3).

Des études de cristallographie aux rayons X a permis de mieux caractériser la structure tertiaire de la protéine BcsA et les mécanismes permettant la polymérisation de la cellulose (Morgan et al., 2013). Des modélisations 3D pour trouver la structure

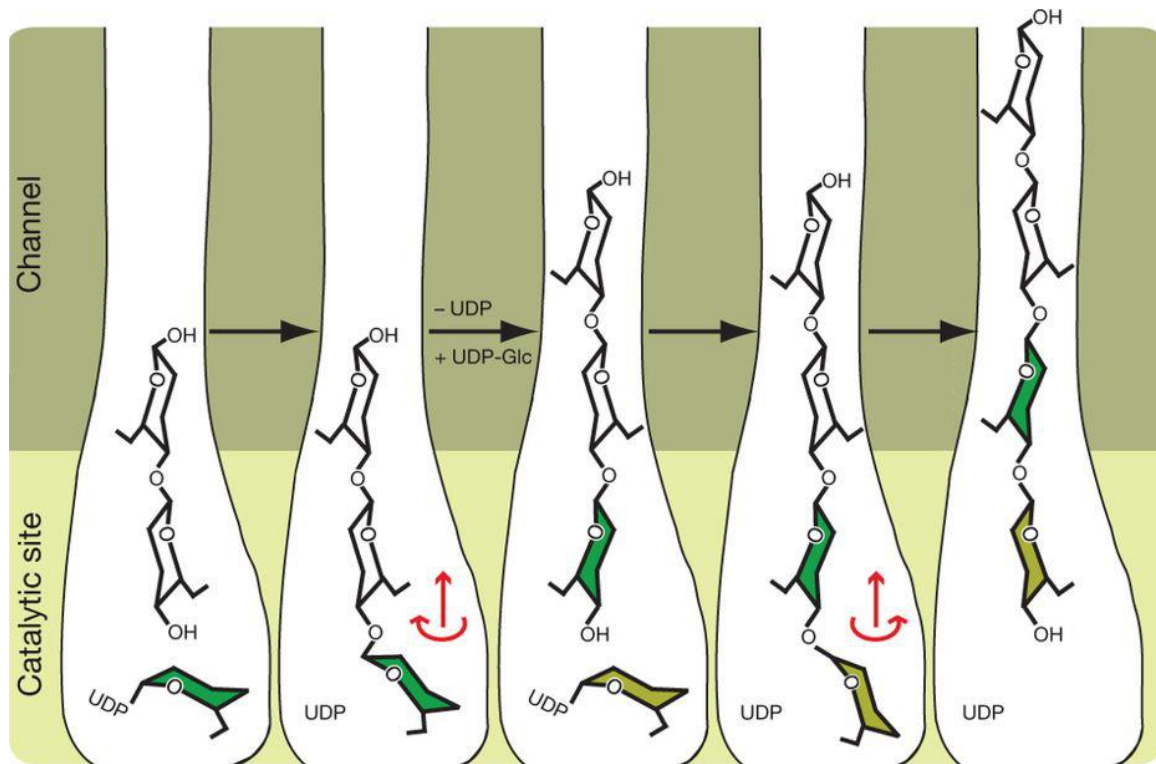


Figure 18. Modèle illustrant l'ajout de résidus de glucose à la chaîne élémentaire de cellulose par le complexe BscA/BscB

Après ajout de glucose au niveau du site catalytique, ce résidu glucose serait libre de tourner au niveau de sa liaison acétyle avec le polymère. A cause des contraintes stériques qu'il subit, il ne pourrait tourner que dans un sens lorsque la chaîne de glucane se déplace. Le processus se répète lorsqu'un nouveau glucose est ajouté à la chaîne mais celui-ci est cette fois contraint à tourner dans une direction opposée au premier. En conclusion, à chaque événement de polymérisation, le glucose nouvellement apporté se positionne de façon opposée au précédent. Issu de Morgan et al. (2013)

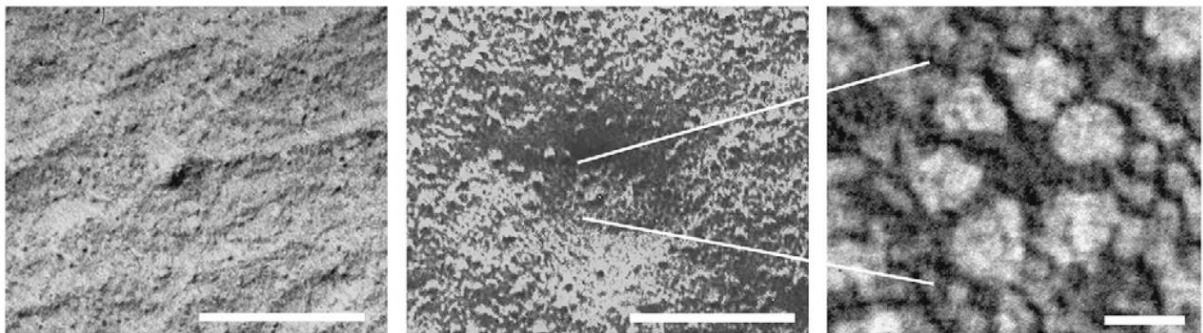


Figure 19. Electronographie d'un complexe de cellulose synthase (CSC)

Observations de cryofractures de membranes plasmique au microscope électronique en transmission. Issues de Diotallevi et al. (2007)

(Gauche) A l'extérieur de la membrane, on observe le complexe à l'extrémité d'une microfibrille de cellulose. Barre d'échelle = 100 nm

(Milieu) A l'intérieur, sous la membrane, on observe clairement une structure en forme de rosette et une dépression de la membrane. Barre d'échelle = 100 nm

(Droite) Vue rapprochée de l'empreinte d'un CSC avec une rosette constituée de six globules. Barre d'échelle = 10 nm

tertiaire du domaine cytosolique de GhCESA1 dans le cotonnier (*Gossypium hirsutum*) (Sethaphong et al., 2013) ont permis de confirmer certaines hypothèses quant à ces mécanismes chez les végétaux. Plusieurs motifs d'acides aminés dans cette zone seraient responsables de l'activité catalytique de glycosyltransférase des CESA (Haigler et al., 2017 ; Sethaphong et al., 2013) (Figure 17). Les résidus aspartate des motifs DDG et DCD (cf abréviations internationales pour les acides aminés) permettant de positionner l'UDP et le cofacteur bivalent nécessaire à la réaction (Mg^{2+} ou Ca^{2+}). Le tryptophane du motif QXXRW présent aussi chez la bactérie permet quant à lui de se lier à la cellulose déjà formée qui constitue le substrat accepteur. Enfin, le résidu aspartate du motif TED proche de la membrane plasmique est la base catalytique de la protéine tandis que le résidu glutamate permet de positionner le glucose du substrat donneur. Morgan et al. (2013) propose un modèle pour la synthèse de cellulose par BscA/BscB où chaque glucose nouvellement polymérisé serait libre de tourner sur lui-même (Figure 18). Le nouvel UDP-Glucose se positionnant toujours de la même façon, le premier glucose s'orienterait selon les contraintes stériques imposées par la structure des glucoses. Ainsi, à chaque polymérisation, le glucose s'orienterait dans une direction opposée au précédent ce qui expliquerait que le motif élémentaire de la cellulose soit le cellobiose et non le glucose.

1.3.1.3. Composition du complexe de CESA (CSC)

Des complexes ont été observés à la base des microfibrilles de cellulose au niveau de la membrane plasmique par des expériences de cryofracture bien avant la découverte des gènes *CESA* (Mueller et al., 1976 ; Mueller, Malcolm Brown, 1980). Une structure en rosette avec six globules répartis de manière symétrique a alors été mise en évidence chez les végétaux supérieurs (Somerville, 2006) (Figure 19). L'utilisation d'anticorps dirigés contre des CESA ont permis de mettre en évidence qu'elles constituaient les rosettes (Kimura, 1999). Depuis les travaux de Paredez et al. (2006), les techniques d'imagerie nous permettent d'observer la dynamique *in vivo* de ce complexe en fusionnant les CESA avec des protéines fluorescentes (FP-CESA). Lorsqu'on marque de façon analogue les microtubules, on observe une très bonne co-localisation avec les trajectoires de CESA et ces trajectoires correspondent d'ailleurs à l'orientation des microfibrilles de cellulose nouvellement synthétisées (Figure 20). Ces complexes de cellulose synthase (CSC) sont accompagnés d'un florilège de protéines qui jouent des rôles certains dans la biosynthèse de cellulose (Figure 15) (plus de détails en partie 1.3.3). Leur déplacement linéaire et bidirectionnel à la membrane plasmique est dû à la seule force de polymérisation des microfibrilles de cellulose (Diotallevi, Mulder, 2007) : sa vitesse est comprise entre 150 à 500 nm/min pour un taux de polymérisation de 300 à 1000 glucose/min (Alexander R Paredez et al., 2006).

Le nombre de sous-unités de CESA par CSC et leur organisation interne ont beaucoup été étudiés et plusieurs modèles ont été proposés (Hill et al., 2014 ; Doblin et al., 2002). A ce jour, il n'a encore jamais été possible de purifier un complexe intact pour connaître sa composition précise à cause de son ancrage dans la membrane plasmique et son

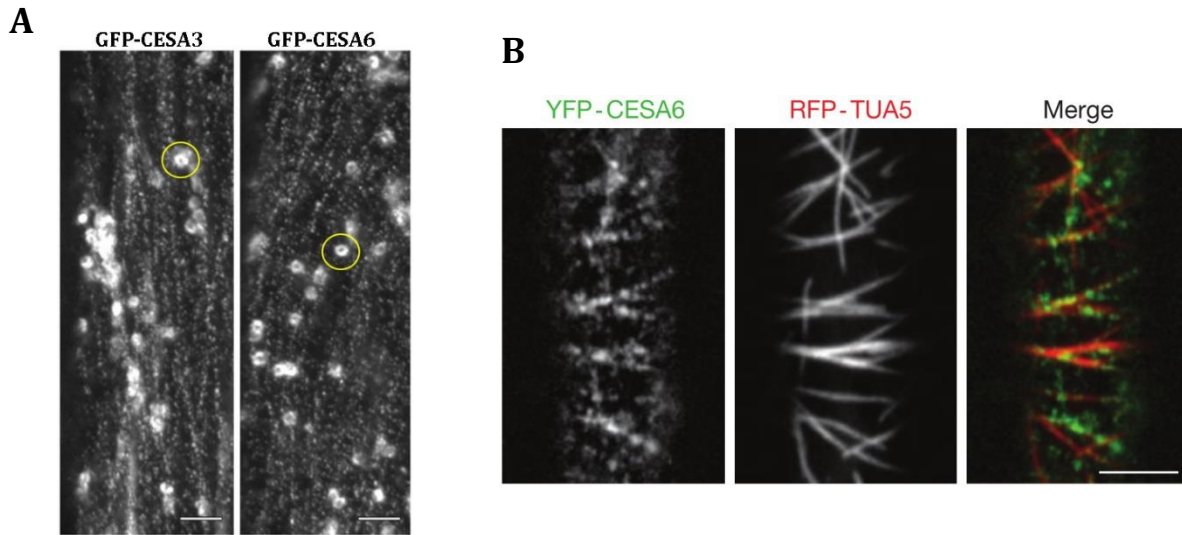


Figure 20. Mouvement du CSC observé via l'utilisation de protéines fluorescentes

(A) Visualisation des GFP-CESA3 et GFP-CESA6 au niveau de cellules de l'épiderme d'hypocotyles d'*Arabidopsis thaliana* cultivés à l'obscurité. Les CESA sont présentes au niveau de la membrane plasmique et dans de nombreux compartiments intracellulaires dont l'appareil de Golgi. Ces dernières sont les structures plus brillantes (exemples entourés en jaune) qui peuvent déposer des CSC au niveau de la membrane plasmique. Barre d'échelle = 4 μ m. Adapté de Desprez et al. (2007)

(B) Les marquages simultanés d'une CESA6 à la membrane plasmique et de la tubuline A constituant les microtubules corticaux (CMT) présentent une bonne co-localisation. Barre d'échelle = 5 μ m. Issu de Gutierrez et al. (2009)

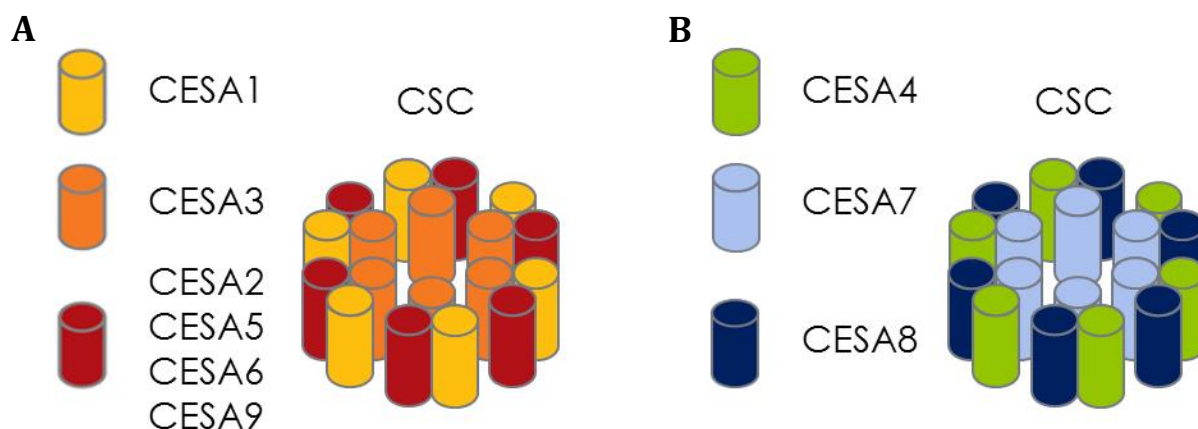


Figure 21. Différentes isoformes de CESA composent les CSC

Parmi les 10 isoformes de CESA chez *Arabidopsis thaliana*, trois groupes de protéines composent le CSC avec une stœchiométrie de 1:1:1. Les CSC de paroi primaire (A) sont composés de CESA1, CESA3 et CESA2/5/6/9 tandis que les CSC de paroi secondaire (B) sont composés de CESA4, CESA7 et CESA8. L'organisation des isoformes dans un même CSC les uns par rapport aux autres n'est pas connue.

organisation complexe. Le nombre de chaînes de glucanes par microfibrille pourrait donner un indice sur le nombre de CESA par CSC. Plusieurs études ont montré que ce chiffre est variable selon les espèces, de 18 à 36 chaînes (Turner, Kumar, 2018). On peut émettre l'hypothèse que plusieurs CSC peuvent s'associer pour former une même microfibrille. D'un autre côté, il est fort probable que si plusieurs CESA forment le complexe, elles ne sont peut-être pas actives en même temps ce qui pourrait expliquer la variabilité observée au niveau de la structure des microfibrilles de cellulose. Le modèle le plus accepté aujourd'hui sur le nombre de CESA par CSC est celui de Nixon et al. (2016), basé sur la modélisation 3D des protéines et des techniques précises de microscopie électronique en transmission. En observant un grand nombre de CSC, ils ont déterminé que chaque globule de la rosette correspondrait à un trimère de CESA ce qui donne au total 18 CESA par CSC (Figure 21). Il n'est cependant pas exclu que dans certaines conditions spécifiques ou dans certaines espèces végétales comme nous allons le voir pour le peuplier, le complexe soit organisé différemment et que parfois l'ancien modèle avec un hexamère par globule (36 CESA par CSC) reste d'actualité même si il est moins probable (Hill et al., 2014).

Les différentes isoformes de CESA ne sont pas toutes exprimées en même temps et les CSC ne sont pas tous composés des mêmes formes. Il a été montré que les complexes actifs dans la paroi primaire étaient composés uniquement de CESA1, CESA3 et d'une des CESA6-like comprenant CESA6, CESA5, CESA2 et CESA9 (T. Desprez et al., 2007 ; Persson et al., 2007) (Figure 21). En effet les mutations nulles d'un seul membre des CESA6-like n'engendrent qu'un phénotype subtil tandis que des mutations nulles dans les gènes *CESA1* ou *CESA3* génèrent la formation d'embryons létaux. D'un autre côté, les complexes synthétisant la paroi secondaire sont composés des formes CESA4, CESA7 et CESA8 (Atanassov et al., 2009). Les complexes fonctionnels de paroi primaire ou secondaire possèdent donc à chaque fois trois isoformes de CESA chez *Arabidopsis thaliana* et il a été montré dans les deux cas qu'elles étaient présentes dans des proportions stœchiométriques équivalentes 1 : 1 : 1 (Gonneau et al., 2014 ; Hill et al., 2014). Dans un modèle avec 18 CESA, il y aurait donc 6 CESA de chaque isoforme par CSC. L'organisation interne n'est que supposée mais il est fort probable que chaque globule du CSC soit un hétéro-trimère avec un représentant de chaque groupe de CESA. Il est intéressant de noter que CESA10 ne constitue pas les CSC de paroi primaire ou secondaire mais est exprimé plutôt dans les graines. GFP-CESA10 présente des trajectoires linéaires mais cette fois-ci unidirectionnelles le long des CMT dans les cellules épidermiques du tégument tout comme GFP-CESA3 et GFP-CESA5 (Griffiths et al., 2015). L'organisation des CSC en stœchiométrie 1 : 1 : 1 a été observée récemment également dans l'épicéa (*Picea abies*) (Zhang et al., 2018). Par contre il est intéressant de noter que chez le peuplier (*Populus tremula*), la stœchiométrie du complexe est différente puisque les auteurs trouvent une stœchiométrie de 3 : 2 : 1 avec les CESA de paroi secondaire PtCESA8a/b, PtCESA4 et PtCESA7a/b. Cette stœchiométrie est aussi différente dans le bois de tension : elle est alors de 8 : 3 : 1 (Zhang et al., 2018). Ces

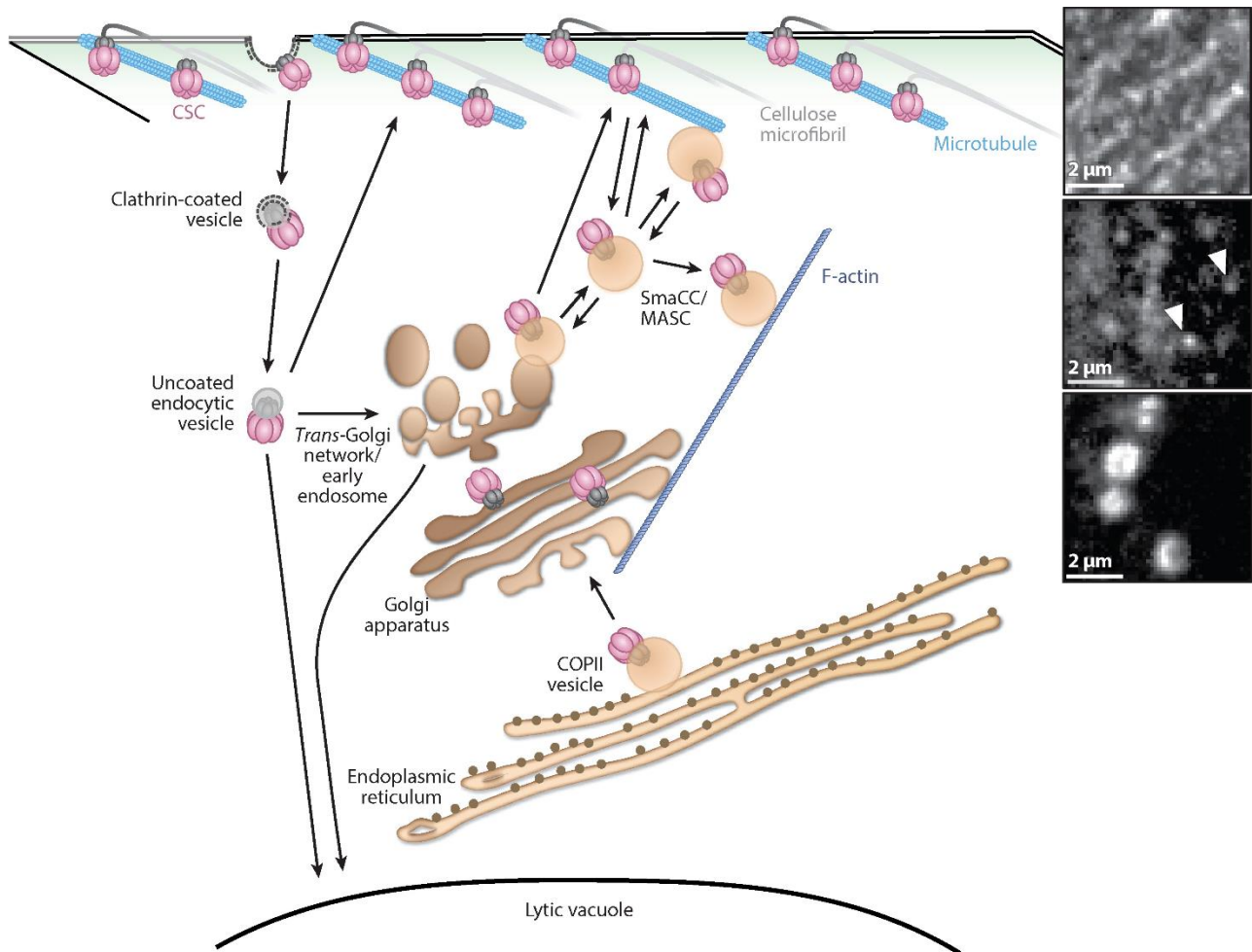


Figure 22. Sécrétion et recyclage du CSC à la membrane plasmique

Les CESA sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) et s'assemblent en CSC dans le RE ou l'appareil de Golgi. Après un passage dans le réseau *trans*-golgien, les CSC sont délivrés à la membrane plasmique. Plusieurs systèmes vésiculaires peuvent également les prendre en charge. Les SmaCC/MASC, associés au cytosquelette, ainsi que des vésicules d'endocytose permettent de réguler la présence des CSC à la membrane plasmique. Les images à droite du schéma correspondent à des observations de GFP-CESA3 à la membrane plasmique (haut), dans les SmaCC/MASC (milieu) et au niveau du réseau *trans*-golgien (bas). Issu de McFarlane et al. (2018).

travaux récents montrent bien que l'organisation des CSC est dépendante des conditions et des espèces végétales étudiées.

1.3.2. Transport et régulation de l'activité des CESA

Plusieurs mécanismes permettent de contrôler l'activité des CESA. En modulant la sécrétion et le recyclage du CSC à la membrane plasmique, la biosynthèse s'en trouve impactée. De plus, certains processus de régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle des CESA sont connus pour moduler leur activité.

1.3.2.1. Sécrétion du CSC à la membrane plasmique

Différentes voies de sécrétion permettent d'acheminer les CSC à la membrane plasmique (McFarlane et al., 2014). Elles font intervenir le réseau *trans*-golgien, plusieurs systèmes vésiculaires et le cytosquelette (Drakakaki et al., 2012 ; E. F. Crowell et al., 2009) (Figure 22).

1.3.2.1.1. Maturation du CSC

Les CESA sont synthétisées et insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) puis transportées vers l'appareil de Golgi. Pour assembler le CSC, plusieurs mécanismes peuvent avoir lieu : l'utilisation du domaine à doigt de zinc ou l'utilisation de ponts disulfures et d'interactions non covalentes (Kurek et al., 2002 ; Atanassov et al., 2009). Le lieu d'assemblage du CSC n'est pas clairement défini même si le RE pourrait permettre la formation de liaisons entre les protéines (Howell, 2013). Il est cependant observable dans l'appareil de Golgi par microscopie électronique (Haigler, Brown, 1986). Il a récemment été mis en évidence que les protéines STELLO1 et STELLO2, localisées dans l'appareil de Golgi, régulent la distribution des CESA dans l'appareil de Golgi et contrôlent la sécrétion du CSC (Zhang et al., 2016).

1.3.2.1.2. Voies de sécrétion des CESA

L'appareil de Golgi est capable de sécréter directement des CESA au niveau de la membrane plasmique (E. F. Crowell et al., 2009). Cependant, la plupart des CESA sont délivrées par des vésicules liées aux microtubules appelés MASC/SmaCC (Sampathkumar et al., 2013). Ces compartiments migrent à des vitesses non constantes, en trajectoires linéaires et ces compartiments apparaissent en très grande quantité notamment lorsque la croissance des cellules est terminée ou en cas de stress (voir partie 1.4). Un MASC/SmaCC contient des CESA fluorescentes (FP-CESA) et est capable de sécréter à la membrane plasmique jusqu'à deux FP-CESA en même temps (Gutierrez et al., 2009). Les CESA sont alors considérées comme actives lorsqu'elles arrivent à la membrane plasmique. L'actine est un autre réseau important pour contrôler la distribution des CESA à la membrane plasmique. Lorsque celui-ci est dépolymérisé en présence de drogues spécifiques telles que la Latrunculine B ou dans des mutants déficients, la dynamique de l'appareil de Golgi est réduite. Les CESA sont alors distribuées de façon non homogène à la membrane plasmique (E. F. Crowell et al., 2009 ;

Gutierrez et al., 2009 ; Sampathkumar et al., 2013). En ce qui concerne les CESA de paroi secondaire, les marquages de YFP-CESA7 montrent que les CSC interagissent et sont sécrétés via le réseau d'actine et des CMT (Wightman, Turner, 2008 ; Watanabe et al., 2015). Il est intéressant de noter que les CSC de paroi primaire et secondaire coexistent à la membrane plasmique un bref moment lors de la transition vers la paroi secondaire (Meents et al., 2018 ; Watanabe et al., 2018).

La sécrétion des CSC est hautement contrôlée et modulée dans les cellules selon les besoins (E F Crowell et al., 2011). Dans l'épiderme d'hypocotyles de trois jours cultivés à l'obscurité, les cellules du bas de l'hypocotyle ont cessé de grandir et présentent une faible densité de CESA (voir Figure 1-Chapitre Résultats). On observe à l'inverse qu'il y a une forte densité de CESA en haut de l'hypocotyle, dans les cellules qui commencent à s'allonger. Différents facteurs influencent la sécrétion des CESA comme le pH de l'appareil de Golgi, le niveau des phosphatidylinositols membranaires, l'activité d'une kinésine FRA1 associée aux CMT, et des complexes d'exocytose associés à une protéine appelée PATROL1 (Luo et al., 2015 ; Fujimoto et al., 2015 ; Zhu et al., 2015, 2018). Pour les CSC de paroi secondaire, le complexe d'exocytose est aussi nécessaire pour leur sécrétion (Vukašinović et al., 2017). Il a également été montré que la disponibilité en carbone influence la sécrétion du CSC, notamment lors du cycle circadien (Ivakov et al., 2017).

1.3.2.1.3. Temps de vie des CESA à la membrane plasmique

La longueur des chaînes de cellulose est liée à la vitesse et au temps de demi-vie des CSC à la membrane plasmique (Bashline et al., 2014). Le temps de demi-vie doit directement impacter le degré de polymérisation des microfibrilles de cellulose. Sachant que les microfibrilles de cellulose sont au moins trois fois plus longues dans les parois secondaires, on peut s'attendre à ce que le temps de demi-vie des CESA dans les parois secondaires soit plus long que celui des CESA de la paroi primaire (McNeil et al., 1984). Le temps de demi-vie des CESA de paroi primaire avait été estimé à 21 min chez la mousse *Funaria hygrometrica* après un traitement à la monensine, un inhibiteur de la sécrétion via l'appareil de Golgi (Rudolph, Schnepf, 1988). Ces valeurs sont comparables à celles estimées à partir de la visualisation des CESA par microscopie confocale qui sont de l'ordre de 5 à 20 min (Bashline et al., 2013 ; Sampathkumar et al., 2013). Par western blot, il a été observé que la quantité de protéines de GhCESA1 dans les fibres de coton diminue très rapidement après un traitement à la cycloheximide inhibant la synthèse protéique alors que les autres protéines membranaires restent présentes plus de 4 heures (Jacob-Wilk et al., 2006). Les auteurs estiment le temps de demi-vie de GhCESA1 à 30 min. Pour les CESA de paroi secondaire, il n'y a pas de quantification précise mais Meents et al. (2018) propose des temps de demi-vie équivalents et que la différence de longueurs de chaînes de glucoses serait plutôt due à d'autres facteurs comme la vitesse des CESA et la fluidité membranaire.

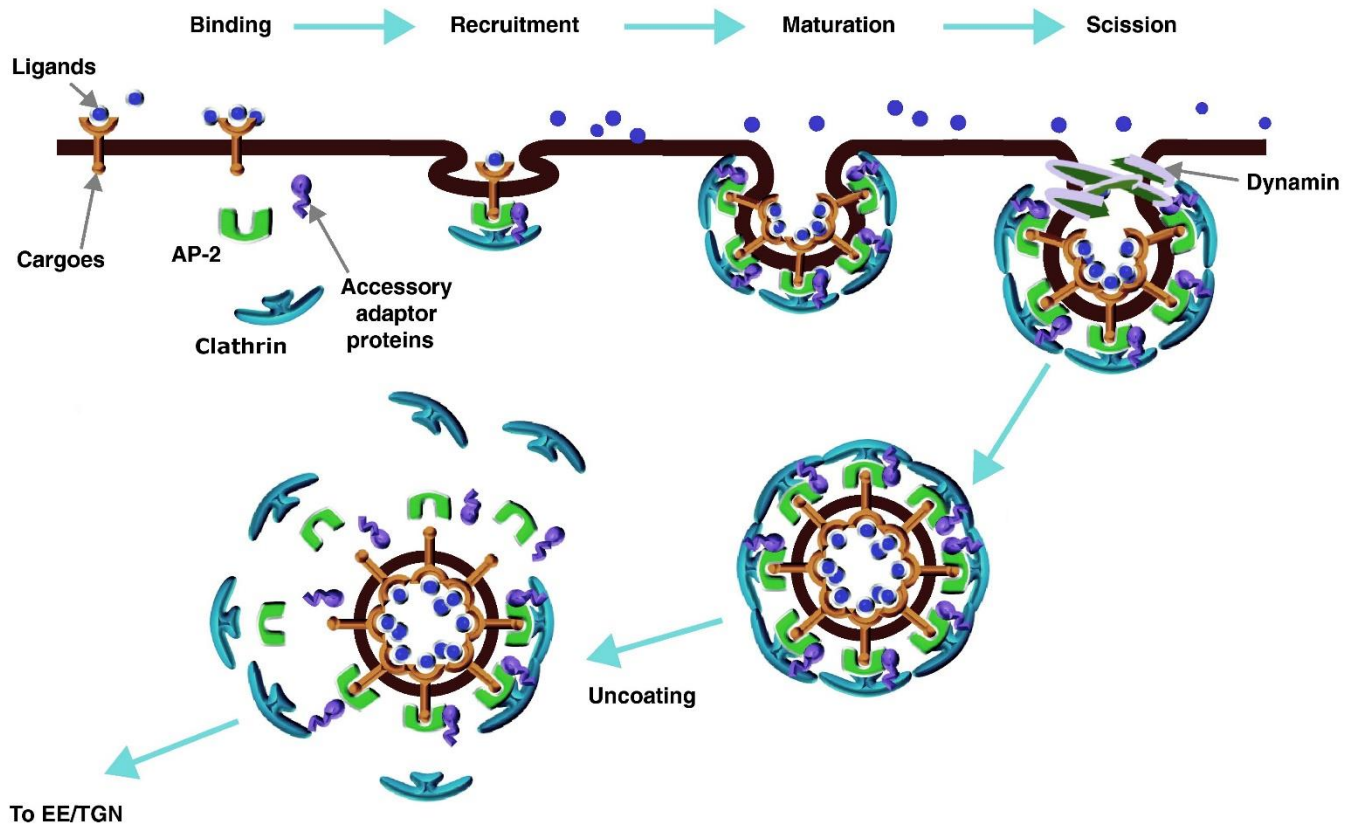


Figure 23. Formation des vésicules entourées de Clathrine participant à l'endocytose

Tout d'abord, les protéines cargo de la membrane plasmique s'associent avec leur ligand. Dès lors, un ensemble composé de clathrines, d'un complexe d'adaptation AP2 et de protéines accessoires va se lier aux protéines cargo. Il en résulte la formation d'une vésicule qui va s'internaliser dans la cellule. Enfin, l'ensemble AP2/clathrines/protéines accessoires se désagrège et la vésicule peut alors migrer vers le réseau *trans*-golgien (TGN). EE : early endosomes Adapté de Chen et al. (2011)

1.3.2.2. Recyclage du CSC

Si la synthèse de la cellulose ne se déroule qu'au niveau de la membrane plasmique, le trafic des CESA est un excellent moyen pour réguler sa densité. Les CESA sont présents dans de nombreux compartiments intracellulaires comme le réseau trans-golgien (TGN) or ce compartiment est une plateforme entre les systèmes de sécrétion et d'endocytose chez les plantes (Dettmer et al., 2006). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'endocytose est surtout réalisée à l'aide de vésicules de type clathrine CME (clathrin-mediated endocytosis) (Holstein, 2002 ; Samaj, 2004 ; Dhonukshe et al., 2007 ; Chen et al., 2011 ; Chao Wang et al., 2013 ; Mbengue et al., 2016). Certains complexes protéiques permettent de revêtir ces vésicules CME de clathrine. L'un d'entre eux est le complexe d'adaptation AP2 qui permet le recrutement des protéines cargo et des unités de clathrine (Chen et al., 2011) (Figure 23). Il a été montré qu'un constituant de AP2 peut interagir directement avec les CESA *in vitro* et est nécessaire pour l'internalisation de FP-CESA6 *in vivo* (Bashline et al., 2013). De plus, la densité des CESA à la membrane plasmique est altérée dans différents mutants CME incluant des membres d'un autre complexe impliqué dans les phénomènes d'endocytose (Hirst et al., 2015 ; Bashline et al., 2015 ; Reynolds et al., 2017). Les CESA endocytées sont retrouvées sur les voies du TGN ce qui pourrait permettre leur recyclage à la membrane plasmique (Bashline et al., 2014).

Le rôle des SmaCC/MASC n'est pas encore bien compris mais il a été proposé qu'ils pouvaient intervenir à la fois au niveau de la sécrétion mais aussi au niveau de l'endocytose des CESA (E. F. Crowell et al., 2009 ; Crowell et al., 2010 ; Gutierrez et al., 2009 ; Bashline et al., 2014). Les CSC internalisés sont stockés de façon transitoire dans les SmaCC/MASC et lorsqu'il n'y a plus de stress, les CSC sont de nouveau acheminés à la membrane plasmique. (Bashline et al., 2014). Il existe néanmoins toujours un paradoxe quant à la taille du complexe CSC internalisé. En effet la taille de la partie cytoplasmique des CESA a été estimée à 45-50 nm de large alors que le diamètre moyen des vésicules de clathrine (sans le manteau de clathrine) est plutôt aux alentours de 30 nm chez *Arabidopsis thaliana* (Bowling, Brown Jr., 2008 ; Dhonukshe et al., 2007 ; R Li et al., 2012). Ceci suggère qu'il doit y avoir des modifications des CESA ou de l'agencement du CSC pour que les CESA puissent être internalisées via les CME.

1.3.2.3. Régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle des CESA

Afin de contrôler la synthèse de cellulose à la membrane plasmique, les CESA peuvent être régulées au niveau transcriptionnelle. De plus, des régulations post-traductionnelles des protéines à la membrane plasmique ont aussi été mises en évidence.

1.3.2.3.1. Régulation transcriptionnelle des CESA

Les gènes *CESA1*, *CESA3* et *CESA6* sont co-exprimés chez *Arabidopsis thaliana* dans de nombreux organes (Hamann et al., 2004). Il a en effet été montré qu'une plante transgénique exprimant *CESA2* sous le contrôle du promoteur de *CESA6* complémente le phénotype du mutant *cesa6^{prc1}*, démontrant que *CESA2* est capable de remplacer *CESA6*

dans le CSC (Hamann et al., 2004). Il en est de même pour les gènes impliqués dans la mise en place de la paroi secondaire qui sont co-exprimés (Brown et al., 2005 ; Persson et al., 2005).

Les hormones peuvent réguler l'expression des gènes *CESA* au cours du développement mais aussi en réponse à l'environnement. Les brassinostéroïdes (BR) sont des hormones tout particulièrement importantes pour le contrôle de l'expansion cellulaire. Les BR sont perçus au niveau de la membrane plasmique par un récepteur-like kinase BRASSINOSTEROID INSENSITIVE (BRI1). Cela déclenche une cascade de signalisation aboutissant à la régulation de l'expression de gènes dépendants des BR. Il a été montré que des mutants affectés dans la biosynthèse ou la perception des BR présentent aussi des perturbations de la biosynthèse de la cellulose (Schrick et al., 2012). Par ailleurs des applications exogènes de BR permettent de restaurer dans le mutant *det2-1* (mutant affecté dans la biosynthèse des BR) l'expression des *CESA* mais pas dans le fond mutant *bri1-301* (mutant affecté dans la perception des BR) suggérant que la signalisation via les BR est importante pour réguler la transcription des *CESA* (Xie et al., 2011). Un élément clé dans la signalisation induite par les BR est la protéine BRASSINOSTEROID INSENSITIVE (BIN2). En l'absence de BR, BIN2 est active et phosphoryle deux facteurs de transcription : BRASSINAZOLE RESISTANT1 (BZR1) et BZR2/BES1 ce qui résulte en leur inactivation et leur dégradation (He et al., 2002 ; Wang et al., 2002). A l'inverse, en présence de BR, BIN2 est inactivée et dégradée ce qui active BES1 et BZR1 et induit alors l'expression de gènes positivement régulée. Il a alors été montré que BES1 et BZR1 sont capables de se lier aux promoteurs des gènes *CESA* de paroi primaire et secondaire (Xie et al., 2011). De plus, BIN2 est capable de phosphoryler CESA1 et donc de réguler négativement la synthèse de la cellulose (Sánchez-Rodríguez et al., 2017).

Des analyses transcriptomiques et génétiques ont permis d'identifier des cascades de régulation de l'expression des *CESA* impliquées dans la mise en place de la paroi secondaire (Zhong, Ye, 2010). Il a été montré que les facteurs de transcription SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN (SND1) and NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR (NST1) sont des éléments clés pour cette cascade de régulation (Zhong et al., 2006 ; Mitsuda et al., 2007). Les double mutants *snd1 nst1* ne forment plus de paroi secondaire dans les fibres des tiges et il n'y a plus de cellulose (R Zhong et al., 2007). Les facteurs de transcription MYB46 et MYB83 sont quant à eux des cibles directes des facteurs de transcription NAC (Ruiqin Zhong, Elizabeth A. Richardson, et al., 2007 ; Ruiqin Zhong, Elizabeth A Richardson, et al., 2007 ; McCarthy et al., 2009). La surexpression de *MYB46* ou *MYB83* provoque alors une surexpression de l'expression des *CESA* de paroi secondaire et induit le dépôt de paroi secondaire (Ko et al., 2009 ; McCarthy et al., 2009). MYB46 peut en effet se lier directement aux promoteurs des trois gènes de *CESA* de paroi secondaire (Kim, Ko, et al., 2013). Des analyses de séquences des *CESA* de paroi secondaire ont permis d'identifier des sites de liaison aux MYB appelés SMRE (MYB-responsive elements) ou MYB46RE (MYB46-responsive cis-regulatory element) (Zhong et al., 2013 ; Kim et al., 2012). Plusieurs

copies de ces MYB46RE ont été retrouvées dans les promoteurs des CESA de paroi secondaire confirmant que MYB46 est directement impliqué dans la régulation de l'expression des CESA de paroi secondaire (Kim, Kim, et al., 2013). Rien de tel n'a à ce jour été identifié dans les CESA de paroi primaire.

1.3.2.3.2. Régulation post-traductionnelle des CESA

Il existe aussi une régulation post-traductionnelle des CESA permettant de contrôler la densité et leur temps de demi-vie au niveau de la membrane plasmique. Des modifications post-traductionnelles vont alors impacter directement la stabilité et/ou l'activité des CESA.

Des travaux ont identifié des sites de phosphorylation spécifiques aux différentes isoformes de CESA (Carroll, Specht, 2011). Il a en effet été montré que l'activité de certaines CESA pouvait être régulée par des phosphorylations (Chen et al., 2010 ; Volker Bischoff et al., 2011). Les études concernant les phosphorylations de CESA1 ont montré que la phosphorylation T166, S686, et S688 sont importantes pour la production de cellulose et le contrôle de la vélocité des CSC. Par contre certaines mutations dans un seul site de phosphorylation peuvent entraîner une mobilité asymétrique des FP-CESA dans le mutant *cesa1^{rsw1}*. Cette asymétrie est dépendante de la présence des CMT car un traitement avec de l'oryzaline fait disparaître cette anomalie (Chen et al., 2010). Plusieurs travaux montrent que la lumière régule l'état de phosphorylation et l'activité de CESA5. Le mutant *cesa6^{prc1-1}* cultivé à l'obscurité présente un phénotype nain alors qu'il a un phénotype sauvage à la lumière (Desnos et al., 1996b). Si les isoformes CESA5 et CESA6 font partie du même groupe de CESA dans le CSC et ont une forte homologie de séquences, l'expression de CESA5 associée au promoteur de CESA6 ne suffit cependant pas pour restaurer le phénotype sauvage de *cesa6^{prc1-1}* (T Desprez et al., 2007). Seule la forme phosphorylée de CESA5 permet de compléter partiellement *cesa6^{prc1-1}*. A la lumière, CESA5 serait active et pourrait alors remplacer la CESA6 non fonctionnelle ayant pour conséquence le phénotype sauvage de *cesa6^{prc1-1}*. De nombreux sites de phosphorylation supposés sont présents dans les différents domaines des CESA et pour une grande majorité des isoformes (Jones et al., 2016 ; Taylor, 2007). L'activité de polymérisation de CESA7 peut par exemple être impactée par son état de phosphorylation ainsi que leur recyclage via le protéasome. Les protéines kinases impliquées dans ces processus ne sont en revanche pas connues et leur identification serait une avancée considérable dans la compréhension du processus de synthèse des composés pariétaux.

En plus de la phosphorylation, les CESA pourraient être ubiquitinylées. CESA6 a en effet été détectée dans un crible de protéines ubiquitinylées mais avec un seuil de confiance peu élevé (Manzano et al., 2008). Si cela se retrouve avéré, cela signifie que les CESA pourraient être recyclées via le protéasome une fois ubiquitinylées. Une autre modification post-traductionnelle démontrée pour les CESA est l'acylation de résidus cystéine (Kumar et al., 2016). Il a été montré que ces acylations sont nécessaires pour la

localisation des CSC de paroi secondaire dans le xylème. De telles modifications post-traductionnelles pourraient augmenter l'hydrophobicité des CESA en favorisant leur association avec les lipides de la membrane plasmique. Ainsi, ces acylations assureraient leur stabilité dans la membrane même quand les microfibrilles de cellulose propulsent les CSC lors de la polymérisation. L'apport d'acyles au niveau des CESA pourrait faciliter la formation de microdomaines lipidiques ce qui pourrait être un moyen de réguler la biosynthèse de la cellulose (Guerriero et al., 2010 ; Kumar et al., 2016).

1.3.3. Autres protéines accompagnant le CSC

Plusieurs protéines autres que les CESA sont également impliquées dans la synthèse de la cellulose. De nouvelles découvertes ne cessent d'augmenter le nombre de ces protéines et leur rôle n'est pas toujours clairement défini. Tout semble indiquer que ces acteurs annexes aux CESA permettent de contrôler finement la biosynthèse.

1.3.3.1. Coupure supposée des chaînes de glucanes : KOR1

Le gène *KORRIGAN1* (*KOR1*) code pour une endo-1,4- β -D-glucanase localisée dans la membrane plasmique et ayant un rôle dans l'élongation cellulaire (Nicol et al., 1998). Les mutants *kor1* présentent en effet une altération de l'architecture pariétale avec moins de cellulose cristalline que ce soit pour la paroi primaire ou secondaire (Szyjanowicz et al., 2004 ; Sato et al., 2001). La fonction de KOR1 n'a encore pas été clairement démontrée même si on la sait nécessaire pour la biosynthèse de la cellulose. L'utilisation de plantes transgéniques exprimant la construction GFP-KOR1 a permis de mettre en évidence que KOR1 est co-localisée avec le CSC au moins dans les endosomes, l'appareil de Golgi ainsi qu'à la membrane plasmique et que les trajectoires de GFP-KOR1 sont similaires à celles observées pour GFP-CESA3 (Robert et al., 2005 ; Vain et al., 2014). Il a été montré que KOR1 interagit avec les CESA et que des perturbations de la biosynthèse de cellulose impactent aussi sa localisation. En hydrolysant la cellulose KOR1 pourrait libérer les tensions mécaniques subies par les microfibrilles, réguler le degré de polymérisation des chaînes de glucanes ou encore libérer le CSC lorsque celui-ci est internalisé (Ueda, 2014). Des sites de glycosylation et de phosphorylation sont détectés dans KOR1 (Liebminger et al., 2013 ; Jones et al., 2016) et la régulation de son activité peut donc avoir un impact sur le contrôle de la biosynthèse de cellulose.

1.3.3.2. Agencement des microfibrilles de cellulose : COB, CTL1 et CTL2

Le gène *COBRA* (*COB*) code pour une protéine située dans l'apoplaste mais possédant un ancrage dans la membrane plasmique de type glycosylphosphatidylinositol (GPI). Il fait partie d'une famille multigénique appelée COBRA-like et composée de 12 membres chez *Arabidopsis thaliana* (Brady et al., 2006). Le mutant *cobra* a été identifié à l'origine pour sa croissance racinaire anormale avec une expansion cellulaire radiale exagérée ainsi qu'une diminution de la production de cellulose cristalline (Benfey et al., 1993 ; Schindelman et al., 2001). Il a été montré que COB est impliqué dans l'orientation des

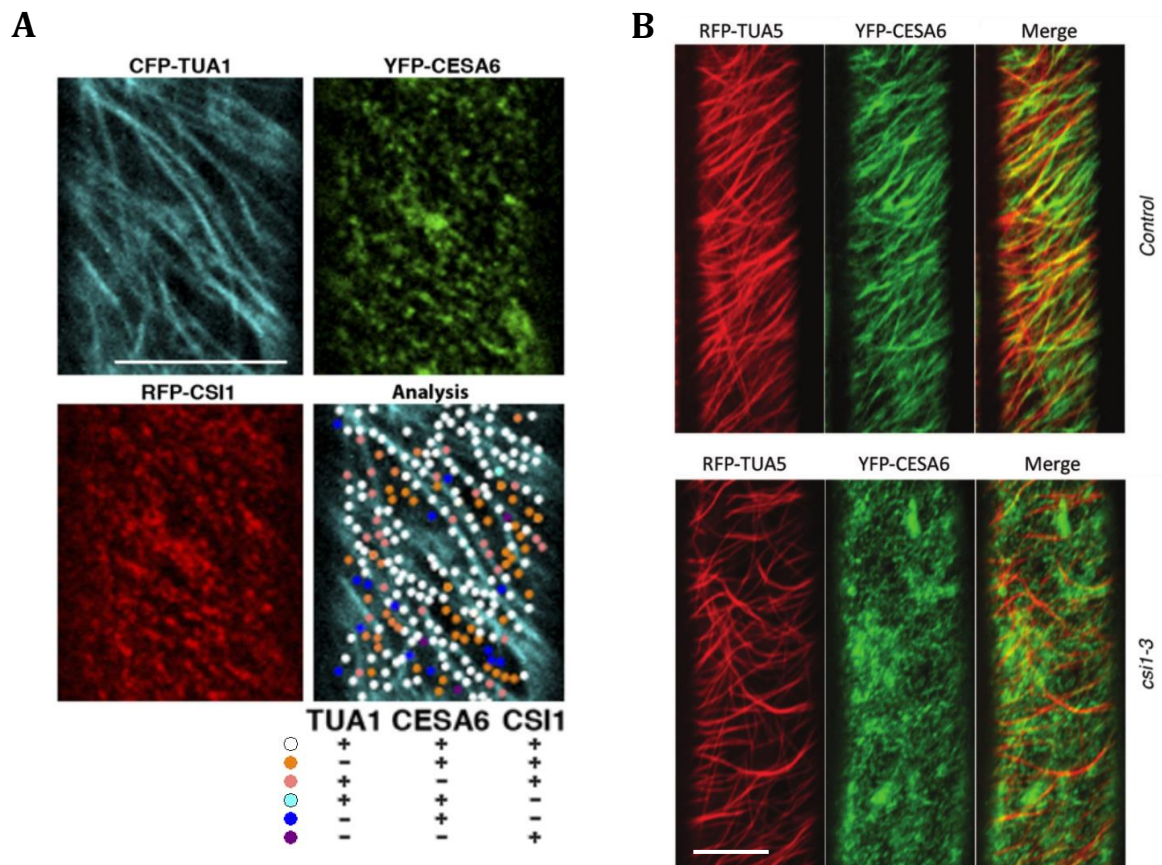


Figure 24. La protéine CSI1 à l'interface entre les CMT et les CSC

- (A) Le triple marquage de CSI1, CESA6 et TUA1 (tubuline A composant les CMT) avec des protéines fluorescentes montre que CSI1 co-localise avec les CMT et les CSC à la membrane plasmique de cellules de l'épiderme d'hypocotyles d'*Arabidopsis thaliana* cultivés à l'obscurité. Barre d'échelle = 10 μ m. Adapté de Li et al. (2012)
- (B) Superposition des différents temps d'acquisition d'un film (Z-projection) montrant la superposition des CMT et des trajectoires des CSC dans le fond génétique sauvage. Dans le cas du mutant *csi1*, les trajectoires de CESA sont plus aléatoires et co-localisent beaucoup moins avec les CMT. Barre d'échelle = 10 μ m. Adapté de Lei et al. (2012)

microfibrilles de cellulose et donc dans le contrôle de la croissance anisotrope lors de la morphogénèse (Roudier et al., 2005). Des travaux plus récents menés par Liu et al. (2013) sur la protéine BC1 (Brittle Culm1) chez le maïs (*Zea mays*), appartenant à la famille des COBRA-like ont montré que sa séquence possède en position N-terminale un domaine CBM (pour Carbohydrate-Binding Domain) se liant *in vitro* à la cellulose cristalline et nécessaire pour la cristallinité des microfibrilles de cellulose. L'ancre GPI de la même façon semble importante pour permettre l'interaction *in vivo* avec la cellulose. Il n'y aucune évidence qui laisse penser que les COB se lient directement aux CSC mais sembleraient plutôt se lier aux microfibrilles de cellulose nouvellement polymérisées pour influencer leur orientation et leur cristallinité. Les mécanismes sous-jacents ne sont cependant pas encore connus.

Deux autres protéines influençant la biosynthèse de la cellulose font partie de la famille des chitinase-like (CTL) et sont donc localisées dans l'apoplaste : CTL1/POM1 et son homologue CTL2 (Zhang et al., 2004). L'association entre ces CTL et les parois primaires ou secondaires a été décrite pour plusieurs espèces. A l'origine, CTL1/POM1 a été identifié comme régulateur de l'expansion cellulaire dans la racine tout comme COB (Benfey et al., 1993) et des analyses chimiques de la paroi par microspectroscopie FTIR associent le mutant *ctl1* aux individus déficients en cellulose (Mouille et al., 2003). Sanchez-Rodriguez et al. (2012) ont montré que les CTL peuvent se lier aux hémicelluloses et à la cellulose : les mutants présentent d'ailleurs une altération de la structure des polymères en plus d'une diminution de la quantité de cellulose cristalline par rapport à la forme amorphe. Ils ont également observé CTL1-GFP dans différents compartiments endosomaux dont les MASC contenant les CSC internalisés. La dynamique du CSC est altérée dans le fond mutant *ctl1*. Ces résultats suggèrent que ces CTL environnent les CESA et régulent par un mécanisme encore inconnu la cristallinité de la cellulose nouvellement synthétisée modifiant alors notamment les interactions entre cellulose et hémicelluloses.

1.3.3.3. Lien avec les microtubules corticaux : CSI1, CC et CMU

Comme décrit précédemment, l'orientation des microfibrilles de cellulose est étroitement liée à celle des CMT. Cela s'explique par le fait que le CSC est guidé par ces CMT lors de son déplacement, pour la paroi primaire et secondaire (Alexander R Paredez et al., 2006 ; Wightman, Turner, 2008). En désorganisant les CMT avec des traitements à l'oryzaline, les trajectoires des CSC sont changées et la vitesse des CSC est réduite bien que le taux de CESA délivrées à la membrane plasmique reste similaire à celui détecté dans les plantes contrôles (Alexander R Paredez et al., 2006 ; Gutierrez et al., 2009 ; Shundai Li et al., 2012 ; Woodley et al., 2018). Plusieurs modèles pour expliquer ce lien entre les CMT et les CSC ont été avancés (Martin Bringmann et al., 2012) et des travaux récents ont permis de trouver des protéines liant physiquement ces deux partenaires.

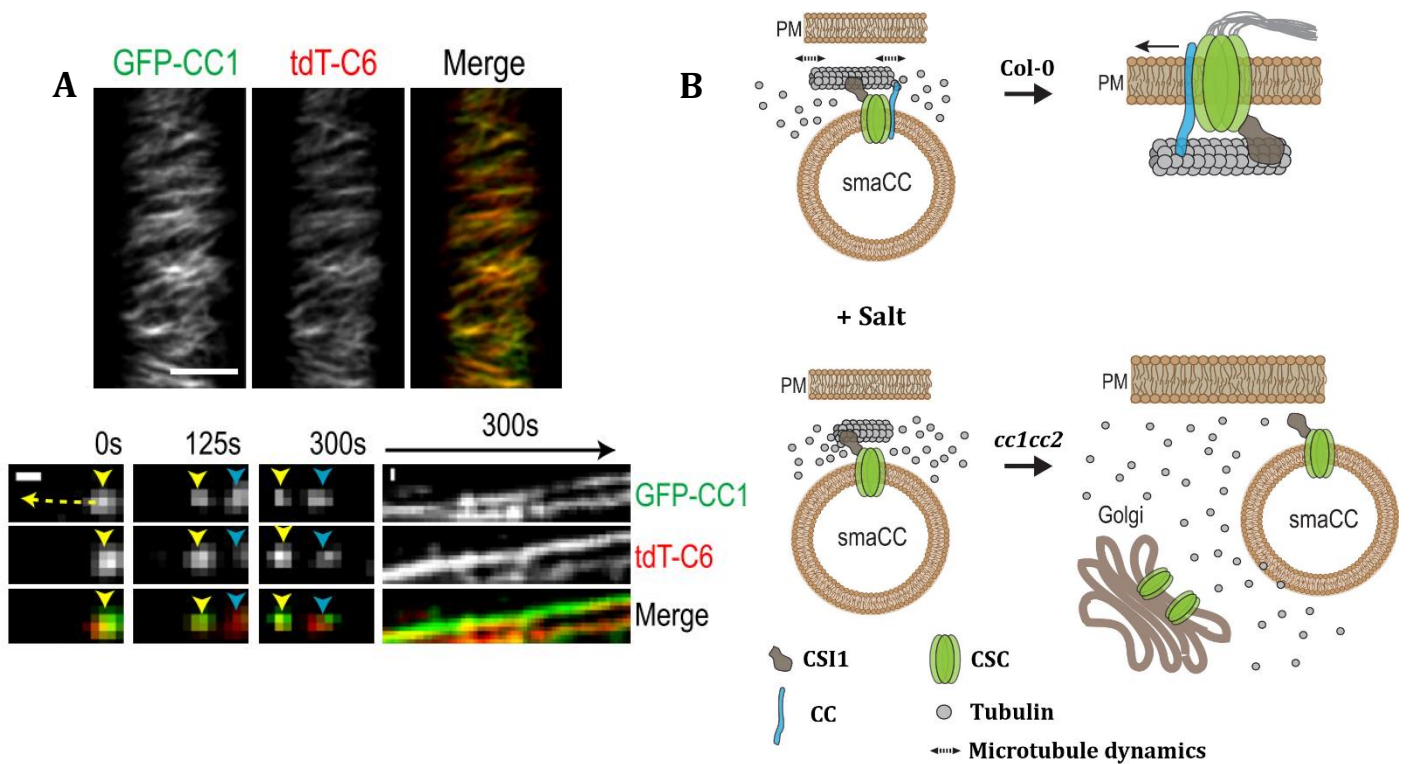


Figure 25. Les protéines CC lient les CMT avec les CSC et favorisent la tolérance au stress salin

(A) (Haut) Co-localisation de CC1 et CESA6 à la membrane plasmique de cellules de l'épiderme d'hypocotyles d'*Arabidopsis thaliana* cultivés à l'obscurité. Barre d'échelle = 5 μm . (Bas) CC1 et CESA6 migrent ensemble au cours du temps. Barre d'échelle = 0,5 μm . Adapté de Endler et al. (2015)

(B) Modèle illustrant la fonction des protéines CC dans le stress salin. Lorsque CC1 et CC2 sont inactives, les CSC ne retournent pas à la membrane plasmique après un stress salin (où le complexe est internalisé dans les SmaCC/MASC). Adapté d'Endler et al. (2015)

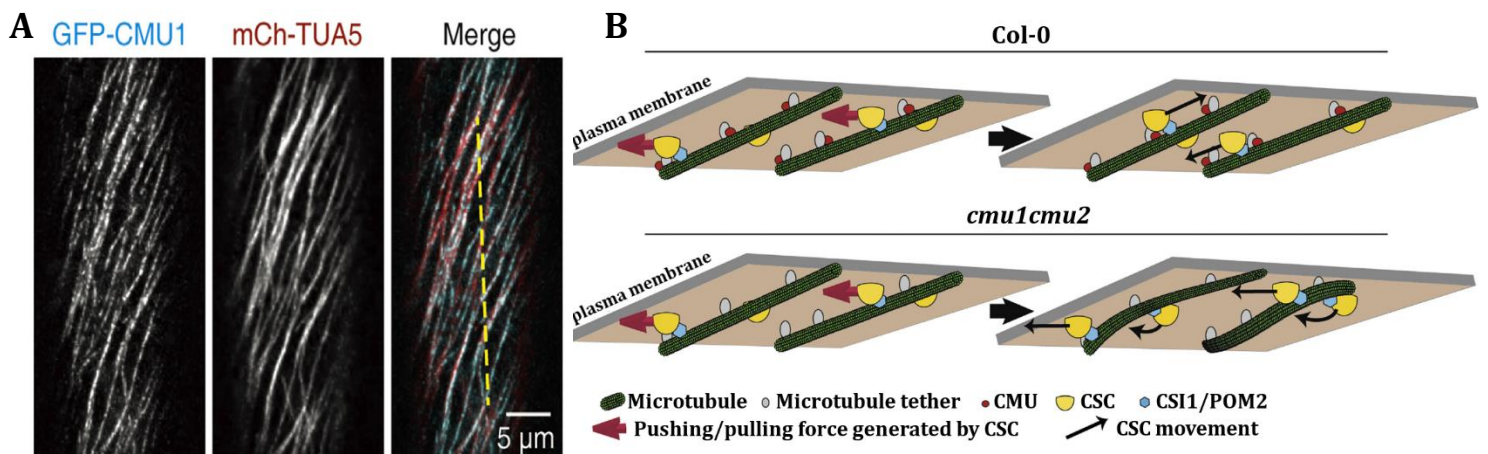


Figure 26. Les protéines CMU stabilisent les CMT lors du déplacement du CSC

(A) Co-localisation des CMT et de CMU1 dans des cellules de l'épiderme d'hypocotyles d'*Arabidopsis thaliana* cultivés à l'obscurité, ce dernier étant ancré dans la membrane plasmique. Barre d'échelle = 5 μm . Issu de Liu et al. (2016)

(B) Lorsque les CMU ne sont pas fonctionnelles, les forces appliquées par le CSC entraînent le déplacement du CMT auquel il est rattaché. Les CMU permettent donc de stabiliser les CMT et de contrecarrer le stress mécanique dû aux forces de polymérisation de la cellulose. Adapté de Liu et al. (2016)

La première à avoir été identifiée est Cellulose Synthase Interacting (CSI)1/POM2 (Gu et al., 2010 ; Shundai Li et al., 2012 ; M. Bringmann et al., 2012). Le mutant *csi1/pom2* a été à l'origine décrit pour une altération de l'expansion cellulaire dans la racine (Hauser et al., 1995). Ce mutant présente également une diminution de croissance dans l'hypocotyle et une diminution de la quantité de cellulose cristalline (M. Bringmann et al., 2012). CSI1 interagit à la fois avec les CESA de paroi primaire ou secondaire et les CMT (Li et al., 2011 ; Gu, Somerville, 2010 ; M. Bringmann et al., 2012 ; Schneider et al., 2017) (Figure 24A). Elle est aussi nécessaire pour leur co-alignement : dans le mutant *csi1*, la vélocité des CESA diminue et leurs trajectoires ne coïncident plus avec les CMT (Shundai Li et al., 2012) (Figure 24B). Lei et al. (2012) ont montré que RFP-CSI1 est présent dans les MASC avec les CSC, mettant en évidence que CSI1 maintient son rôle d'intermédiaire entre les CMT et CSC même lorsque celui-ci n'est plus à la membrane plasmique. Zhu et al. (2018) ont montré récemment que CSI1 participe également à la sécrétion du CSC à la membrane plasmique et permettrait alors son arrimage aux CMT. CSI1 fait partie d'une famille de trois membres chez *Arabidopsis thaliana* et possède 55% d'homologie avec CSI2 et CSI3 (Gu et al., 2010). CSI3 co-localise aussi avec les CESA de la paroi primaire et migre avec elles le long des microtubules mais on n'observe dans le fond mutant *csi3* aucun phénotype de croissance altérée ni de perturbation du lien CESA-CMT (Lei et al., 2013). Seul le double mutant *csi3csi1* présente ces caractéristiques similaires à *csi1*. Enfin la dynamique de GFP-CSI3 est dépendante de CSI1 ce qui laisse penser à un rôle différent de ce dernier.

Un nouveau partenaire du complexe se liant aussi aux CMT a récemment été découvert : les protéines Companion of Cellulose synthase (CC), CC1 et CC2 (Endler et al., 2015). Elles favorisent la formation des CMT et semblent contrôler leur dynamique. GFP-CC1 est délivré et se déplace à la membrane plasmique de la même manière que tdT-CESA6 (Figure 25A). Il a été montré que les CC interagissent avec le CSC et que leur partie cytosolique se lie aux CMT. Ces protéines favorisent d'ailleurs leur polymérisation. Endler et al. (2015) ont donc mis en évidence de nouvelles protéines assurant ce lien étroit entre les CMT et le CSC et qui permettent aussi le maintien de la dynamique du complexe en cas de stress salin (Figure 25B). Le double mutant *cc1cc2* présente en effet une plus forte sensibilité à ce stress : en l'absence de CC fonctionnelles, les CSC internalisés ne peuvent revenir à la membrane plasmique car le réseau de CMT est altéré et ne peut se re-polymériser.

Si les CMT guident le CSC à la membrane plasmique, celui-ci exerce en retour une force mécanique sur les microtubules influençant leur dynamique. En perturbant la synthèse de cellulose via différents moyens (voir partie 1.4), il est possible d'altérer le réseau des CMT (Fisher, Cyr, 1998 ; Paredez et al., 2008). Liu et al. (2016) ont identifié des protéines appelées Cellulose-Microtubule Uncoupling proteins (CMU) stabilisant les microtubules et évitant leur déplacement lors du passage du CSC. Trois protéines homologues sont présentes chez *Arabidopsis thaliana* : CMU2 et CMU3 possèdent respectivement 55% et 53% d'homologie avec CMU1. *CMU1* est fortement co-exprimé avec les *CESA* de la paroi primaire. Il a été montré que GFP-CMU1 reste immobile à la

membrane plasmique (Liu et al., 2016) (Figure 26A). Dans les mutants *cmu*, les CSC nouvellement déposés à la membrane plasmique s'arriment aux CMT via la protéine CSI ou CC mais ces derniers deviennent instables. Les CMU se lient en effet *in vitro* aux microtubules et les données *in vivo* montrent qu'elles sont aussi en interaction avec la membrane plasmique. Elles serviraient d'ancrage des CMT dans la membrane et permettraient de résister à la force qu'exercent les complexes (Figure 26B).

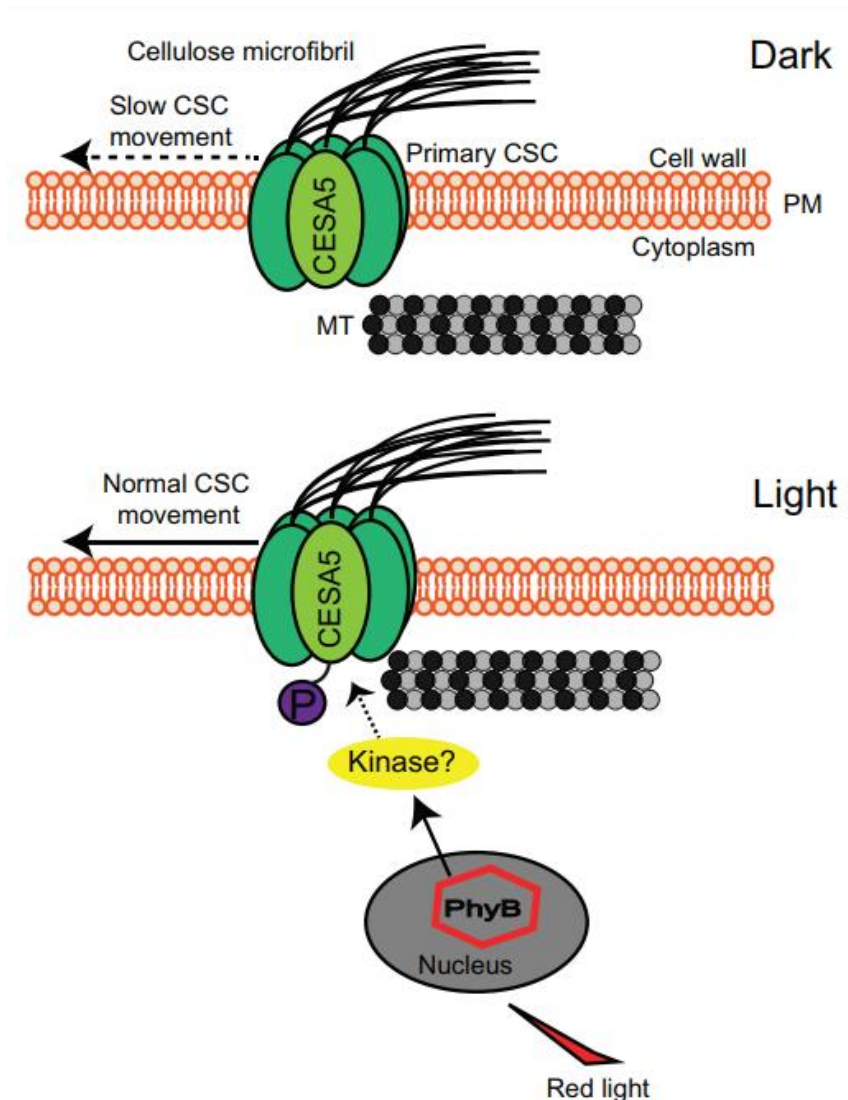


Figure 27. Régulation de l'activité de CESA5 par la lumière

A l'obscurité, les CSC contenant des CESA5 migrent plus lentement que ceux avec les autres CESA6-like. A la lumière, l'activation du phytochrome B (PhyB) entraînerait la phosphorylation de CESA5 via une kinase inconnue ce qui activerait CESA5 : le CSC évolue à une vitesse normale. Issu de Wang et al. (2015)

1.4. Perturbation de la biosynthèse de la cellulose

La caractérisation de mutants déficients en cellulose ainsi que l'utilisation de molécules qui inhibent la synthèse de la cellulose ont permis de mieux comprendre les mécanismes de synthèse de la cellulose et de sa régulation.

1.4.1. Stress affectant la biosynthèse de cellulose

Les plantes étant des organismes sessiles, elles subissent leur environnement et doivent y répondre. La paroi végétale et en particulier la synthèse de la cellulose peut être impactée par cet environnement et les différents stress associés (Kesten et al., 2017).

1.4.1.1. Stress abiotiques

L'environnement a parfois un impact négatif sur le développement des plantes et les stress abiotiques peuvent perturber la croissance et la synthèse de la cellulose (Ting Wang et al., 2015).

1.4.1.1.1. Stress salin et osmotiques

La pression de turgescence est supposée être la force qui permet l'expansion cellulaire. Lors de stress osmotiques, on observe des changements de pression interne des cellules allant dans les cas extrêmes jusqu'à l'état de plasmolyse où la membrane plasmique se décolle de la paroi végétale. Cela provoque alors un arrêt de la synthèse de la cellulose au niveau de la paroi. En cas de stress osmotique plus modéré, les FP-CESA disparaissent de la membrane plasmique et se retrouvent dans les SmaCC/MASC ainsi que dans les vésicules d'endocytose (E F Crowell et al., 2009 ; Bashline et al., 2015). A l'inverse, la perturbation de la synthèse de cellulose impacte le statut en eau de la plante. En effet, la cellulose est un élément important de la paroi des vaisseaux du xylème. Des mutations *cesa8^{lew2}* entraînent des vaisseaux collapsés ce qui entrave le transport et la disponibilité en eau de toute la plante (Chen et al., 2005a). Le stress salin induit un stress osmotique (dû au sel présent en dehors des cellules) et ionique (dû à l'accumulation d'ions à l'intérieur de la cellule tels les ions sodium Na⁺).

Chez *Arabidopsis thaliana*, différents gènes *CESA* sont impliqués dans les réponses au stress salin (Heyndrickx, Vandepoele, 2012) et plusieurs protéines accompagnant le CSC ont un impact sur la tolérance à ce stress. Nous avons décrit précédemment les protéines CC qui relient les CMT et le complexe CSC. Le stress salin déstabilise les CMT et entraîne la présence des CESA dans les SmaCC/MASC (A R Paredez et al., 2006 ; Wang et al., 2007). Les CC permettent alors de limiter ces effets en rétablissant une dynamique normale des CMT en fin de stress (Endler et al., 2015). Il est à noter que le double mutant *cc1cc2* est hypersensible au stress salin mais pas au stress osmotique. Il a également été montré que la mutation *ctl1^{hot2}* entraîne une hypersensibilité au stress salin et au stress osmotique même si le mécanisme sous-jacent n'a pas été clairement établi (Kwon et al., 2007). La protéine KOR1 joue aussi un rôle puisque des mutants

kor1^{rsw1-1} et *kor1^{rsw2-1}* présentent une hypersensibilité au stress salin (Kang et al., 2008). KOR1 est fortement glycosylée *in vivo* et l'état de N-glycosylation semble nécessaire pour son activité et la tolérance au stress. Un autre lien indirect entre la biosynthèse de la cellulose et le stress salin a été établi grâce à l'étude du mutant *kobito* (*kob^{abi8}*) affecté dans une glycosyltransférase nécessaire pour la synthèse de cellulose (Pagant et al., 2002). Ce mutant a été isolé lors d'un crible de mutants capables de germer en présence de 3 μ M d'ABA, hormone clé dans la réponse aux stress osmotiques (Brocard-Gifford, 2004).

1.4.1.1.2. Stress lumineux

Les plantes étant des organismes photosynthétiques, leur croissance est régulée par la lumière afin de contrôler leurs apports énergétiques (Fankhauser, Christie, 2015). La paroi est un puit de carbone majeur à cause de sa composition en polysaccharides dont la cellulose. Via la photosynthèse, la lumière impacte la disponibilité en carbone pour synthétiser la matière organique et il est donc logique de penser que les stress liés à la lumière influencent la biosynthèse de cellulose de manière directe ou indirecte. Il est connu que la forte luminosité entraîne la réorganisation du cytosquelette : en réorganisant les filaments d'actine, la distribution des chloroplastes est modifiée (Trojan, Gabrys, 1996). Des hypocotyles de plantules cultivées à l'obscurité et soumis à la lumière bleue présentent une réorientation de leur CMT responsables de leur phototropisme (Lindeboom et al., 2013). La sécrétion et le recyclage des CESA à la membrane plasmique sont liés au cytosquelette (voir partie 1.3.2) et on peut donc supposer que des perturbations lumineuses impactent ces processus.

Au niveau transcriptionnel, il a été montré que les conditions lumineuses impactent l'expression de différents gènes de la famille des *CESA* et des *CESA-like* chez *Arabidopsis thaliana* et *Zea mays* (Hamann et al., 2004 ; Van Erp, Walton, 2009 ; V Bischoff et al., 2011). Cependant il est encore difficile de trancher entre une régulation directe par des acteurs tels que les phytochromes et les cryptochromes ou une régulation indirecte ayant pour conséquence un changement de la disponibilité en carbone pour la cellule. Des mutants affectés dans la voie de signalisation de la lumière comme les mutants *phya*, *cry1*, *phyb*, *hy5* et *cop1* présentent des changements au niveau de l'expression de gènes *CESA* mais aussi au niveau du contenu en cellulose (Xin Wang et al., 2015).

Au niveau post-traductionnel, des phosphopeptides de CESA ont été détectés au niveau de plusieurs études protéomiques (Boex-Fontvieille et al., 2014 ; Wu et al., 2013 ; Nuhse et al., 2004) et l'état de phosphorylation des CESA influencent leurs activités (voir partie 1.3.2.3) et affectent donc la synthèse de cellulose. Bischoff et al. (2011) ont montré que l'activation de CESA5 est dépendante de la perception de la lumière par le phytochrome B. En effet à l'obscurité, dans les cellules de l'épiderme de l'hypocotyle, les GFP-CESA5 présentent une vitesse réduite (Figure 27). Dans ces conditions, seules les plantes transgéniques exprimant *CESA5* avec un état de phosphorylation constitutif présentent une augmentation de la vitesse des CSC. De plus, la vitesse des CSC à

l'obscurité augmente après avoir reçu un traitement court de 10 min de lumière rouge ce qui suggère que la perception de la lumière rouge via le phytochrome B est primordiale pour contrôler la synthèse de cellulose (Volker Bischoff et al., 2011). Ces résultats sont en adéquation avec le fait que l'activation de ce phytochrome est capable de restaurer la croissance du mutant *cesa6^{prc1-1}* (Desnos et al., 1996b).

Les conditions photosynthétiques ont un impact sur la quantité de carbone qui sera allouée pour la synthèse de la cellulose et sur l'abondance des phosphopeptides de CESA (Boex-Fontvieille et al., 2014). Ces résultats suggèrent que les voies de signalisation activées en fonction des disponibilités en carbone et en lumière ont les mêmes conséquences sur les enzymes pariétales. Il a aussi été montré qu'après une croissance en conditions limitées en carbone, CESA3 est phosphorylée trois minutes après l'apport exogène de saccharose et que ce mécanisme dépend de l'activité d'une kinase appelée SIRK1 (Wu et al., 2013). Enfin le passage d'un milieu en présence de saccharose à un milieu qui n'en contient plus provoque une redistribution des GFP-CESA3 dans les compartiments intracellulaires (Fujimoto et al., 2015).

1.4.1.1.3. Stress thermiques

Les changements de température affectent également le métabolisme et impactent la croissance. En augmentant la température de culture de 21°C à 29°C, la vitesse du CSC augmente et l'élongation de l'hypocotyle par la même occasion (Fujita et al., 2011). Cette augmentation de température résulte aussi en une baisse de la cristallinité de la cellulose ce qui montre une relation inverse entre le taux de synthèse de la cellulose et le degré de cristallinité de la cellulose. Au niveau transcriptionnel, il a aussi été observé chez *Medicago sativa* que de fortes températures augmentent l'expression de plusieurs CESA (Guerriero et al., 2014). Certains mutants affectés dans les gènes *CESA1* ou *CESA3* ou dans *KOR1* sont sensibles à la température (T Arioli et al., 1998 ; Lane et al., 2001 ; Wang et al., 2006). Les traitements au froid diminuent l'expression de certains gènes de CESA pour le peuplier (*Populus trichocarpa*) et le cotonnier mais en augmente pour des individus de riz tolérants au froid (*Oryza sativa*, cultivar *indica*) (Ko et al., 2011 ; Zhang et al., 2012 ; Zhu et al., 2013 ; Chen et al., 2014). D'autres effets plus indirects des changements de température ont pu être observés. L'un d'entre eux est l'effet sur la fluidité membranaire : la membrane plasmique notamment va être plus fluide à forte température et inversement (Los, Murata, 2004). Cela explique qu'à plus forte température, les CESA migrent plus rapidement dans la membrane plasmique. Il a aussi été montré qu'un changement de l'état de phosphorylation des phosphoinositides présents dans les membranes a des conséquences directes sur la localisation des CESA. Des traitements avec de la wortmannine qui inhibent l'activité des phosphatidylinositols 3-(PI3k) et 4-(PI4K) kinases et des traitements avec du PAO, un inhibiteur plus spécifique de PI4K empêchent l'internalisation des GFP-CESA3 (Fujimoto et al., 2015).

Un autre effet est l'impact sur les CMT. En condition de faible température, une dépolymérisation des CMT est induite (Graham, Patterson, 1982 ; Sangwan et al., 2001)

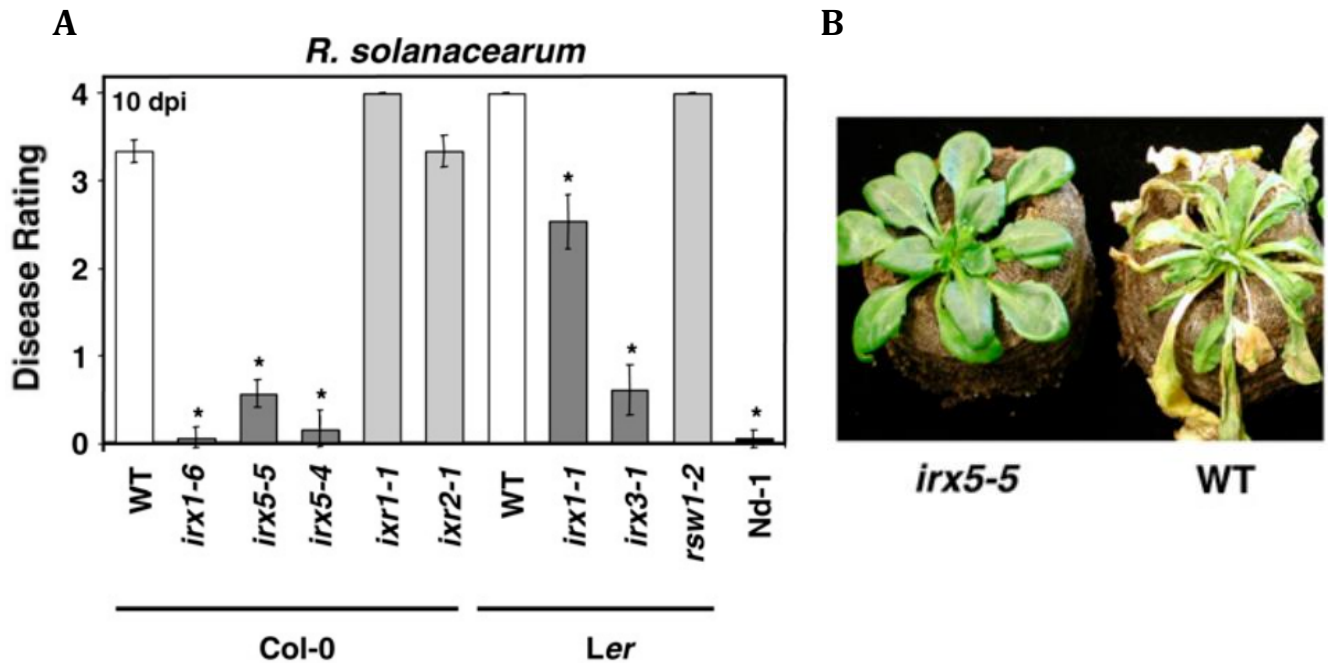


Figure 28. Résistance de mutants *cesa* au pathogène *Ralstonia solanacearum*

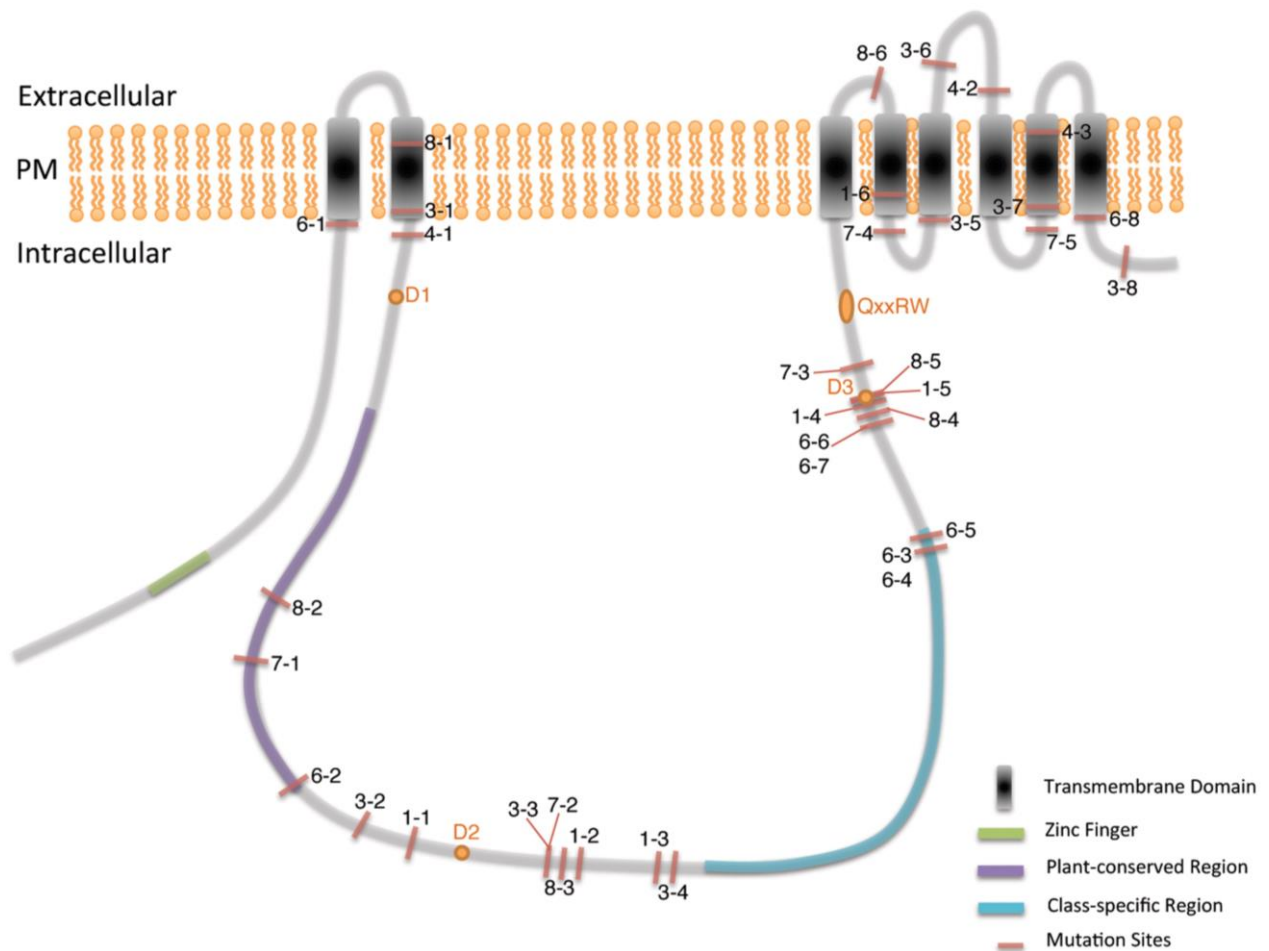
- (A) Sévérité de la maladie provoquée par l'infection de la bactérie sur différents génotypes. Les mutants *cesa* de paroi primaire (gris clair) sont sévèrement touchés par la maladie comme les lignées sauvages (blanc) tandis que les mutants *cesa* de paroi primaire (gris foncé) sont plus résistants comme l'écotype résistant *Nd-1*.
- (B) Photographie de plantes inoculées 12 jours avec *Ralstonia solanacearum*. Le sauvage est sévèrement touché (nécroses apparentes) tandis que le mutant *cesa4^{irx5-5}* est résistant (feuilles bien vertes). Issu de Hernandez-Blanco et al. (2007)

et on peut alors supposer un effet de ce stress sur la sécrétion et le recyclage des CESA à la membrane plasmique.

1.4.1.2. Stress biotiques

Une des premières barrières que rencontrent les microorganismes qui tentent d'infecter les plantes et la paroi végétale est son réseau de microfibrilles de cellulose. C'est pourquoi de nombreux pathogènes sécrètent des enzymes dégradant la cellulose pour faciliter leur progression : certains nématodes comme *Globodera rostochiensis*, des bactéries comme *Thermobifida fusca*, *Clostridium thermocellum* ou encore des mycètes tels que *Botrytis cinerea* et *Fusarium graminearum* (Smant et al., 1998 ; Wilson, 2004 ; Flors et al., 2007). Des études transcriptomiques durant l'infection de *Botrytis cinerea* ont mis en évidence que ce pathogène exprimait pour fragiliser la cellulose de la paroi végétale des endo- β -1,4-glucanases, des cellobiohydrolases et des β -glucosidases (Blanco-Ulate et al., 2014 ; Espino et al., 2005). Ces enzymes exprimées lors de l'infection peuvent impacter la pathogénicité de ces pathogènes. De la même façon, il a été montré que les micro-organismes symbiotiques pouvaient aussi produire des cellulases pour faciliter la colonisation de leurs hôtes (Trujillo et al., 2014 ; Sillo et al., 2016). Le lien entre déstabilisation du polymère de cellulose et infection accrue des microorganismes est donc indéniable. D'ailleurs, il a été montré que des peupliers, qui sous-expriment KOR1 et qui ont donc moins de cellulose que les plantes contrôles, présentent une meilleure colonisation par le mycète ectomychorizien *Laccaria bicolor* (Kalluri et al., 2016).

Certains mutants affectés dans les CESA peuvent entraîner des résistances à des pathogènes souvent suite à des dérégulations de voies de signalisation induites par les hormones. Il a ainsi été montré que le mutant *cesa3^{cevl}* dans lequel les voies de l'éthylène et de l'acide jasmonique sont activées de façon constitutive présente des résistances aux aphides, aux mycètes biotrophes responsables de l'apparition de l'oïdium et à une bactérie du genre *Pseudomonas* (Ellis et al., 2002 ; Ellis, 2001). Il existe aussi des mutations *cesa4^{irx5}*, *cesa7^{irx3}* et *cesa8^{irx1}* qui confèrent une résistance à la bactérie du sol *Ralstonia solanacearum* et au champignon nécrotrophe *Plectosphaerella cucumerina* (Hernandez-Blanco et al., 2007). De façon surprenante les mutations *cesa1^{rsw1}*, *cesa3^{irx1}* et *cesa6^{irx2}* n'ont pas d'effet sur la résistance à ces mêmes pathogènes. La résistance octroyée par les mutations des CESA de paroi secondaire est dans ces cas-là indépendante des voies de signalisation induites par l'acide salicylique, l'éthylène et l'acide jasmonique mais plutôt dépendante de celle de l'acide abscissique (ABA) (Hernandez-Blanco et al., 2007) (Figure 28). Il est en effet connu que la surexpression de gènes régulés par l'acide abscissique dont des gènes codant pour des protéines de transfert lipidique (LTP) ou de métabolites secondaires antimicrobiens (comme ATR1) fait partie des mécanismes de défense des plantes face aux pathogènes (Molina, García-Olmedo, 1993 ; Grubb, Abel, 2006). Le lien entre déficience en cellulose et l'acide abscissique est d'autant plus certain depuis qu'il a été montré que l'allèle *cesa8^{irx1-6/ern1/lew2-1}* provoque une augmentation de la quantité d'acide abscissique *in planta* (Chen



	AICESA1	AICESA3	AICESA6	AICESA4	AICESA7	AICESA8					
1-1	<i>rsw1-1</i> (A549V)	3-1	<i>eli1-1</i> (S301F)	6-1	<i>prc1-19</i> (Y275*)	4-1	<i>irx5-3</i> (Q263*)	7-1	<i>mur10-1</i> (W444*)	8-1	<i>lew2-1</i> (W217*)
1-2	<i>any1</i> (D604N)	3-2	<i>eli1-2</i> (A522V)	6-2	<i>prc1-20</i> (L522*)	4-2	<i>exi2</i> (Y939*)	7-2	<i>fra5</i> (P557T)	8-2	<i>fra6</i> (R362K)
1-3	<i>rsw1-2</i> (G631S)	3-3	<i>than</i> (P578S)	6-3	<i>prc1-1</i> (Q720*)	4-3	<i>irx5-2</i> (W995*)	7-3	<i>mur10-2</i> (H734Y)	8-3	<i>exi1-2</i> (G508E)
1-4	<i>rsw1-45</i> (E779K)	3-4	<i>cev1</i> (G617E)	6-4	<i>prc1-3</i> (Q720*)			7-4	<i>irx3</i> (W859*)	8-4	<i>irx1-2</i> (S679L)
1-5	<i>rsw1-20</i> (D780N)	3-5	<i>mre1</i> (G916E)	6-5	<i>prc1-9</i> (K722*)			7-5	<i>exi5</i> (W954*)	8-5	<i>irx1-1</i> (D683N)
1-6	<i>aegaeus</i> (A903V)	3-6	<i>ixr1-2</i> (T942I)	6-6	<i>prc1-4</i> (W777*)					8-6	<i>lew2-2</i> (L792F)
		3-7	<i>ixr1-1</i> (G998D)	6-7	<i>prc1-5</i> (W777*)						
		3-8	<i>rsw5</i> (P1056S)	6-8	<i>ixr2-1</i> (R1064W)						
* – stop codon		Mutants in Black – Columbia Background			Mutants in Blue – Landsberg Background			Mutants in Purple – C24 Background			

Figure 29. Positions de différentes mutations sur la structure protéique des CESA

Les mutants de CESA de paroi primaire et secondaire étudiés chez *Arabidopsis thaliana* sont représentés sur la structure schématique d'une CESA. Les modifications qu'entraînent ces mutations dans la séquence protéique sont résumées dans le tableau en bas de figure. Différentes régions et domaines de la protéine sont également mentionnés. Issu de Li et al. (2014)

et al., 2005b). Il existe aussi des liens plus directs entre la synthèse de la cellulose et la résistance à certains pathogènes. Certaines études montrent que lors d'une attaque par un pathogène, le réseau de CMT peut être réorienté (Lee et al., 2013 ; Guo et al., 2016). Il a été montré également que la protéine CMU2 est capable d'interagir avec l'effecteur HaRxL79 sécrété par l'oomycète biotrophe *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Mukhtar et al., 2011). Le mutant *cmu2^{klc}* est d'ailleurs moins résistant que le sauvage à *H. arabidopsidis*. Cela suggère que certains pathogènes vont perturber les trajectoires de CSC au niveau de la membrane plasmique provoquant ainsi une production de cellulose anormale et par conséquent une fragilisation de la structure pariétale.

Certains nématodes ont établi une autre stratégie pour déstabiliser la paroi : produire des expansines qui vont rompre les liaisons non-covalentes entre les microfibrilles de cellulose et les hémicelluloses (Qin et al., 2004). Enfin, d'autres pathogènes produisent des phytotoxines ciblant la paroi : l'Acetobixane pour les bactéries du genre *Bacillus* et la Thaxtomine A pour le genre *Streptomyces* sont des inhibiteurs de la synthèse de la cellulose et produits lors de l'infection (Volker Bischoff et al., 2009 ; Xia et al., 2014) (voir partie 1.4.2).

1.4.1.3. Stress constitutifs : les mutations *cesa*

Les approches génétiques sont d'une grande aide pour étudier les processus métaboliques et notamment la biosynthèse de la cellulose. Avant même l'identification des CESA dans les années 90s (Tony Arioli et al., 1998 ; Kimura et al., 1999), beaucoup de mutants correspondants aux différentes isoformes ont été étudiés mais sous des noms différents (voir Annexe 1). De nombreux phénotypes y sont associés en plus d'une déficience en cellulose (Li et al., 2014). Pour les CESA de paroi secondaire, beaucoup de mutations causent des problèmes au niveau du xylème avec de nombreux vaisseaux collapsés : c'est le cas des mutations *cesa8^{irx1}* (irregular xylem 1) (Taylor et al., 2000), *cesa4^{irx5}* (Taylor et al., 2003) ou *cesa7^{mur10}* (Bosca et al., 2006). En ce qui concerne les CESA de paroi primaire, les mutants ont des pertes d'anisotropie plus ou moins conséquentes. Ainsi, les mutations *cesa1^{rsw1}* (radially swollen 1) (Baskin et al., 1992) et *cesa1^{any1}* (Fujita et al., 2013) entraînent la formation d'organes plus épais et plus courts tout comme les mutations *cesa3^{rsw5}* et *cesa3^{than}* (thanatos) (Daras et al., 2009) ou *cesa6^{prc1}* (procuste 1) (Desnos et al., 1996a ; Fagard et al., 2000). Les plantes mutées présentent le plus souvent un phénotype nain. Ces mutations sont localisées dans les zones cytosoliques et transmembranaires des CESA (Figure 29) qui sont donc importantes pour assurer la polymérisation de la cellulose. Les mutations *cesa1* et *cesa3* nulles sont létales pour le gamétophyte. D'autres mutations entraînent des réponses proches de ce qui peut être observé avec les stress abiotiques. Ainsi, la mutation *cesa3^{cev1}* entraîne une surexpression constitutive de gènes de réponse au stress et produit naturellement plus d'acide jasmonique et d'éthylène que la normale (Ellis, 2001). Les mutations *cesa3^{eli1-1}* et *cesa3^{eli1-2}* (ectopic lignin 1) entraînent l'activation de ces mêmes voies de signalisation avec également une lignification ectopique –inhabituelle– de la paroi dans des cellules qui ne le sont pas chez le sauvage. La perturbation de la

CBI	CAS number	IC ₅₀ bean callus	Inhibition Arabidopsis growth	Effects and possible targets	References
Dichlobenil	1194-65-6	0.5 mM	0.4 mM	Accumulated and reduced motility of FP-CESA in plasma membrane. DCB binds microtubule associated protein 20. One mutant is resistant to DCB.	Delmer 1987; Heim 1998; Delbot 2007; Rajangam 2008
Isoxaben	82558-50-7	3 nM	4.5 nM; 1 nM; 1.5 nM	Decreased ¹⁴ C-glucose incorporation into cellulose in soybean and maple cell cultures. Decreased FP-CESA signal in plasma membrane, decreased FP-motility and increased FP-CESA signal in SmaCC/MASC. Some cesa3 and cesa6 are resistant to Isoxaben.	Huggenberger 1982; Heim 1989; Heim 1990; Heim 1998; Desprez 2002; Lefebvre 1987; Gutierrez 2009; Crowell 2009; Scheible 2001.
Thaxtomin A	122380-18-1	0.6 nM	25-50 nM	¹⁴ C-sucrose incorporation into cellulose, decreased FP-CESA signal in plasma membrane, and increased FP-CESA signal in MASCs. Altered FTIR spectra.	King et al., 1992; Fry and Loria 2002; Bischoff 2009; Scheible 2003; Crowell 2009
Flupoxam	116440-33-6	2 nM	6 nM	Cell swelling with no change of CMT organisation and altered FTIR spectra in Arabidopsis.	O'Keeffe and Kleveland, 1991; Hoffman and Vaughn, 1996; Crowell 2009
Triazofenamide	85830-77-9	15 nM	39 nM	Decreased ¹⁴ C-glucose incorporation into cellulose in Arabidopsis.	Heim 1998
TZ Compound 1	N/A	N/A		Decreased incorporation of ³ H-glucose into cellulose in corn and soybean. Some Arabidopsis isoxaben resistant cesa3 mutants are also resistant to TZ.	Sharples 1998
CGA 325'615	N/A	5 nM	0.625 nM	Decreased crystalline cellulose and increased non-crystalline cellulose in cotton fibres. Decreased FP-signal in plasma membrane, increased FP-CESA signal in MASC.	Peng et al., 2001; Crowell 2009
AE F150944	205869-58-5	1 nM	10 nM	Reduced secondary cell wall thickening and fewer rosettes in freeze fracture of Zinnea elegans cell cultures. Decreased FP-CESA signal in plasma membrane decreased FP-CESA motility and increased FP-CESA signal in SmaCC.	Kiedaisch 2003; Gutierrez 2009
Indaziflam	950782-86-2	671 pM	200 pM	Active on monots and dicots; decreased of ¹⁴ C-glucose into cellulose; increased accumulation of FP-CESA at the plasma membrane and reduced velocity; Isoxaben and quinoxiphen resistant plants are sensitive to Indaziflam.	Brabham 2014
Quinoxiphen	203063-70-1	N/A	1 mM	Decreased ¹⁴ C-glucose incorporation into cellulose, decreased FP-CESA signal in plasma membrane, decreased FP-CESA motility and increased FP-CESA signal in SmaCC. Several cesa1 mutants are quinoxiphen resistant.	Harris 2012; Lefebvre 1987
C17	N/A	N/A	0.1 mM	Reduced glucose content, decreased FP-CESA signal in plasma membrane, increased FP-CESA signal in SmaCC. Mutations in cwm (cell wall maintainer) confer C17 tolerance.	Hu 2016
Cobtorin	N/A	1 mM (BY2cells)	1 mM	Perturbs the parallel relationship between CMT and nascent cellulose microfibrils; overexpression of PME and PG suppressed the cobtorin-induced cell-swelling phenotype.	Yoneda 2007; Yoneda 2010
Morlin	87-05-8	1 mM (switchgrass)	1 mM	Decreased ¹⁴ C-glucose incorporation into cellulose, altered CMT organisation and dynamics and decreased FP-CESA signal and motility in the plasma membrane.	Debolt 2007

Tableau 1. Récapitulatif de différents CBI connus et étudiés avec leurs effets et leurs cibles possibles

Leur nom commun, leur numéro d'identification CAS (Chemical Abstracts Service), leurs concentrations nécessaires pour inhiber la croissance chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) et *Arabidopsis thaliana* ainsi que les références correspondantes sont indiqués.

Adapté de McFarlane et al. (2014)

biosynthèse de la cellulose est donc un stress qui pourra être perçu et entraîner des réponses comme pour les stress biotiques ou abiotiques (voir partie 1.5). Les mutations dans les autres gènes *CESA* comme *CESA2*, *CESA5* ou *CESA9* présentent des phénotypes peu marqués à cause de la redondance fonctionnelle de ces protéines pour la composition du CSC (T. Desprez et al., 2007). Des mutations *cesa5* et *cesa9* provoquent des défauts au niveau des téguments des graines (Stork et al., 2010 ; Sullivan et al., 2011). Par contre le triple mutant *cesa2cesa5cesa6* n'est pas viable et la triple mutation *cesa2cesa6cesa9* est létale pour le gamétophyte (Persson et al., 2007).

Etant donné qu'il existe 10 gènes *CESA* chez *Arabidopsis thaliana*, la question de la redondance fonctionnelle entre les différentes isoformes *CESA* se pose. Par exemple les mutants nuls affectés dans les *CESA* impliqués dans la mise en place de la paroi secondaire sont encore capables de produire de la cellulose mais dans de moindres quantités et la cristallinité des microfibrilles est altérée (Taylor et al., 2003). Dans ce cas, une isoforme de *CESA* de paroi primaire pourrait compenser partiellement la fonction des *CESA* de paroi secondaire. Plusieurs travaux étayaient cette idée. Des expériences visant à exprimer *CESA1* sous le contrôle du promoteur *CESA8* dans le fond mutant nul *cesa8^{trx1}* ont permis de montrer une restauration partielle du phénotype sauvage (Carroll et al., 2012 ; Li et al., 2013). De plus *CESA7* exprimé sous le contrôle du promoteur *CESA3* peut également compléter partiellement le défaut de croissance du mutant *cesa3^{je5}* (Carroll et al., 2012). Enfin la surexpression de *cesa7^{fra5}*, un mutant dominant négatif, provoque des défauts au niveau des parois primaires et secondaires (Zhong et al., 2003).

Des études où les auteurs ont échangé des domaines de *CESA* de paroi secondaire ou de paroi primaire chez *Arabidopsis thaliana* et réalisé des tests de complémentation de mutants *cesa*, ont permis de montrer que c'est la position de l'isoforme au sein du complexe qui est importante (Wang et al., 2006 ; Kumar et al., 2017). Par exemple, *CESA7* est la seule *CESA* de paroi secondaire qui est capable de former avec la protéine YFP une protéine fonctionnelle (en lien avec l'encombrement stérique qu'engendre la protéine fluorescente). Ces résultats sont renforcés par les travaux récents de Kumar et al. (2018) qui ont généré des mutations identiques au niveau du site catalytique des trois *CESA* de paroi secondaire, plus précisément au niveau du motif TED. Ces mutations ont été introduites dans les trois mutants respectifs *cesa8*, *cesa7* et *cesa4* (Kumar et al., 2018). Ce travail permet de mettre en évidence que chaque mutation ne provoque pas les mêmes changements : ces derniers sont beaucoup plus marqués quand *CESA8* est mutée.

1.4.2. Inhibition chimique de la biosynthèse de cellulose

De nombreuses études en biologie végétale ont utilisé des approches d'inhibition chimique pour élucider des questions fondamentales sur le développement (Dejonghe, Russinova, 2017). En utilisant de petites molécules bioactives aussi appelées drogues, il est possible de perturber les systèmes biologiques afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. Ce genre de démarches a de nombreux avantages si on les

CBI	Formule chimique
Dichlobenil	2,6-dichlorobenzonitrile
Isoxaben	N-(3-(1-Ethyl-1-methylpropyl)-5-isoxazolyl)-2,6-dimethylxybenzamide
Thaxtomin A	4-nitroindol-3-yl-containing 2,5-dioxopiperazine
Flupoxam	1-(4-chloro-3-((2,2,3,3,3-pentafluoro-propoxy)methyl)phenyl)-(-phenyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboximide
Triazofenamide	1-[3-methyl phenyl]-5-phenyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboximide
TZ Compound 1	(5-tert-butyl-carbamoyloxy)-3-(3-trifluoromethyl) phenyl-4-thiazolidinone
CGA 325'615	1-cyclohexyl-5-(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-1H-1,2,4-thiazine-3-amine
AE F150944	N2-(1-ethyl-3-phenylpropyl)-6-((1-fluoro-1-methylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine
Indaziflam	N-[[[(1R,2S)-2,3-dihydro-2,6-dimethyl-1H-inden-1-yl]-6-[(1RS)-1-fluoroethyl]-1,3,5-triazine-2,4-diamine
Quinoxiphen	4-(2-bromo-4,5-dimethoxy-phenyl)-3,4-dihydro-1H-benzo-quinolin-2-one
C17	5-(4-chlorophenyl)-7-(2-methoxyphenyl)-1,5,6,7-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a] pyrimidine
Cobtorin	4-((2-chlorophenyl)-methoxy)-1-nitrobenzene
Morlin	7-ethoxy-4-methyl chromen-2-one

Tableau 2. Formules chimiques de différents CBI connus et étudiés

Les molécules sont classées dans le même ordre que pour le Tableau 1

compare avec les approches génétiques plus traditionnelles (Blackwell, Zhao, 2003 ; Kawasumi, Nghiem, 2007). Contrairement aux stress constitutifs induits par des mutations classiques, les drogues permettent de stresser les plantes de manière ponctuelle, réversible et avec une intensité contrôlée (en modulant la concentration du composé et le temps de traitement). L'effet de ces molécules est souvent plus global et permet de dépasser les limitations imposées par une famille multigénique où la fonction des gènes qui la compose peut être redondante. Cette approche a aussi l'intérêt d'être applicable dans plusieurs tissus et plusieurs espèces en même temps. L'action de ces drogues peut être combinée avec des cribles génétiques afin d'isoler des mutants résistants ou hypersensibles à ces drogues. L'identification de ces mutations permet de mieux décortiquer le mécanisme étudié. Cela en fait par la même occasion une source d'herbicides et des applications agronomiques peuvent en découler. Cependant un désavantage de cette méthode est la méconnaissance du mode d'action et de la cible directe des drogues, constituant un défi à relever. A ce jour, les approches d'inhibitions chimiques sont toujours beaucoup utilisées et plus de 40 cribles de molécules basés sur l'étude de phénotypes ont été réalisés (Dejonghe, Russinova, 2017), constituant des bibliothèques de composés considérables.

1.4.2.1. Inhibiteurs de la biosynthèse de la cellulose (CBI)

La perturbation chimique de la biosynthèse de la cellulose est connue et utilisée depuis de nombreuses années (Robert P. Sabba, Vaughn, 1999). Les inhibiteurs de la biosynthèse de la cellulose (CBI pour cellulose biosynthesis inhibitor) sont catégorisés dans le groupe L des herbicides par la classification HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) (<http://hracglobal.com/>). Certains d'entre eux sont d'ailleurs utilisés comme tels dans les champs : le Flupoxam (Kudo et al., 1999), le 2,6-dichlorobenzonitrile (DCB) (Delmer et al., 1987) ou encore l'Isoxabène (Huggenberger et al., 1982) mais seul ce dernier est encore autorisé en France pour cet usage par l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES, <https://ephy.anses.fr/>). La plupart du temps, ils sont alors utilisés pour prévenir la pousse des plantes adventices avant la mise en culture. Il a été montré par exemple que l'Isoxabène inhibe la croissance de l'hypocotyle uniquement s'il est appliqué sur des plantules de moins de 48h (Refrégier et al., 2004). Selon Tateno et al. (2016), un composé peut être considéré comme un CBI s'il répond à trois critères (Figure 30) : (1) les plantules traitées montrent les symptômes caractéristiques d'une déficience en cellulose c'est-à-dire une anisotropie réduite dans les tissus en croissance (diminution de la taille et augmentation de l'épaisseur des organes) (2) une réduction de la quantité de cellulose de manière dose-dépendante (3) une réduction de l'incorporation de glucose lors de la polymérisation des chaînes de glucose. Pour cela, l'utilisation des FP-CESA permettant de suivre le déplacement des CSC au niveau de la membrane plasmique et donc indirectement la polymérisation de la cellulose a facilité l'étude des CBI.

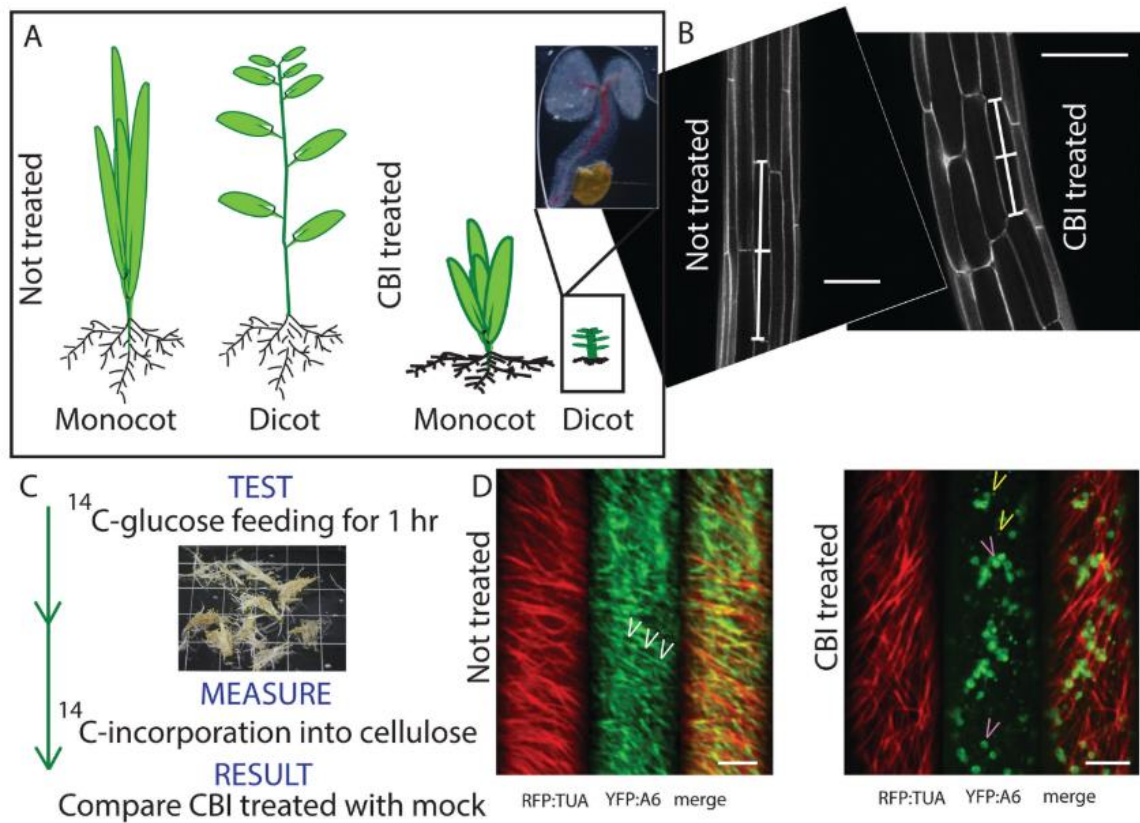


Figure 30. Classification des inhibiteurs de la biosynthèse de la cellulose (CBI)

Il est généralement admis que pour qu'une molécule soit classée parmi les CBI, elle doit entraîner : une altération de la croissance des plantes traitées (A) avec perte d'anisotropie (B), une réduction de la quantité de cellulose produite (C) et un impact sur le complexe de cellulose synthase (ici représenté par YFP-CESA-) (D). Issu de Tateno et al. (2016)

1.4.2.2. Distinction entre les CBI

A ce jour, une quinzaine de CBI ont été décrits et leur effets étudiés pour plusieurs espèces (Tableau 1 et 2) (García-Angulo et al., 2012 ; Tateno et al., 2016 ; R P Sabba, Vaughn, 1999). Si tous perturbent la biosynthèse de la cellulose et répondent aux critères des CBI, ils se distinguent néanmoins par leur mode d'action. Ainsi, la sensibilité des monocotylédones et des dicotylédones varie largement selon les CBI. Les monocotylédones sont par exemple moins sensibles à l'Isoxabène (Marie-France Corio-Costet et al., 1991 ; Robert P. Sabba, Vaughn, 1999). Cabanne et al. (1987) ont étudié l'incorporation de l'Isoxabène marqué au ^{14}C au niveau des racines du blé et du colza d'hiver : ce dernier absorbe davantage le CBI ce qui expliquerait en partie sa plus grande efficacité. A l'inverse l'Indaziflame (C Brabham et al., 2014) est plus efficace sur les monocotylédones : la concentration nécessaire pour avoir 50% d'inhibition de croissance –aussi appelée IC_{50} – est en moyenne deux fois plus importante que pour les dicotylédones (Sebastian et al., 2017). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela : les différences de composition pariétale, de métabolisme, d'absorption et de translocation du CBI dans toute la plante (Tateno et al., 2016). L'équipe de Seth DeBolt propose un système de classification des CBI basé sur l'observation *in vivo* de leur effet sur la dynamique des CSC par microscopie confocale (Brabham, DeBolt, 2013 ; Tateno et al., 2016) mais à l'heure actuelle, l'effet de tous les CBI sur la dynamique des FP-CESA par imagerie en temps réel n'a pas encore été décrit (Figure 30).

1.4.2.2.1. Classement selon l'effet des CBI sur les FP-CESA

Un premier groupe de CBI entraîne le retrait du CSC de la membrane plasmique. On retrouve notamment dans ce groupe l'Isoxabène (Gutierrez et al., 2009), le CGA 325'615 (CGA) (E. F. Crowell et al., 2009), le C17 (Hu et al., 2016), l'AE F150944 (Gutierrez et al., 2009), la quinoxylène (Harris et al., 2012) et la Thaxtomine A (V Bischoff et al., 2009). Tous ces composés sont synthétiques à l'exception de la Thaxtomine A qui est une phytotoxine produite par le genre *Streptomyces*. La cible de ces CBI n'est pas clairement identifiée mais des mutations ponctuelles dans les CESA de paroi primaire confèrent des résistances partielles à certains CBI : notamment *cesa1* et *cesa3* pour le C17 (Hu et al., 2016), *cesa3^{aeg}*, *cesa3^{ixr1-2}* pour la quinoxylène (Harris et al., 2012) et *cesa3^{ixr1-1}*, *cesa3^{ixr1-2}* et *cesa6^{ixr2-1}* pour l'Isoxabène (Scheible et al., 2001 ; T. Desprez et al., 2002). L'internalisation du CSC a été observée dans les SmaCC/MASC une vingtaine de minutes après des traitements au CGA et à l'Isoxabène (E F Crowell et al., 2009 ; Gutierrez et al., 2009). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Les CBI de ce groupe pourraient modifier le transport spécifique des CSC ou bien impacter le système endomembranaire en général. La sécrétion, le processus de recyclage ou la localisation des CESA pourraient alors être affectés. Le temps de demi-vie de GhCESA1 à la membrane plasmique a été estimé à moins de 30 minutes ce qui est largement inférieur au temps moyen des autres protéines membranaires (Jacob-Wilk et al., 2006). Il n'est donc pas exclu que l'appauvrissement des CSC à la membrane ne soit dû qu'au recyclage naturel des protéines. Ces drogues pourraient aussi dissocier les complexes CSC et

provoquer l'endocytose des CESA. Il a notamment été montré que l'AE F150944 déstabilise l'organisation des rosettes de *Zinnia elegans* (Kiedaisch et al., 2003). Ce type de déstabilisation a aussi été observé dans le mutant thermosensible *cesa1^{rsw1-1}* : à 31°C les rosettes se dissocient au bout de trois heures (T Arioli et al., 1998). De nombreuses protéines s'associent au CSC (voir partie 1.3) et pourraient constituer des cibles de ces CBI. Il a d'ailleurs été montré que les localisations de GFP-KOR1, GFP-CSI1, GFP-CC1 sont également impactées par des traitements à l'Isoxabène (Robert et al., 2005 ; M Bringmann et al., 2012 ; Endler et al., 2015).

Un deuxième groupe de CBI contient peu de molécules dont le DCB et induit une diminution de la vélocité du CSC à la membrane plasmique (Seth DeBolt et al., 2007). Cette diminution peut même aller jusqu'à un arrêt total du déplacement des CSC. De plus, ces molécules entraînent une accumulation de complexes à la membrane plasmique (Herth, 1987 ; Chad Brabham et al., 2014). Le déplacement des CSC est directement en lien avec leur activité de polymérisation et la réduction de leur vélocité suite à l'ajout de CBI peut donc traduire un ralentissement de la biosynthèse de cellulose. Une fois encore, on peut supposer un effet de ces CBI sur la sécrétion et le recyclage des CESA : si moins de CSC quitte la membrane plasmique, la sécrétion de nouveaux complexes peut expliquer l'accumulation de protéines.

Enfin le troisième groupe de CBI perturbe à la fois l'organisation des trajectoires de CESA et de CMT. Ces CBI ne causent cependant pas la dépolymérisation des CMT. Ce sont des molécules qui ont été isolées lors de cribles car elles perturbent la synthèse pariétale. Le premier de cette catégorie est la Morline (dérivé coumarinique) (Yoneda et al., 2007 ; S DeBolt et al., 2007). Cette drogue provoque un réarrangement des CMT en les organisant en faisceaux plus épais et la vélocité des FP-CESA est réduite. La deuxième drogue est la Cobtorine qui provoque l'élargissement de cellules de tabac et supprime la co-localisation entre le réseau de CMT et les microfibrilles de cellulose (Yoneda et al., 2007). Des mutants surexprimant des PME ou une PG présentent des hypocotyles plus longs que les plantules sauvages traitées avec la Cobtorine et un apport exogène de PG permet de restaurer l'alignement entre les CMT et les microfibrilles de cellulose dans les cellules tabac (Yoneda et al., 2007, 2010). Enfin chez *Arabidopsis thaliana*, un traitement à la Cobtorine réduit légèrement le contenu en pectines et provoque une augmentation du taux de pectines méthylesterifiées. Il existe donc des rétrocontrôles entre l'organisation de la paroi et l'organisation des CMT mais le lien exact n'est pas encore identifié.

1.4.2.2.2. Autres CBI difficilement classables

Il y a quatre autres CBI qui ne sont pas classés. Tout d'abord, la drogue appelée Indaziflam n'a pas été classée dans ces groupes car elle présente des effets différents de celles décrites par DeBolt et al. C'est un herbicide utilisé aux champs qui agit au niveau du photosystème II (Dietrich, Laber, 2012 ; Brosnan et al., 2011 ; Sebastian et al., 2017). Il a été montré qu'il inhibe la biosynthèse de cellulose de plantules *Arabidopsis thaliana*

âgées de 5 jours cultivées à l'obscurité. L'Indaziflam ne provoque pas de disparition des FP-CESA de la membrane plasmique comme l'Isoxabène ou le Quinoxiphène. D'ailleurs les mutants résistants à ces CBI ne sont pas résistants à l'Indaziflam. Par contre, il cause une accumulation des FP-CESA au niveau de la membrane plasmique mais contrairement au DCB, les zones d'accumulation de FP-CESA se situent aussi bien au niveau de régions riches en CMT que celles ne présentant pas de CMT (Chad Brabham et al., 2014 ; Seth DeBolt et al., 2007). Après un traitement au DCB, la plupart des FP-CESA sont immobiles (34 nm/min) alors qu'en présence d'Indaziflam, la vélocité des CESA est seulement ralentie (119 nm/min), suggérant pour l'Indaziflam un mode d'action différent de celui du DCB. Comme l'Indaziflam provoque comme la Morline une diminution du co-alignement entre FP-CESA et les CMT (Chad Brabham et al., 2014). Ainsi cette molécule se positionne entre la deuxième et troisième catégorie de CBI.

Deux autres CBI de la famille des triazole-carboximide sont difficilement classable : le Flupoxam, et le Triazofenamamide, utilisés comme herbicides (Tableau 1). Le Flupoxam a été commercialisé et il inhibe la croissance des racines de cresson (*Lepidium sativum*). Il a à la base été identifié comme inhibiteur du processus de mitose (O'Keeffe et al., 1991) mais Hoffman et Vaughn (1996) réfutent cet effet sur la racine du cresson. Les plantules d'*Arabidopsis thaliana* traitées au Flupoxam présentent des spectres d'absorption obtenus en FTIR très similaires à ceux obtenus à partir de plantules traitées au DCB, à l'Isoxabène et de mutants déficients en cellulose (Robert et al., 2004). Le Flupoxam induit aussi un élargissement des fibres de coton et induit fréquemment des divisions cellulaires. La perturbation de la synthèse de la cellulose entraîne une modification des pectines (Vaughn, Turley, 2001). Le Triazofenamamide quant à lui a une structure très proche du Flupoxam et a tout d'abord été considéré comme un inhibiteur de la polymérisation des CMT (O'Keeffe et al., 1991) mais les travaux de Hoffman et Vaughn (1996) n'ont pas du tout confirmé cette hypothèse. Heim et al. (1998) ont montré que le Triazofenamamide est un CBI car il inhibe l'incorporation de ^{14}C -glucose dans la cellulose exactement comme le fait d'autres CBI.

Enfin une thiazolidinone appelée Compound 1 inhibe rapidement l'incorporation de ^3H -glucose dans la fraction pariétale insoluble à l'acide de racines de dicotylédones (Sharples et al., 1998). Son mode d'action est inconnu mais il a été montré que le mutant *cesa3^{bxr1-1}* résistant à l'Isoxabène est aussi résistant au Compound 1 (Sharples et al., 1998). Le manque d'études sur ce CBI ne permet de le classer dans un groupe de CBI.

1.4.2.3. CBI étudiés

Au cours de ma thèse, j'ai étudié plus en détail plusieurs des CBI présentés ci-dessus. Leurs structures sont très variées même s'ils ont tous des cycles aromatiques avec parfois des groupements cétone, phényle, benzyle, nitrile, amine, amide, halogénure ou encore sulfure. Si ces groupes fonctionnels sont certainement nécessaires pour l'activité des CBI, il est difficile de faire un lien entre leur structure et leur classification.

1.4.2.3.1. Isoxabène

L'Isoxabène est sans aucun doute le CBI le plus étudié depuis les années 80s (Huggenberger et al., 1982). Les mutations de deux loci avaient été identifiées comme conférant une résistance à l'Isoxabène, ISOXABEN RESISTANT 1 et 2 (*IXR1* et *IXR2*) (Heim et al., 1989 ; Scheible et al., 2001). Depuis, les mutations ont été caractérisées au niveau des gènes *CESA3* et *CESA6* (Scheible et al., 2001 ; T Desprez et al., 2002). Plusieurs mutations dans les différents domaines de *CESA3* et *CESA6* confèrent cette résistance et il a été montré qu'elle ne résulte pas d'une différence d'absorption ou d'accumulation du CBI dans les plantes mais plus d'une limitation de son action (Heim et al., 1991). L'Isoxabène inhibe l'incorporation de ^{14}C dans la cellulose pariétale, perturbe la synthèse de callose et de xyloglucanes dans la plaque cellulaire et favorise la déméthylstérification des HG (R P Sabba, Vaughn, 1999). Il affecte également la croissance de cultures cellulaires de différentes espèces (M-F. Corio-Costet et al., 1991 ; Manfield et al., 2004). Des analyses transcriptomiques de cellules cultivées en présence d'Isoxabène montrent une inhibition de l'expression de *CESA1*, *CESA3* et *CESA6* ainsi que des changements dans la régulation de protéines structurales de la paroi et d'enzymes liées aux pectines (Manfield et al., 2004). Sur plante entière, cela a également été montré pour *CESA3* mais le plus intéressant est l'activation de gènes de réponse au stress, associés à l'acide jasmonique et aux ROS en deux phases de réponses (Cano-Delgado et al., 2003 ; Denness et al., 2011). Denness et al. (2011) ont observé l'augmentation de la quantité de ROS et une plus forte expression de ces gènes de stress dans la première heure après l'ajout d'Isoxabène. Plusieurs heures plus tard, la quantité d'acide jasmonique augmente, une nouvelle surexpression plus intense de ces gènes est observée et une lignification ectopique des racines apparaît. Ces réponses ne sont plus observables si des inhibiteurs de Ca^{2+} ou de la production de ROS sont utilisés : ces signaux semblent nécessaires à la réponse de la plante à l'Isoxabène. On retrouve ici des réponses similaires à celles caractérisées suite aux stress constitutifs induits par des *cesa* mutations.

1.4.2.3.2. DCB

Le 2,6-dichlorobenzonitrile ou DCB est étudié depuis les années 60 pour ses propriétés d'herbicide (Koopman, Daams, 1960 ; Barnsley, Rosher, 1961). S'il immobilise le CSC à la membrane plasmique chez de nombreuses espèces de végétaux supérieurs, il semble avoir un effet différent sur les organismes possédant un complexe de CESA linéaire et non en rosette. Ainsi, le DCB entraîne la diminution des CESA à la membrane plasmique pour l'algue rouge *Erythrocladia subintegra* et l'algue filamenteuse *Vaucheria hamata* (Mizuta, Brown, 1992 ; Orologas et al., 2005). L'organisation des CESA à la membrane plasmique semble donc influencer l'impact du DCB. Il a été montré que le DCB inhibe l'incorporation de ^{14}C -glucose dans le polymère de cellulose (Hogetsu et al., 1974 ; Montezinos, Delmer, 1980 ; Hoson, Masuda, 1992). En plus de la diminution de la quantité de cellulose, il a été montré que le DCB affecte la plaque cellulaire en réduisant la quantité de xyloglucanes mais contrairement à l'Isoxabène, un enrichissement en

callose y a été observé (Vaughn et al., 1996 ; Robert P. Sabba, Vaughn, 1999). Dans les cultures cellulaires, le DCB perturbe la quantité et la cristallinité de la cellulose et enrichit les parois en HG et RG-I (Encina et al., 2002 ; García-Angulo et al., 2006). En ce qui concerne le mode d'action du DCB, il a été montré que des composés analogues au DCB pouvaient se lier *in vitro* avec des petites protéines de 12 à 18 kDa chez différentes espèces (Delmer et al., 1987). Rajangam et al. (2008) ont mis en évidence l'interaction du DCB avec une protéine s'associant aux microtubules, MAP20, fortement exprimée dans les tissus secondaires. Ainsi le mode d'action du DCB pourrait aussi avoir un lien avec les CMT, certaines études discutant d'un impact du CBI sur l'organisation de ces CMT (Bisgrove, Kropf, 2001 ; Himmelspach et al., 2003). Un mutant légèrement résistant au DCB a été isolé en même temps que les mutants Isoxabène par Heim et al. (1989). Le mutant est nommé DH75 et les mécanismes de résistance sont inconnus bien que Sabba et Vaughn (1999) proposent que le mode d'action de l'herbicide soit perturbé dans ce mutant.

1.4.2.3.3. C17

Un nouveau CBI, le C17, a été publié récemment et entraîne comme l'Isoxabène le retrait du CSC de la membrane plasmique (Hu et al., 2016). Il en résulte une diminution de la quantité de cellulose dans la paroi et une perte d'anisotropie pour les cellules d'une manière dose-dépendante. Des mutants *cesa1* et *cesa3* sont moins sensibles au C17, indiquant un lien entre le CSC et le mode d'action du CBI. Il est intéressant de noter que ces mutations sont toutes proches des domaines transmembranaires. De façon plus surprenante, en perturbant l'activité mitochondriale et plus précisément le cytochrome c, une certaine tolérance au C17 et à l'Isoxabène a été observée. Hu et al. (2016) ont pu mettre en évidence que les mutations conférant une tolérance au C17 et appelées *cwm1* et *cwm2* (cell wall maintain) se situent au niveau de gènes codant pour des protéines PPR-like (pentatricopeptide repeat protein). Cette tolérance dépend du facteur de transcription ANAC017 activé seulement lors d'un dysfonctionnement mitochondrial. Si le mode d'action du C17 n'est pas clairement identifié, ces travaux ont permis de mettre en évidence le lien entre la mitochondrie et les réponses aux stress pariétaux.

1.4.2.3.4. CGA

Le CGA 325'615 (CGA) est une molécule ayant été brevetée pour ces propriétés d'herbicides (Stoller et al., 1996). Il cause l'internalisation du CSC dans les MASC comme les CBI du premier groupe (classification Debolt et al.) (E. F. Crowell et al., 2009). Une réduction de l'incorporation du ¹⁴C-glucose a été observée suite à des traitements au CGA de plusieurs espèces et ces traitements réduisent la cristallinité de la cellulose (Peng et al., 2001 ; García-Angulo et al., 2012). Sur des cultures cellulaires de *Phaseolus vulgaris*, cette réduction d'incorporation de glucose dans la cellulose est corrélée à une augmentation de ¹⁴C dans les extraits correspondants aux hémicelluloses et pectines (García-Angulo et al., 2012). L'intégrité du CSC sous forme de rosette semble être affectée par le CGA de la même manière que dans certains fonds mutants *cesa1* (Tony

Arioli et al., 1998 ; Peng et al., 2001). Kurek et al. (2002) ont observé que l'ajout de H₂O₂ perturbe les effets du CGA. Ils en ont déduit que le CGA altère le CSC en empêchant l'oxydation des domaines à doigt de zinc des CESA, pressentie comme nécessaire à la formation des CSC. De façon surprenante, aucun mutant *cesa* n'a montré à ce jour de résistance au CGA.

1.4.2.3.5. Thaxtomine A

La Thaxtomine A fait partie d'un groupe de phytotoxines naturellement produites par les bactéries du genre *Streptomyces spp* et est responsable de symptômes analogues à ceux observés pour d'autres CBI (King et al., 2001). L'expansion cellulaire des plantes traitées avec de la Thaxtomine A est perturbée, des défauts du cycle cellulaire ont été observés et l'incorporation de ¹⁴C-glucose dans la cellulose est réduite (Fry, Loria, 2002 ; Scheible et al., 2003). La Thaxtomine A entraîne l'internalisation du CSC de la membrane plasmique et des traitements longs engendrent comme l'Isosabène l'inhibition de l'expression de gènes *CESA*, la stimulation de gènes de la voie de signalisation de l'acide jasmonique ainsi qu'une lignification ectopique mais cette fois au niveau de l'hypocotyle (Volker Bischoff et al., 2009). Aucun mutant *cesa* n'a été identifié comme résistant à la Thaxtomine A mais un mutant *thaxtomin A resistant 1 (txr1)* a été identifié. Le gène *TXR1* code pour une protéine mitochondriale aussi appelée PAM16 jouant un rôle dans la réponse immunitaire et empêche la surproduction de ROS en cas de stress. Ceci apporte plus de poids à l'existence du lien entre la mitochondrie et les réponses aux stress pariétaux. En outre, il a été montré très récemment que des traitements à la Thaxtomine A entraînent une résistance à certaines infections bactériennes ou d'oomycètes (Joglekar et al., 2018). Ces résistances sont liées au fait que la Thaxtomine A stimule l'accumulation de PAD4 pour former des complexes PAD4-EDS1 impliqués dans l'immunité d'*Arabidopsis thaliana*.

DAMP	Receptor	Ectodomain	Signalling hallmarks	Reference
Peptides				
PEP1	PEPR1/2	LRR	Ca ²⁺ , MAPK3, MAPK6, ET, NO, ROS	Krol <i>et al.</i> (2010), Bartels, <i>et al.</i> (2013)
RALF1, RALF23	FER	Malectin	RAC/ROP GTPases, Ca ²⁺ , ROS	Engelsdorf and Hamann (2014), Haruta <i>et al.</i> (2014), Stegmann <i>et al.</i> (2017)
Carbohydrates				
Pectins				
	PERK4	Proline-rich	Ca ²⁺	Bai <i>et al.</i> (2009a,b)
	WAK2	EGF-like repeat	MAPK3	Kohorn <i>et al.</i> (2009)
OGs DP10-16 (α -1,4-GalA)	WAK1	EGF-like repeat	Ca ²⁺ , ROS, MAPK3, MAPK6, ANPs	Wagner and Kohorn (2001), Kohorn <i>et al.</i> (2009), Brutus <i>et al.</i> (2010)
Laminarioligos DP>6 (β -1,3 glucans)	CERK1	Lysin motif	Ca ²⁺ , MAPK3, MAPK6	Mélida <i>et al.</i> (2018)
Laminarin (β -1,3-1,6 glucans)	nd	nd	SA	Menard <i>et al.</i> (2004); Boutrot and Zipfel (2017)
OGs DP3 (α -1,4-GalA)	nd	nd	MAPK3, MAPK6	Davidsson <i>et al.</i> (2017)
Cellulose	nd	nd	Ca ²⁺ , MAPK3, MAPK6	de Azevedo Sousa <i>et al.</i> , 2017

Tableau 3. Ligands et récepteurs connus et impliqués dans la perception de DAMP chez *Arabidopsis thaliana*

Le domaine extracellulaire (ECD) des récepteurs et les éléments de signalisation qui découlent de leur activation sont indiqués. Abréviations : GalA = galacturonic acid, nd = not determined, OGs = oligogalacturonides, LRR = leucine-rich repeat, EGF = epidermal growth factor, MAPK = mitogen-activated protein kinase, ET = ethylene, ROS = reactive oxygen species et SA = salicylic acid. Issu de Bacete et al. (2018)

1.5. Le contrôle de l'intégrité pariétale

La paroi végétale est une structure dynamique qui est modifiée en fonction du développement de la plante et de son environnement. La paroi est donc porteuse d'informations concernant les conditions environnementales. Les cellules sont capables de détecter ces informations c'est-à-dire ces modifications pariétales ce qui implique l'existence de mécanismes de perception et de contrôle de l'intégrité pariétale. La perception de la matrice extracellulaire est beaucoup plus documentée pour les animaux (Vogel et al., 2009 ; Kamkin, Kiseleva, 2011) et les levures (Kock et al., 2015 ; Levin, 2011) avec la mise en évidence de nombreux récepteurs et de signaux perçus. Au cours de cette décennie, beaucoup de travaux mettent également en avant l'existence chez les plantes d'une signalisation liée à la perception de l'intégrité pariétale. Cette perception interviendrait lors du développement de la plante ou lors de stress abiotiques et biotiques (Sebastian Wolf et al., 2012 ; T Hamann, 2015 ; Voxeur, Höfte, 2016 ; Bacete et al., 2018). Les différentes étapes de la signalisation de l'intégrité pariétale sont les suivantes : (1) un stimulus correspondant à une perturbation pariétale, (2) la perception qui reconnaît le stimulus souvent via des récepteurs et (3) une réponse engendrée par la transduction du signal et se traduit entre autres par des modifications de la structure et/ou de la composition pariétale.

1.5.1. Signalisation lors d'une perturbation pariétale

1.5.1.1. Stimuli

La cellule doit être capable de détecter des changements au niveau de tous les polysaccharides de la paroi ce qui implique l'existence de différents systèmes de perception. Il est encore difficile de savoir quel est le premier signal détecté par la cellule. Le scénario le plus probable et accepté par la communauté scientifique est que l'un des facteurs clés serait le changement de l'interaction entre la membrane plasmique et la paroi en lien avec la pression de turgescence à l'intérieur de la cellule. La membrane plasmique serait alors plus ou moins étirée lorsque la paroi est altérée. Ces modifications de propriétés mécaniques provoqueraient également un changement entre les interactions récepteurs/polysaccharides ou récepteurs/récepteurs. En effet de nombreux récepteurs localisés vont pouvoir interagir avec différents ligands (T Hamann, 2015). La nature de ces ligands est variée et souvent mal identifiée (Tableau 3). On peut y retrouver les polysaccharides eux-mêmes avec des motifs reconnus par les récepteurs possédant des domaines de liaison aux sucres, des métabolites ou encore de petits peptides sécrétés dans la paroi (T Hamann, 2015 ; Bacete et al., 2018).

Les stimuli issus de la paroi peuvent aussi être des fragments de polysaccharides (S Wolf, Hématy, et al., 2012 ; Voxeur, Höfte, 2016). Lors d'un stress biotique, ces oligosaccharides issus de la dégradation de la paroi peuvent constituer des DAMPs – damage-associated molecular patterns– qui sont perçus par la plante et déclenchent des réponses de défense (Savatin et al., 2014). Il est connu depuis longtemps que des oligogalacturonides (OG) issus de pectines dégradées par les pathogènes peuvent jouer ce rôle (Ayers et al., 1976 ; Nothnagel et al., 1983 ; Osorio et al., 2008). De plus, il a

été montré que ces OG ont un rôle dans la croissance en régulant la voie de signalisation auxinique (Branca et al., 1988 ; Bellincampi et al., 1996). Par ailleurs certains OG constituent des signaux pour que la plante déclenche la skotomorphogenèse (croissance des organes à l'obscurité) (Sinclair et al., 2017). L'état de méthyléstérification des pectines influence aussi l'activité des OG (Osorio et al., 2008). D'autres types de fragments pectiniques ainsi que des fragments de xyloglucanes ont été identifiés comme éliciteurs (York et al., 1984 ; Larskaya, Gorshkova, 2015). Plus récemment Souza et al. (2017) ont montré que des oligosaccharides issus de la cellulose, des cellobioses, pouvaient aussi être perçus par *Arabidopsis thaliana* comme des DAMP et entraîner certaines réponses de stress.

1.5.1.2. Transduction du signal

Lorsqu'un stimulus a été perçu, un signal va être généré et traduit pour être amplifié et propagé. Concrètement, les récepteurs s'activent et créent un signal qui peut être de plusieurs natures (Tableau 3). Il a été montré par exemple lors de perturbations de la synthèse de cellulose que des signaux calciques et la formation de ROS sont rapidement induits (Tsang et al., 2011 ; Denness et al., 2011). Il est d'ailleurs remarquable que le Ca^{2+} régule les NADP-oxydases sources de ROS, les pompes et les canaux à protons lors de la croissance du tube pollinique et des poils racinaires (Wolf et al., 2012) : des oscillations des concentrations en Ca^{2+} , ROS et du pH sont observés. La perception des OG par certains récepteurs entraîne également rapidement des flux de Ca^{2+} , une production de H_2O_2 mais aussi d'oxyde nitrique (NO) via l'activation de NO synthases (Jeandroz et al., 2013 ; Manzoor et al., 2013). Tous ces signaux peuvent se réguler les uns avec les autres : les perceptions des stimuli vont donc déclencher l'activation de ces voies primaires de signalisation. De cette façon, le signal va pouvoir être amplifié et intégré d'autant plus facilement.

Un groupe de récepteurs de la paroi beaucoup étudié est celui des récepteurs kinases (RLK) qui constituent une très large famille avec au moins 1000 protéines chez *Arabidopsis thaliana* et chez le riz (Shiu, Bleecker, 2001 ; Tor et al., 2009 ; Wolf, 2017). Les RLK contiennent en général un domaine extracellulaire (ECD) pour lier le ligand, un domaine transmembranaire et un domaine kinase cytoplasmique. Ce domaine kinase peut alors activer ou désactiver d'autres protéines en modifiant leur état de phosphorylation. Les protéines kinases de type MAPK (mitogen-activated protein kinase) sont bien connues pour traduire les signaux extérieurs via des phosphorylations en cascade. Chez les plantes, elles sont impliquées dans la réponse aux stress mais aussi dans le développement (Kumar et al., 2013 ; Moustafa et al., 2014). Chez *Arabidopsis thaliana*, une centaine de ces protéines a été identifiée et localisée surtout dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau, à la membrane plasmique et dans différents organites comme les mitochondries (Ichimura et al., 2002 ; Komis et al., 2018). De nombreuses études sur le contrôle de l'intégrité pariétale ont identifié des MAPKs comme éléments nécessaires à la transduction du signal (Liang, Zhou, 2018 ; Bacete et

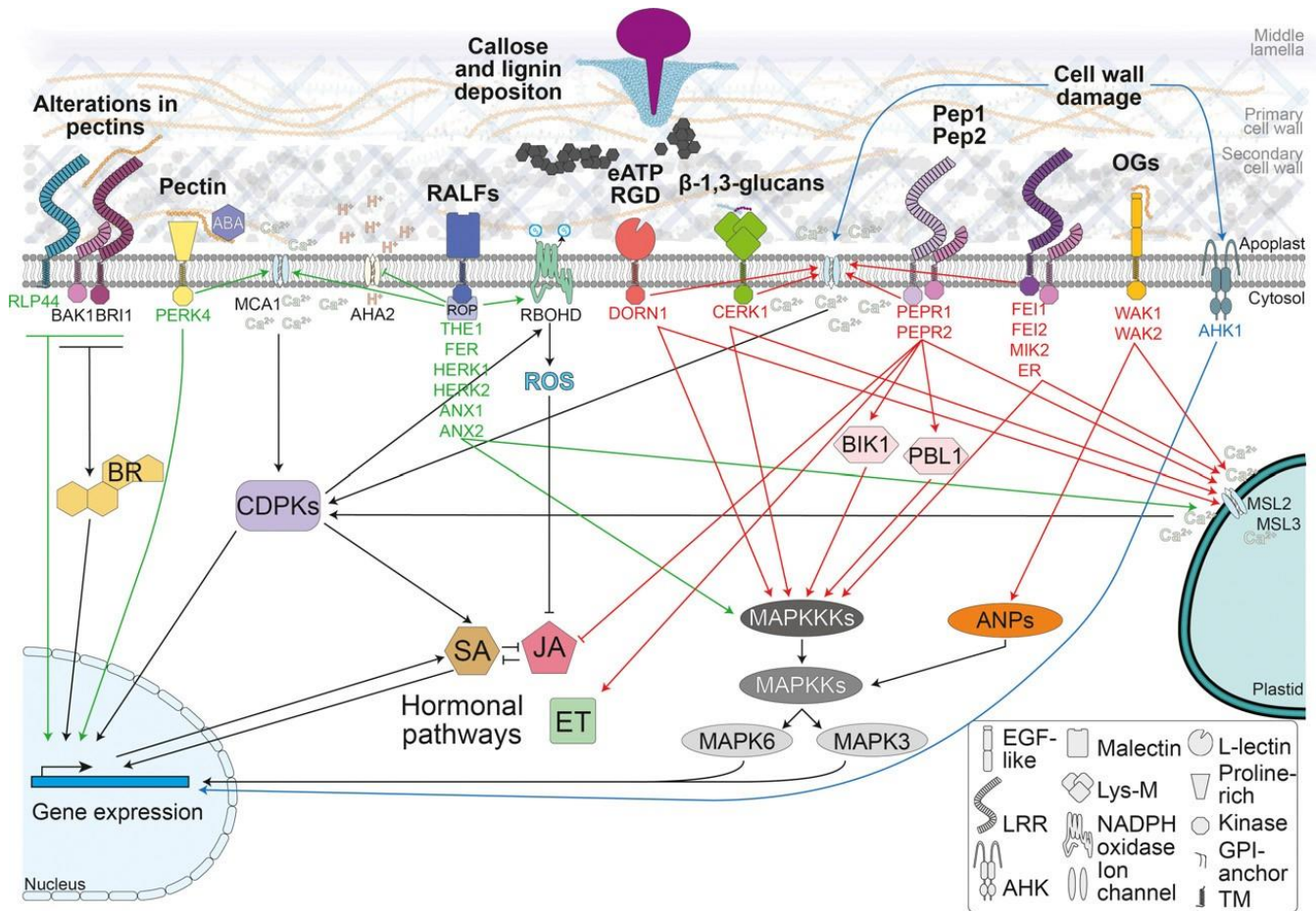


Figure 31. Les systèmes de perception de la paroi impliquent l'activation de nombreuses voies de signalisation

Les récepteurs percevant différents ligands au niveau de la paroi peuvent activer des cascades de phosphorylations et des voies de signalisation hormonales pour entraîner l'expression de gènes de réponses ou des flux ioniques. Abréviations pour les voies de signalisation : BR = brassinostéroïdes, CDPKs = Ca²⁺-dépendant protein kinase, ROS = reactive oxygen species, SA = salicylic acid, JA = jasmonic acid, ET = ethylene, BIK1 = botrytis-induced kinase 1, PBL1 = PBS1-like 1, MAPK = mitogen-activated protein kinase, ANP = arabidopsis NPK1-related protein kinase. Issu de Bacete et al. (2018)

al., 2018) (Tableau 3). Il existe aussi des protéines kinases dont l'activité est Ca²⁺ dépendante.

Une transduction du signal plus tardive est en générale mis en place avec l'activation de voies de signalisation hormonales (Thorsten Hamann, 2015) (Figure 31). Comme décrit précédemment, une perturbation de la biosynthèse de la cellulose provoque la synthèse d'acide jasmonique (Denness et al., 2011). Une synthèse accrue d'un précurseur de l'éthylène, l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) a également été mise en évidence (Tsang et al., 2011). Il a été montré que l'activation de certains récepteurs de la paroi entraîne la production d'acide salicylique, une des hormones caractéristiques des stress biotiques (Ferrari et al., 2013 ; Savatin et al., 2014). Certains mutants déficients en cellulose produisent constitutivement plus d'acide abscissique (ABA) (Hernandez-Blanco et al., 2007), hormone souvent associée aux stress abiotiques. Les voies de signalisation de l'ABA et des BR peuvent interagir lors de la croissance et en cas de stress (Clouse, 2016). Les BR favorisent la croissance et des récepteurs de la paroi y sont associés (Lozano-Durán, Zipfel, 2015 ; Kinoshita et al., 2005 ; Wang et al., 2016). Finalement, beaucoup de voies hormonales sont sollicitées pour la transduction du signal lors de la perception de l'intégrité de la paroi et le fait qu'elles peuvent interagir entre elles rend l'étude des processus de signalisation très complexe (Munné-Bosch, Müller, 2013 ; He, 2016).

1.5.2. Différents types de récepteurs de la paroi

Les récepteurs chez les plantes qui sont localisés à la surface des cellules et qui reconnaissent des éliciteurs apoplastiques sont appelés PRR pour pattern recognition receptors alors que les récepteurs intracellulaires sont appelés NLR pour nucleotide-binding-site-leucine-rich repeat receptor (Boutrot, Zipfel, 2017). Les PRR reconnaissent aussi bien des DAMP que des PAMP (Pathogen associated molecular pattern). Ils sont constitués des RLK localisés au niveau de la membrane plasmique et de récepteurs-like protéines (RLP). Les RLP n'ont pas de domaine de signalisation particulier contrairement au domaine kinase des RLK. De nombreuses études mettent en évidence que les PRR ont un rôle prépondérant pour percevoir la paroi en conditions de stress mais aussi lors de la croissance.

Ces récepteurs PRR sont très nombreux et présentent des structures plus ou moins complexes (Figure 31). En ce qui concerne la perception des polysaccharides, plusieurs familles de récepteurs sont suspectées comme les LysM-PRR (PRR à motif de lysine) qui sont impliqués dans la perception des peptidoglycanes bactériens. On trouve aussi des familles de récepteurs avec des domaines EGF (Epidermal Growth Factor) tels que les récepteurs WAK1 capables de détecter des pectines ou les lectines-like récepteurs qui détectent les lipopolysaccharides bactériens (Brutus et al., 2010 ; S Wolf, Hématy, et al., 2012 ; Zipfel, 2014). Pour ce qui est de la perception directe des polysaccharides par les autres PRR, cela n'a pas encore été montré. Dans ce manuscrit, les principaux groupes de RLK seront abordés et seule la famille des *Catharanthus roseus* RLK1-like kinases

(CrRLK1L) sera détaillée car au cours de ma thèse j'ai participé à la caractérisation de la fonction d'un de ces récepteurs.

1.5.2.1. Histidine kinases

L'un des premiers signaux supposés captés par la cellule est la variation de pression de turgescence. Les informations concernant les protéines qui sont capables de percevoir ces changements proviennent surtout d'études d'expression de protéines en système hétérologue et des tests de complémentation fonctionnelle dans la levure (Engelsdorf, Hamann, 2014). L'expression de différentes histidine kinases (AHK) d'*Arabidopsis thaliana* permet de restaurer le phénotype sauvage de mutants de levure affectés dans la perception des changements de pression de turgescence (Urao et al., 1999 ; Engelsdorf, Hamann, 2014). La protéine AHK1 est localisée au niveau de la membrane plasmique chez *Arabidopsis thaliana* ce qui suggère que AHK1 pourrait être un récepteur qui détecte les changements de pression de turgescence (Tran et al., 2007 ; Engelsdorf, Hamann, 2014). Des mutants *akh1* présentent d'ailleurs des réponses similaires à celles observées pour les mutants de levure quand la pression de turgescence est changée (Hamann et al., 2009 ; Wormit et al., 2012). Par contre les protéines AHK2 et AHK3 sont présentes au niveau de la membrane du RE et semblent réguler négativement les réponses aux stress (Engelsdorf, Hamann, 2014). Enfin il a été démontré que la protéine AHK4/Cytokinin receptor 1 (CRE1) fonctionne effectivement comme un récepteur de cytokinine et régule les réponses aux stress (Yamada et al., 2001 ; Caesar et al., 2011).

1.5.2.2. Canaux ioniques

Des canaux ioniques localisés à la membrane plasmique sont des mécanorécepteurs (Hamant, Haswell, 2017) : ils peuvent percevoir des perturbations mécaniques à travers la distorsion de la membrane. Celle-ci déclenche l'ouverture des canaux : des flux de Ca^{2+} ou Cl^- sont alors observés. Chez *Arabidopsis thaliana*, les canaux MID1 Complementing Activity 1 et 2 (MCA1 et MCA2) ont beaucoup été étudiés (Yamanaka et al., 2010 ; Engelsdorf, Hamann, 2014 ; Mori et al., 2018). Localisés à la membrane plasmique, MCA1 et MCA2 induisent un influx de Ca^{2+} dans la membrane après un stimulus mécanique ou un changement de pression osmotique (Monshausen, Haswell, 2013 ; Haswell, Verslues, 2015). Denness et al. (2011) ont montré que les réponses induites par l'isoxabène (accumulation de JA et de ROS) étaient fortement réduites dans le mutant *mca1*. Les modifications des propriétés mécaniques de la paroi pourraient influencer la membrane plasmique qui y est accolée, activant les canaux ioniques. Une autre famille de canaux, les Mechanosensitive channel of Small conductance-Like (MSL) sont également de bons candidats pour la mécano-perception en cas de perturbation pariétale (Kurusu et al., 2013 ; Wolf, 2017). Chez *Arabidopsis thaliana*, les MSL sont localisés au niveau des plastides et sont impliqués dans la régulation des influx de Ca^{2+} . Il a d'ailleurs été montré que MSL8 est nécessaire pour la germination du pollen et la croissance du tube polinique (Hamilton et al., 2015).

1.5.2.3. Kinases associées à la paroi (WAK)

Parmi les récepteurs kinases, le premier groupe à avoir été identifié est celui des WAK (Wall-associated kinases) qui comprend 22 membres (He et al., 1996 ; Verica et al., 2002). Ces récepteurs possèdent des domaines de type EGF dont certains peuvent se lier au Ca^{2+} . Il a été démontré que WAK1 et WAK2 peuvent se lier via leur domaine N-terminal (en dehors des EGFs) aux HG méthylestérifiés et jouent un rôle dans l'expansion cellulaire (Kohorn et al., 2009 ; Decreux, Messiaen, 2005). La liaison des WAK aux pectines s'expliquerait par les charges négatives des pectates interagissant avec des acides aminés hydrophobes des récepteurs (Decreux et al., 2006). Les OG sont aussi perçus par les WAK lors d'attaques pathogènes par exemple (Brutus et al., 2010 ; Ferrari et al., 2013 ; Kohorn et al., 2016). La surexpression de WAK1 stimule en effet les réponses de défenses suite à l'ajout d'éliciteurs, à une blessure ou à l'infection de *Botrytis cinerea* (Gramegna et al., 2016).

1.5.2.4. Leucine-Rich Repeat receptor-like kinase (LRR-RLK)

Les récepteurs kinases qui possèdent un domaine extracellulaire riche en leucine (LRR) sont appelées les LRR-RLK pour Leucine-Rich Repeat receptor-like kinases (Torii, 2004 ; Smakowska-Luzan et al., 2018). Ils constituent la plus grande famille de récepteurs kinases. Différents types de ligands ont été identifiés pour les LRR-RLK : polysaccharides, hormones ou petits peptides. Certains de ces récepteurs ont été beaucoup étudiés comme le récepteur Brassinosteroid-Intensitive 1 (BRI1), le récepteur Flagellin Sensing 2 (FLS2) et le Plant Elicitor Peptide Receptor 1/2 (PEPR1/2) (Belkhadir et al., 2014 ; Boutrot, Zipfel, 2017).

Il a aussi été montré que le LRR-RLK Brassinosteroid-intensitive 1 (BRI1) peut percevoir l'état de méthylestérification des pectines et activer la voie de signalisation des BR, modifiant alors l'expression de gènes impliqués dans la mise en place de la paroi (S Wolf, Mravec, et al., 2012). Lors de stress biotiques, des traitements d'Isoxabène ou d'OG, un précurseur du peptide Pep1 est sécrété dans la paroi (Engelsdorf et al., 2017 ; Huffaker et al., 2006 ; Gravino et al., 2017). Ce peptide est perçu par les LRR-RLK PEPR1 et PEPR2 (Bartels, Boller, 2015). Cette interaction est nécessaire pour activer les réponses immunitaires de la plante, appelée PTI (Pattern Triggered Immunity). Il faut noter que si PEPR1 et PEPR2 ne sont pas fonctionnelles comme dans les cas des doubles mutants *pepr1pepr2*, les réponses immunitaires de base comme la présence de phytohormones, la lignification ou le dépôt de callose sont malgré tout activées. Ceci suggère qu'il y a un système de rétrocontrôle de la plante qui lui permet de mettre en place une défense de base afin de prévenir l'absence de PTI et d'expression de gènes de défense (Engelsdorf et al., 2017 ; Gravino et al., 2017). Un autre groupe de LRR-RLKs impliqués dans la perception de la paroi sont les FEIs. En synergie avec la protéine pariétale SOS5 possédant un ancrage GPI dans la membrane plasmique, FEI1 et FEI2 permettent le maintien de la biosynthèse de la cellulose et la croissance anisotrope en conditions de stress salin ou de forte

concentration en saccharose dans le milieu de culture (Xu et al., 2008 ; Harpaz-Saad et al., 2011). En effet, le double mutant *fei1fei2* montre un phénotype similaire au mutant *cesa6^{prc1-1}* ou aux plantules traitées avec de l'Isoxabène. Il a été montré que le phénotype *fei1fei2* pouvait être atténué en perturbant la voie de signalisation auxinique, démontrant un lien entre l'hormone et les perturbations pariétales perçus par FEI (Steinwand et al., 2014 ; Wolf, 2017).

1.5.2.5. *Catharanthus roseus* receptor-like kinase1-like (Cr RLK1L)

Ce groupe de récepteurs kinases est nommé d'après son premier membre qui a été identifié chez la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) (Schulze-Muth et al., 1996) et fait l'objet de nombreuses études ces dernières années pour son rôle dans le contrôle de l'intégrité pariétale (Hématy, Höfte, 2008 ; Boisson-Dernier et al., 2011 ; Cheung, Wu, 2011 ; Wolf, Hofte, 2014 ; Franck et al., 2018a).

1.5.2.5.1. Famille multigénique

Les CrRLK1L sont représentés dans de nombreuses espèces, permettant de percevoir l'environnement extracellulaire des algues jusqu'aux plantes supérieures (Galindo-Trigo et al., 2016). Pour *Arabidopsis thaliana*, 17 membres sont identifiés et exprimés dans tous les organes et à différents stades de développement (Lindner et al., 2012). Ces récepteurs ont un peptide signal, un domaine ECD variable d'environ 400 acides aminés, une région proche de la membrane plasmique qui permet de réaliser des interactions avec certains co-récepteurs, un domaine transmembranaire et un domaine serine/thréonine kinase cytoplasmique. Ce dernier domaine est à l'inverse des ECD très conservé même si la région C-terminale l'est un peu moins et n'a pas de fonction connue. Certains récepteurs sont nécessaires pour l'élongation et l'élaboration d'axes de croissance pour le développement végétatif tandis que d'autres semblent plus spécialisés par exemple dans la germination et la progression du tube pollinique. En plus de ces rôles dans le développement, de nombreuses études ont démontré la nécessité de certains CrRLK1L dans la réponses aux stress, qu'ils soient de nature biotique ou abiotique (Lindner et al., 2012 ; Engelsdorf et al., 2018 ; Bacete et al., 2018 ; Wolf, 2017).

Le récepteur THESEUS1 (THE1) a été identifié comme suppresseur du mutant *cesa6^{prc1-1}* (Hématy et al., 2007). En effet les mutations *the1* permettent de restaurer partiellement le phénotype sauvage de plusieurs mutants *cesa* : le nanisme des plantules étiolées et la lignification ectopique sont moins marqués même si la déficience en cellulose est toujours présente. Cela démontre qu'un manque de cellulose n'est pas un facteur limitant pour la croissance d'une plante et que THE1 est donc un acteur qui limite la croissance en cas de dommages pariétaux. Ainsi, la surexpression du récepteur THE1 aggrave les réponses engendrées par les mutations *cesa*. Par ailleurs le mutant *the1* ne présente pas de phénotype particulier. Denness et al. (2011) ont montré que THE1 avait un rôle similaire lors de traitements à l'Isoxabène : la production de ROS et la lignification ectopique sont moins importantes dans le mutant *the1* traité. Tous ces résultats indiquent que THE1 perçoit les stress pariétaux et active certaines réponses à ces stress. Plus récemment, il a aussi été montré que des traitements alcalinisant la paroi

et inhibant ainsi la croissance racinaire sont également dépendants de THE1 (M Gonneau et al., 2018) (voir partie 1.5.2.5.2). Dans ces conditions, l'activation du récepteur engendre un influx rapide de Ca^{2+} dans le cytoplasme, l'alcalinisation de la paroi et l'activation de facteurs de transcription. THE1 orchestrerait donc à la fois la croissance et la réponse aux stress.

Le CrRLK1L le plus étudié jusqu'à aujourd'hui est FERONIA (FER) qui à l'origine a été identifié pour des problèmes de fertilité (Rotman et al., 2003 ; Huck, 2003). En effet, FER est localisé dans les deux cellules synergides du gamétophyte femelle et permet de guider le tube pollinique (Escobar-Restrepo et al., 2007). Les mutants *fer* ont des défauts de croissance au niveau des poils absorbants et montrent de manière générale des phénotypes de croissance perturbée (Qiaohong Duan et al., 2010 ; Boisson-Dernier et al., 2011 ; Cheung, Wu, 2011). Ces phénotypes variés peuvent s'expliquer par l'intervention de FER dans de nombreuses voies de signalisation : celles de l'éthylène (Mao et al., 2015), l'ABA (Chen et al., 2016), l'auxine (Qiaohong Duan et al., 2010) ou les BR (Deslauriers, Larsen, 2010). En plus de son rôle lors de la croissance, FER est impliqué dans la mécano-perception (Shih et al., 2014 ; Hamant, Haswell, 2017). Lors d'une contrainte mécanique, les cellules de l'épiderme de racine produisent deux pics successifs d'influx de Ca^{2+} or dans un mutant *fer*, le deuxième pic n'est plus présent. La racine du mutant *fer* perçoit mal les stimulations mécaniques et pénètre difficilement dans le milieu de culture. Il faut noter que la composition pariétale de ce mutant est altérée ce qui peut aussi modifier ses réponses aux contraintes mécaniques (Yeats et al., 2016). Enfin, FER est impliqué dans la réponse aux stress pathogène et salin (Martin Stegmann et al., 2017 ; Liao et al., 2017 ; Feng et al., 2018). FER serait donc au centre de nombreux processus physiologiques impliquant le contrôle de l'intégrité de la paroi.

Les deux CrRLK1L exprimés dans le pollen, ANXUR1 et ANXUR2 (ANX1, 2), ont des séquences proches de celle de FER (Boisson-Dernier et al., 2009 ; Miyazaki et al., 2009) Les mutants *anx1* et *anx2* présentent des problèmes de fertilité et une rupture précoce du tube pollinique (ne pouvant alors pas déposer les spermatozoïdes au niveau du gamétophyte femelle). La surexpression des ANX inhibe la croissance du tube pollinique, une paroi épaisse et riche en pectines s'accumulant (Boisson-Dernier et al., 2013). De façon similaire à THE1 et FER, ANX1 et ANX2 entraînent la formation de ROS via les NADPH oxydases exprimés dans le pollen. Ce sont ces niveaux de ROS exogènes qui causeraient ou non la rupture du tube pollinique (Boisson-Dernier et al., 2013). Enfin, il a montré que l'export d'ANX1 du réticulum endoplasmique nécessite sa glycosylation et qu'elle dépend d'une uridine-diphosphate-glycosyltransférase appelée TURAN (Lindner et al., 2015).

Les récepteurs HERCULES Receptor Kinase 1 et 2 (HERK1 et HERK2) sont exprimés dans les tissus végétatifs et contribuent à l'expansion cellulaire (Guo et al., 2009). La perte de fonction d'un orthologue de HERK2 chez le riz, OsCrRLK1L15, entraîne une tolérance au stress salin (Udomchalothorn et al., 2014). Guo et al. (2009) ont montré que HERK1 et THE1 jouent un rôle dans la croissance régulée par les BR mais que ces deux

récepteurs sont redondants pour cette fonction : seul le double mutant *herk1 the1* a un phénotype nain si la voie de biosynthèse des BR est perturbée. Un autre CrRLK1L moins étudié est CURVY1 (CVY1) qui joue un rôle dans la morphogénèse et la reproduction (Gachomo et al., 2014). Le mutant *cvy1* présente en effet des trichomes déformés et des cellules épidermiques de forme anormale à cause de filaments d'actine désorganisés. De plus *cvy1* a une floraison précoce, croît plus vite et produit plus de siliques que le sauvage. Enfin, un dernier groupe de CrRLK1L a été récemment étudié pour sa perception de la paroi lors de la croissance du tube pollinique : les récepteurs BUDDHA'S PAPER SEAL 1 et 2 (BUPS1, 2) (Ge et al., 2017 ; Zhu et al., 2018). Les mutants *bups1* et *bups1 bups2* ont des problèmes de fertilité avec une rupture précoce du tube pollinique (aggravé pour le double mutant), de façon similaire aux mutants *anx* (Ge et al., 2017),

1.5.2.5.2. Ligands des CrRLK1L

Les CrRLK1L étant des récepteurs kinases, ils sont composés d'un domaine Sérine/Thréonine-kinase cytoplasmique leur permettant d'engendrer un signal, une zone transmembranaire qui les ancre dans la membrane plasmique et un domaine extracellulaire (ECD) leur permettant de se lier à leur ligand. Il a été montré que l'ECD est variable selon les CrRLK1L et nécessaire pour leur activité : les domaines intracellulaires de FER, ANX1 et HERK sont interchangeable mais pas leur ECD (Kessler et al., 2014). On retrouve néanmoins au niveau des ECD des CrRLK1L, des structures similaires aux domaines malectines des animaux et bactéries (Franck et al., 2018b). Ces domaines sont connus pour se lier à des disaccharides (Schallus et al., 2008) et c'est pourquoi les domaines malectine-like des CrRLK1L sont pressentis pour se lier aux polysaccharides pariétaux. Des travaux récents ont permis de résoudre la structure 3D des ECD de ANX1 et ANX2 (Du et al., 2018 ; Moussu et al., 2018). Les deux domaines malectines y sont regroupés, séparés l'un de l'autre à 84° pour former une cavité large de 30 Å, permettant peut-être d'accueillir le ligand. Les acides aminés responsables de la liaison des disaccharides aux domaines malectines des protéines animales ne sont cependant pas conservés dans la séquence des CrRLK1L, indiquant des différences dans le mode de liaison (Moussu et al., 2018).

Bien que les sites de liaison aux polysaccharides n'ont pas encore été démontrés, l'observation des marqueurs GFP-THE1 et FER-YFP en condition de plasmolyse montre qu'ils restent étroitement liés à la paroi (Hématy et al., 2007 ; Lin et al., 2018). La nature de l'association entre ces CrRLK1L et les polysaccharides n'est pas connue mais l'expression hétérologue des ECD de FER, ANX1 et BUPS1 a permis de montrer *in vitro* une liaison avec des pectines, déméthylestérifiées dans le cas de FER (Feng et al., 2018 ; Lin et al., 2018). *In vivo*, la voie de signalisation induite par FER semble moins sollicitée si la quantité de pectines déméthylestérifiées dans la paroi est réduite (Lin et al., 2018).

Certains CrRLK1L sont capables de percevoir de petits peptides alcalinisant la paroi appelés RALF (Rapid Alkalinisation Factors). Ces derniers sont sécrétés dans la paroi sous une forme immature et des protéases de type Subtilisine permettent de cliver leur

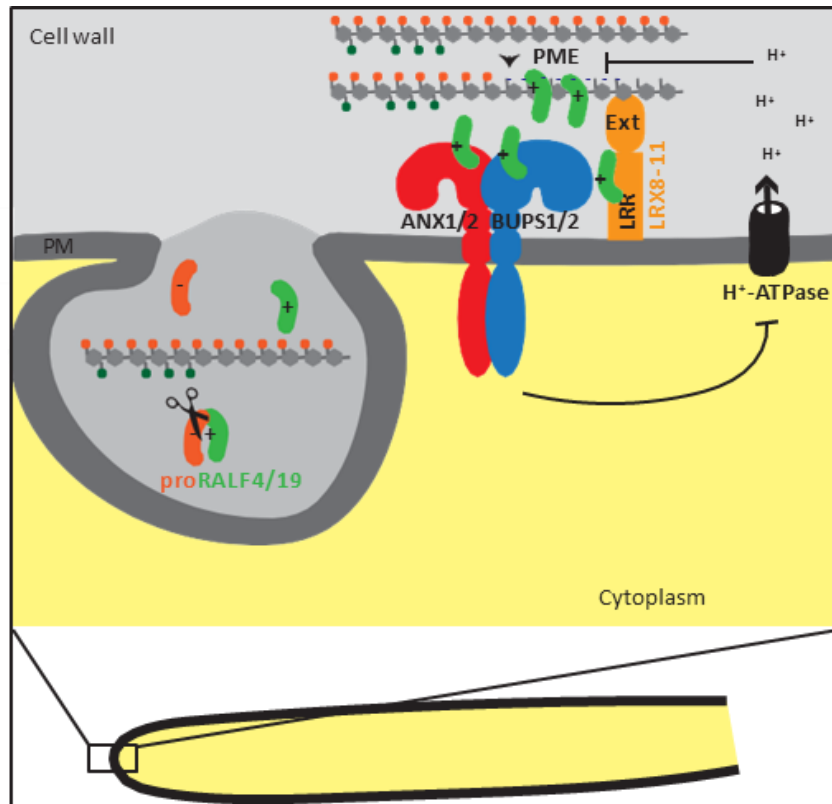


Figure 32. Modèle illustrant le rôle des récepteurs ANX et BUPS pour la perception de l'intégrité pariétale lors de la croissance du tube pollinique

Les peptides RALF4 et RALF19 matures libérés dans l'apoplaste du tube pollinique sont chargés positivement. Les pectines déméthylestérifiées par les PME pourraient alors séquestrer les RALF qui seraient alors moins disponibles pour activer le complexe de récepteurs ANX1/2 et BUPS1/2. Le manque d'activation des récepteurs inhiberait moins les pompes à protons, entraînant une acidification de la paroi. L'activité des PME serait alors inhibée et la croissance favorisée. La sécrétion de nouvelles pectines méthylestérifiées et de RALF activerait les récepteurs et l'alcalinisation de l'apoplaste. Les oscillations de pH et de croissance du tube pollinique pourraient s'expliquer ainsi. Issu de G. Doblas et al. (en cours de publication)

pro-domaine (Pearce et al., 2010 ; Srivastava et al., 2009) (Figure 32). On dénombre 36 membres dans la famille des RALF chez *Arabidopsis thaliana*. (Ge et al., 2017) ont montré que ANX1, ANX2, BUPS1 et BUPS2 sont capables de percevoir RALF4 et RALF19 (Figure 32). Le double mutant *ralf4 ralf19* montre le même phénotype de rupture prématurée du tube pollinique que *anx1 anx2* ou *bups1 bups2* indiquant que ces RALF sont nécessaires pour la fécondation. Les travaux de Martine Gonneau et al. (2018) auxquels j'ai participé (voir Annexe 2) ont montré que RALF34 se lie à THE1, influençant ainsi la croissance racinaire et la formation de racines latérales. Cependant le mutant *ralf34* n'est pas suffisant pour obtenir le même phénotype que *the1* ce qui laisse supposer que d'autres ligands (RALF ou autres ligands) interagissent avec THE1. En ce qui concerne FER, il est capable d'interagir avec RALF1 et RALF23 (Haruta et al., 2014 ; M Stegmann et al., 2017). Si tous ces récepteurs sont activés par des RALF, la question du contrôle de leur sécrétion dans la paroi se pose. De façon surprenante la même subtilisine peut libérer la forme active des RALF et des PME qui sont sécrétés via le système vésiculaire (Srivastava et al., 2009 ; M Stegmann et al., 2017 ; Wolf et al., 2009). La liaison des RALF aux CrRLK1L entraînerait l'alcalinisation nécessaire pour l'activité des PME. Comme décrit précédemment, l'activité des PME en déméthylestérifiant les HG provoquerait une réduction du pH apoplastique. Il faut noter que les charges négatives des pectates pourrait également s'associer aux RALF actifs qui sont chargés positivement (Figure 32). Il y aurait alors moins de RALF perçus par les récepteurs. Ces récepteurs inhiberaient moins les pompes à protons ce qui favoriserait une acidification de la paroi. L'acidification provoque le relâchement de la paroi mais peut aussi diminuer l'affinité des récepteurs aux RALF comme Gonneau et al. (2018) (voir Annexe) l'ont démontré pour RALF34 et THE1. En sécrétant de nouvelles pectines méthylestérifiées et des RALF, des cycles de croissance pourraient être observés. Enfin il est aussi intéressant de noter que le mutant *fer4* est résistant à *Fusarium oxysporum* sûrement à cause de son incapacité à détecter le peptide RALF-like sécrété par le pathogène (Masachis et al., 2016).

Les CrRLK1L influencent donc la rhéologie de la paroi notamment à travers la modulation du pH. Il a d'ailleurs été montré que l'activation de FER par RALF1 entraîne rapidement la phosphorylation de la pompe à protons AHA2, limitant l'acidification de la paroi (Haruta et al., 2014). En parallèle, il a été montré que RALF1 et RALF34 engendrent des influx importants de Ca²⁺ dans le cytoplasme (Haruta et al., 2014 ; M Gonneau et al., 2018). Des oscillations du Ca²⁺ cytoplasmique ont été observées lors de la croissance du tube pollinique et ce phénomène est perturbé dans le mutant *fer-4*, suggérant un rôle du récepteur et des RALF (Ngo et al., 2014). Les protéines Rho GTPase of plant (ROP) ancrées dans la membrane plasmique jouent un rôle important dans la signalisation (Nibau et al., 2006). FER et THE1 sont capables de se lier via leur domaine intracellulaire à des protéines Guanine Exchange Factor (GEF), elles-mêmes associées aux ROP et permettant leur activation (Qiaohong Duan et al., 2010 ; Qu et al., 2017) (Figure 33). Il a été montré que l'activation de FER est requise pour la production de ROS dans paroi au niveau de la racine via un système ROP-GEF qui

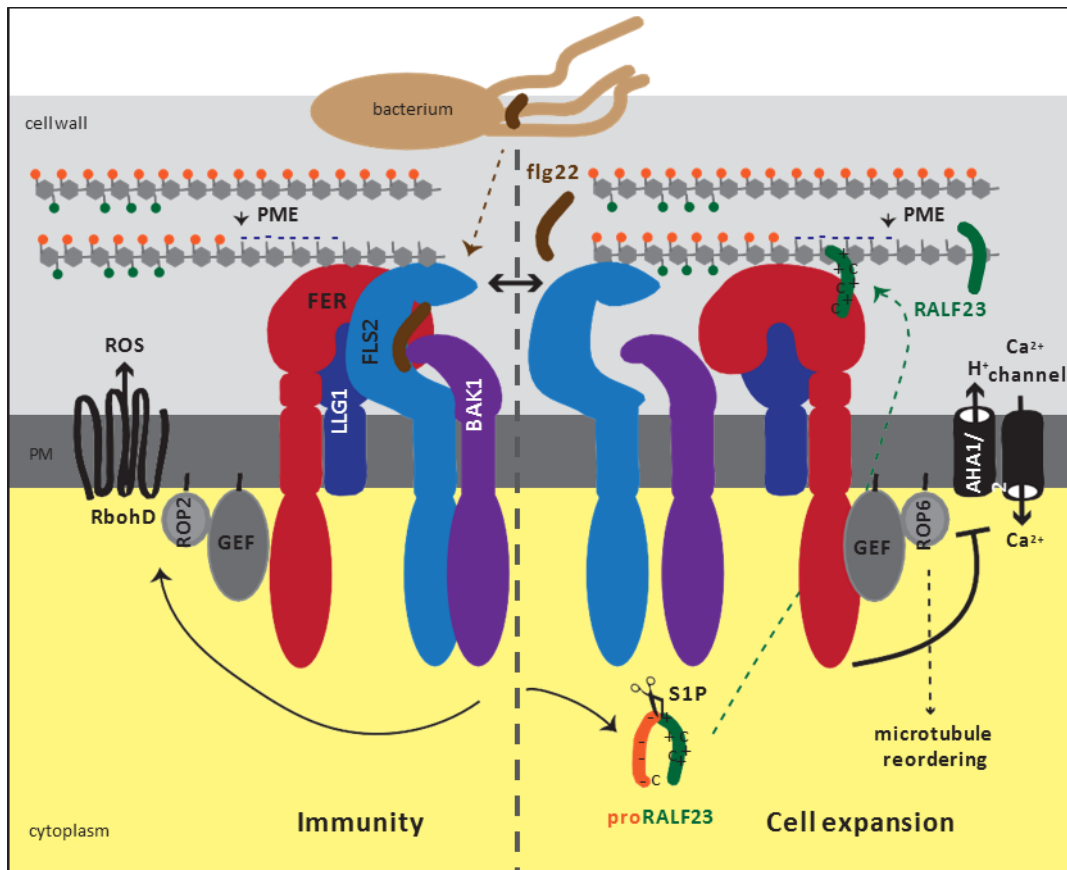


Figure 33. Modèle illustrant l'interaction de récepteurs pour moduler la réponse immunitaire et la croissance

(Gauche) L'association de FER et LLG1 sert de base à l'interaction entre les PAMP et leur PRR (FLS2) associé à BAK1. En présence de flagelline (Flg22), FLS2 s'associe avec BAK1. Le domaine cytoplasmique de FER se lie à une ROP-GEF ce qui va entraîner un échange de GDP en GTP au niveau de la protéine ROP2. ROP2-GTP se lie à l'oxydase RbohD. Cela active alors la production de ROS. Le clivage du propeptide de RALF23 est activé lorsqu'il y a l'association de FLS2-BAK1 en présence de Flg22. RALF23 va pouvoir se lier à FER-LLG1 ce qui entraîne alors le désassemblage de FLS2 et BAK1. Ceci constitue une boucle de régulation négative permettant de contrôler constamment la réponse immunitaire.

(Droite) La liaison de RALF23 au complexe FER-LLG1 entraîne des influx de Ca^{2+} , l'alcalinisation du pH et le réarrangement des CMT travers l'activation de la protéine Katanine, régulant ainsi la croissance. Issu de G. Doblas et al. (en cours de publication)

stimulerait les NADPH-oxidases membranaires (Q Duan et al., 2010). Enfin, les ROP influencent l'organisation des CMT en régulant l'activité d'enzymes qui causent leur rupture et favorisent leur réorientation (Lin et al., 2013). Cette réorientation des CMT étant un facteur crucial pour l'expansion cellulaire, les CrRLK1L en activant les ROP pourraient ainsi moduler la croissance.

1.5.3. Régulation de la perception de la paroi

1.5.3.1. Régulation de l'activité des récepteurs

Pour réguler finement les voies de signalisation induites par les récepteurs, l'activité de ceux-ci peut être régulée par d'autres protéines. Des inhibiteurs de l'activité kinase peuvent ainsi se lier de façon réversible au domaine kinase des récepteurs (Jaillais et al., 2011 ; Wang, Chory, 2006). La présence de pseudo-kinases au niveau des complexes de récepteurs peut aussi influencer leur activité (Gao et al., 2009 ; Halter et al., 2014). L'activité de phosphatases qui peut moduler les niveaux de phosphorylation de protéines elles-mêmes phosphorylées par les kinases (Wu et al., 2011 ; Segonzac et al., 2014 ; Chen et al., 2016). Des mécanismes d'endocytose et d'ubiquitinylation vont permettre d'acheminer les récepteurs à leur lieu de dégradation et modulent alors la quantité de récepteurs présents et/ou leur capacité à transmettre le signal perçu (Lu et al., 2011 ; Irani et al., 2012). Enfin, certaines modifications post-traductionnelles permettent aussi de réguler l'activité des récepteurs (Bender et al., 2015).

1.5.3.2. Interactions entre récepteurs

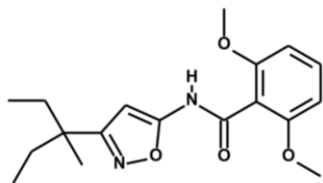
Il a été montré que les récepteurs de la paroi peuvent interagir entre eux pour activer certaines réponses. Les LRR-RLK interagissent souvent avec l'ECD d'un autre récepteur. Par exemple, pour que la cascade de signalisation soit activée après la liaison du ligand, les trois récepteurs BRI1, FLS2 et PEPR1/2 interagissent avec un autre récepteur LRR-RLK qui est BRI-associated kinase 1 (BAK1) (Santiago et al., 2013 ; Sun, Han, et al., 2013 ; Sun, Li, et al., 2013 ; Tang et al., 2015). Ce complexe de récepteurs va alors activer la voie des BR et participe à la réponse immunitaire : seule l'interaction entre FLS2 et BAK1 permet la perception de la flagelline 22 d'origine bactérienne. Un énorme travail vient d'être réalisé afin de tester 40000 interactions entre les différents ECD des LRR-RLK (Smakowska-Luzan et al., 2018). Les auteurs ont alors pu établir un réseau d'interactions (567 interactions) avec quatre sous-groupes. La taille des ECD est variable : ils peuvent comprendre plus de 12 répétitions LRR (long ECD) ou moins de 12 (petit ECD). Ils ont également pu montrer que les interactions entre ECD ne se font pas par hasard. Il y a quatre fois plus d'interactions entre ECD de petite taille et dix fois plus entre les longs ECD que les chiffres attendus. Il en est de même entre les interactions petit/long ECD. Les petits ECD ont plutôt un rôle de régulation des récepteurs tandis que les grands ont un rôle dans la perception (Smakowska-Luzan et al., 2018).

Les CrRLK1L aussi peuvent se retrouver au sein de complexes multi-protéiques. Ainsi, les récepteurs de type ANX et BUPS interagissent les uns avec les autres au niveau du tube pollinique (Ge et al., 2017) (Figure 33). Tous deux peuvent se lier à RALF4 et RALF19 et ce complexe de CrRLK1L est requis pour la croissance du tube pollinique. Le récepteur LRR-RLK appelé MIK2 pour Male Discoverer 1-interacting receptor like kinase 2 est aussi capable de détecter des défauts pariétaux (Van der Does et al., 2017). Il agit probablement sur la même voie de signalisation que THE1 de la famille des CrRLK1L. MIK2 est issu d'un crible visant à identifier des RLK insensibles à des inhibiteurs de synthèse de la cellulose. MIK2 est dépendant de THE1 pour contrôler la croissance racinaire et la tolérance aux stress salins ce qui laisse penser qu'ils pourraient interagir l'un avec l'autre. Cependant, il a été montré que THE1 n'est pas nécessaire pour la résistance à *Fusarium oxysporum* qui est dépendante de MIK2 (Van der Does et al., 2017).

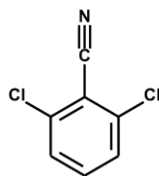
FER semble également pouvoir se lier avec d'autres récepteurs. Il peut notamment interagir avec des protéines AGP comme par exemple Lorelei-like AGP 1 (LLG1) (Li et al., 2015). LLG1 est présent dans les tissus végétatifs et est essentiel pour l'activité de FER : les mutants *llg1* présentent les mêmes phénotypes que les mutants *fer*. De plus dans le fond *llg1*, les protéines GFP-FER restent au niveau du RE, suggérant un rôle de protéine chaperone pour LLG1 (Li et al., 2015). Du et al. (2016) ont montré que FER peut interagir avec un récepteur kinase cytoplasmique, le RPM1-induced protein kinase (RIPK). En réponse à RALF1, FER peut phosphoryler RIPK qui a son tour phosphorylerait FER. Les mutants *fer4* et *ripk* ont le même phénotype racinaire et les deux récepteurs semblent nécessaires à la réponse aux traitements RALF1. Les travaux de Martine Gonneau et al. (2018) montrent que FER est nécessaire pour la signalisation de THE1 associé à RALF34. On peut alors se poser la question de l'interaction potentielle entre les deux récepteurs. Finalement FER qui est un récepteur très étudié semble être au centre de complexes de récepteurs et ses interactions avec ceux-ci permettraient de moduler son action. Il n'est pas exclu que de futurs travaux mettent en évidence que beaucoup de CrRLK1L peuvent à l'instar de FER s'associer ensemble ou avec d'autres types de récepteurs afin de contrôler plus finement le contrôle de l'intégrité de la paroi.

Pour finement ajuster la signalisation via ces récepteurs, il faut aussi garder en tête qu'ils sont majoritairement présents au niveau de nanodomains dans la membrane plasmique (Gronnier et al., 2017). Par exemple, les récepteurs BRI1 et FLS2 s'organisent en nanodomains distincts ce qui leur permettraient de transmettre des signaux différents (Bücherl et al., 2017). Il a aussi été montré que l'activation des récepteurs provoque un changement de la mobilité des nanodomains. Un traitement de quelques minutes avec de la flagelline 22 suffit à provoquer une réduction de la mobilité des nanodomains de FLS2 dans la membrane plasmique sans que le temps de demi-vie du nanodomaine soit affecté (Bücherl et al., 2017).

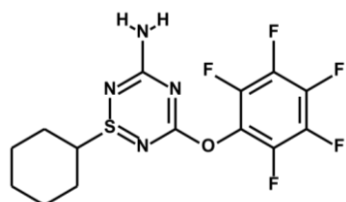
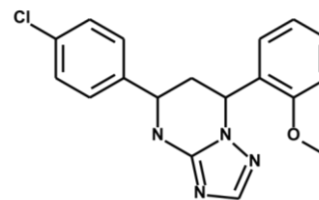
Isoxabène



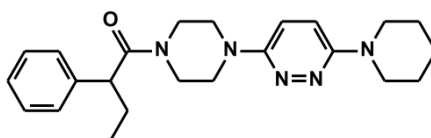
DCB



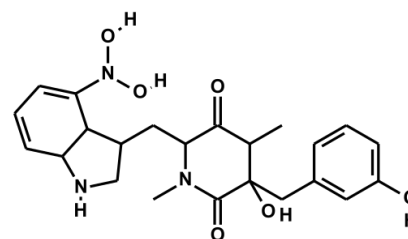
C17



CGA



Hypostuntine



Thaxtomine A

Figure 34. Formules chimiques des CBI étudiés lors de la thèse

Les formules topologiques des molécules étudiées sont représentées. On observe que ces structures sont très variées. On retrouve des cycles aromatiques et parfois des groupements cétone, phényle, benzyle, nitrile, amine, amide, halogénure ou encore soufre.

1.6. Objectifs de la thèse

La biosynthèse de la cellulose met en jeu de nombreux acteurs et est très finement régulée au cours du développement, lors de stress biotiques et abiotiques. Le remodelage continu de la paroi nécessite la présence d'un dépôt coordonné de tous les constituants pariétaux. A l'heure actuelle, il existe très peu de données sur les mécanismes qui régissent ce dépôt coordonné de la matrice pariétale. Pour mieux décortiquer ces mécanismes de régulation, nous avons décidé d'utiliser les CBI. En effet les CBI sont des outils très efficaces pour perturber l'intégrité de la paroi et l'étude de leur impact peut nous permettre de mieux comprendre comment se déroule le remodelage de la paroi en condition de stress. Ainsi, durant ma thèse, j'ai décidé de me concentrer sur l'étude de plusieurs CBI déjà connus (l'Isoxabène, le DCB, le C17, le CGA et la Thaxtomine A) et d'un nouveau CBI appelé l'Hypostuntine pour impacter la synthèse de cellulose. Les structures de ces CBI sont très différentes (Figure 34) et les travaux déjà menés sur ces molécules, récapitulés dans le chapitre 1.4, suggèrent des modes d'action différents.

La thèse vise donc à répondre à deux questions :

- **Est-ce que les CBI étudiés provoquent les mêmes types de perturbations pariétales ?**

Les approches utilisées pour analyser l'impact des CBI sur la synthèse de la paroi sont : (1) l'étude de la dynamique du CSC par microscopie confocale (2) l'analyse de la composition pariétale par spectroscopie, biochimie et immunohistochimie. De nombreux indices suggèrent que le CSC pourrait être une cible directe des CBI puisque des mutants *cesa* (mutant affecté dans la sous-unité catalytique de la cellulose synthase) présentent des résistances à certains de ces CBI. Des tests de résistance croisés aux CBI ont alors été réalisés sur différents mutants *cesa* et l'élaboration de nouvelles plantes transgéniques exprimant des CESA conférant des résistances à plusieurs CBI à la fois a été entreprise.

- **Quelles sont les voies de signalisation induites par ces CBI ?**

L'objectif est d'identifier des récepteurs capables de percevoir les modifications pariétales engendrées par les traitements CBI. La résistance de différents mutants affectés dans des récepteurs déjà caractérisés a été analysée. Ensuite, les réponses physiologiques associées à la perception des CBI a été entreprise en étudiant : (1) l'expression de gènes liés à la mise en place de la paroi et à différentes voies de signalisation (2) les modifications pariétales tardives causées par les CBI par histochimie.

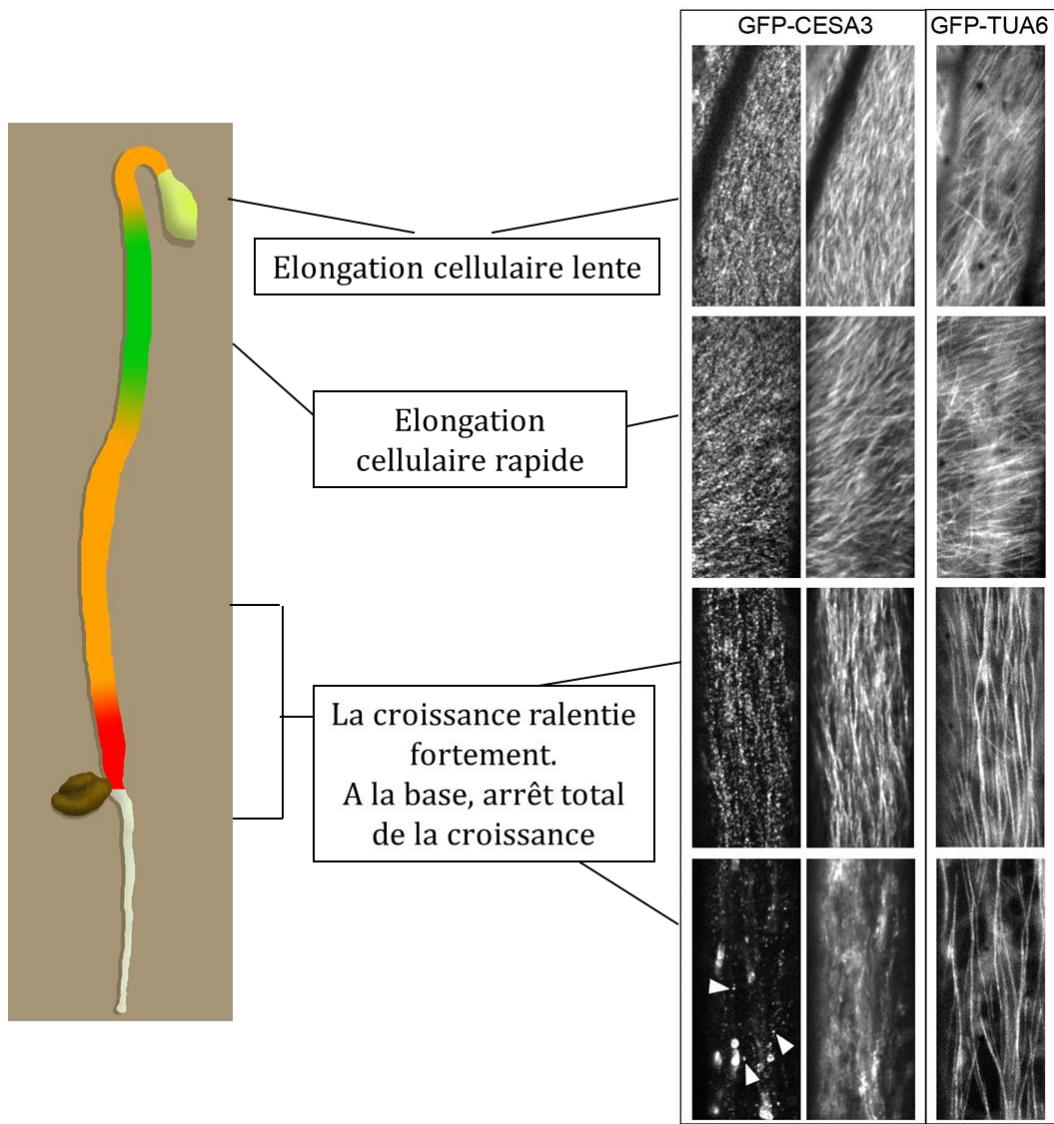


Figure 35. Orientation des trajectoires de CESA et des CMT le long de l'épiderme de l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana* cultivé à l'obscurité

Il existe un co-alignement entre les trajectoires de CESA (GFP-CESA3) et celles des CMT (GFP-TUA6) et lorsque les cellules s'allongent rapidement les trajectoires de CESA et de CMT sont transverses par rapport à l'axe de l'élongation. Par contre, dans les cellules qui cessent de s'allonger, les trajectoires de CESA et de CMT sont longitudinales. On peut aussi noter que dans ces dernières cellules, la densité des CESA et des CMT est beaucoup plus faible que celles observées dans les autres cellules. Adapté de Crowell et al. (2009). Barre d'échelle = 10 μ m.

2. RESULTATS

Pour répondre aux différents objectifs de ma thèse, j'ai décidé de me concentrer sur l'étude de six CBI synthétiques ou naturels qui présentent des structures très différentes et dont les effets décrits sur la physiologie des plantes diffèrent entre eux. Par ailleurs les modes d'actions de ces CBI ne sont pas connus. En prenant en compte les CBI disponibles au laboratoire ou qui font l'objet de collaborations avec d'autres équipes, on obtient alors la liste suivante :

- L'Isoxabène dont la quantité de données et de publications sur ses effets est considérable.
- Le DCB qui a aussi beaucoup été étudié mais classé dans un autre groupe de CBI que l'Isoxabène.
- Le C17, CBI isolé très récemment (en collaboration avec notre équipe) et classé dans le même groupe que l'Isoxabène. Il a permis de mettre en évidence un lien entre le fonctionnement de la mitochondrie et les réponses aux stress pariétaux.
- Le CGA qui a été classé avec l'Isoxabène mais dont aucun mutant résistant n'a été identifié.
- La Thaxtamine A qui est phytotoxine naturelle, classée aussi avec l'Isoxabène mais dont aucun mutant *cesa* résistant n'a été identifié.
- L'Hypostuntine qui est un nouveau perturbateur non publié encore à ce jour.

2.1. Caractérisation d'un nouvel inhibiteur de la biosynthèse de la cellulose (CBI) : l'Hypostuntine

2.1.1. Résumé

L'équipe de Yang Zhao à Shanghai a entrepris un crible phénotypique d'inhibition de croissance à l'aide de 12 000 molécules provenant de l'entreprise Life chemical incorporation, à Ontario, au Canada. Des plantules d'*Arabidopsis thaliana* ont ainsi été cultivées trois jours à l'obscurité en présence de ces diverses molécules et 256 molécules ont induit une réduction de 50 % de la taille des hypocotyles. Une de ces molécules est le 2-phenyl-1-(4-(6-(piperidin-1-yl)pyridazin-3-yl) piazin-1-1-yl)butan-1-one de formule chimique brute $C_{23}H_{31}N_5O$ et cette molécule a été appelée Hypostuntine (HS). Les travaux préliminaires avaient montré que dans les plantules traitées à l'HS, l'expression de gènes liés à la mise en place de la paroi était perturbée et un mutant résistant à l'HS a été isolé par cette équipe et nommé *cesa3^{hsr1}*. Ils ont caractérisé la mutation au niveau du gène *CESA3* et c'est pourquoi une collaboration a alors été établie avec notre équipe de façon à mieux comprendre l'impact de l'HS sur la biosynthèse des composés pariétaux. J'ai tout d'abord caractérisé l'effet de l'HS sur l'organisation des complexes de cellulose synthases au niveau de la membrane plasmique. J'ai pu montrer que l'Hypostuntine ne provoque pas de disparition des GFP-CESA3 de la membrane plasmique ni d'accumulation de GFP-CESA3 dans des

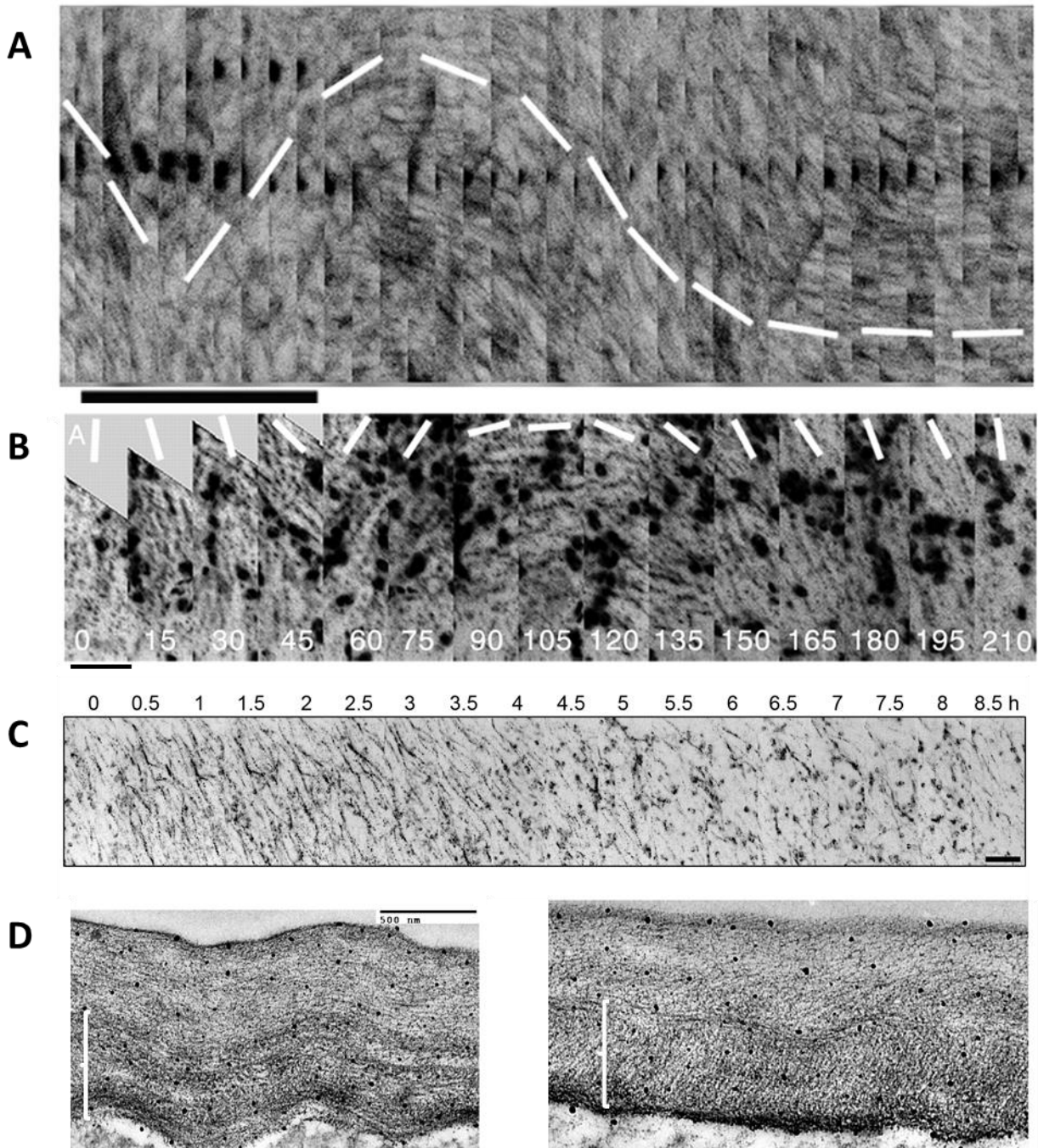


Figure 36. Rotations des CMT et des trajectoires de CESA sont nécessaires pour la formation de la paroi polyamellée

Observation de cellules de l'épiderme d'hypocotyles d'*Arabidopsis thaliana* cultivés 3 jours à la lumière. (A) Rotations des CMT. Montage de Z projections de GFP-TUA6. Barre d'échelle = 130 min. (B) Rotations des trajectoires de CESA. Montage d'images de GFP-CESA3. Barre d'échelle = 20 μm. (C) Arrêt des rotations des trajectoires de CESA après traitement des plantules avec 200 nM d'oryzaline (qui dépolymérise les CMT). Barre d'échelle = 15 μm. (D) Structure polyamellée de la paroi de plantules d'*Arabidopsis thaliana* en absence (à gauche) et en présence d'oryzaline (à droite). Dans ce dernier cas, la structure devient alors plus homogène. Adapté de Chan et al. (2010)

SmaCC/MASC comme cela a été montré pour les traitements à l'isoxabène ou au CGA (Crowell et al., 2009 ; Gutierrez et al., 2009). L'HS n'affecte pas la vitesse des GFP-CESA3 au niveau de la membrane plasmique puisque les vitesses obtenues après traitement (288±88 nm/min) sont comparables à celles obtenues pour les plantules traitées au DMSO (283±36 nm/min).

En utilisant des plantules qui co-expriment GFP-CESA3 et RFP-MBD (Microtubule Binding Domain – qui permet de visualiser les microtubules corticaux (CMT)), j'ai pu montrer que la plupart des trajectoires de GFP-CESA3 étaient encore co-localisées avec les CMT ce qui suggère que l'HS n'affecte pas le lien entre l'orientation des CESA et celle des CMT. Par contre les orientations des trajectoires de CESA et de CMT étaient en général plus obliques ou longitudinales par rapport à l'axe de l'élongation dans les cellules traitées avec de l'HS par rapport aux orientations des CESA et CMT observées dans des plantules contrôles qui sont plutôt transverses quand les cellules sont en train de s'allonger (Figure 35). Afin de vérifier la dynamique des complexes de cellulose synthase dans le mutant résistant à l'HS, la construction GFP-KOR1 qui fait partie des protéines nécessaires à la synthèse de cellulose et qui interagit avec le complexe cellulose synthase a été introduite dans le mutant *cesa3^{hsr1}*. Les vitesses de GFP-KOR1 dans ce mutant ne sont pas affectées en présence ou en absence d'HS. Ces résultats ont permis de montrer que la cible primaire de cette molécule n'est pas les complexes de cellulose synthase bien que les plantules traitées de trois jours à l'HS présentent une déficience en cellulose.

L'HS est aussi capable d'inhiber le taux d'élongation en une heure de plantules sauvages et de *cesa3^{hsr1}*. La croissance est par contre restaurée en trois heures chez *cesa3^{hsr1}* mais pas chez les plantules sauvages ce qui montre que l'HS n'affecte que transitoirement la croissance de *cesa3^{hsr1}*. Il a aussi été montré par Chan et al. qu'au cours de la croissance les CMT subissent des rotations qui expliquent la rotation des GFP-CESA et la formation de la paroi polylamellée (Figure 36) (Chan et al., 2007 ; 2010). Ces rotations ont donc été observées dans les plantules sauvages et *cesa3^{hsr1}*. Ces rotations sont affectées dans les plantules sauvages traitées à l'HS alors que dans *cesa3^{hsr1}*, le traitement n'affecte que partiellement la rotation des CMT et il est intéressant de noter que ces rotations sont surtout affectées au début du traitement tout comme le taux de croissance. Des études de la paroi en microscopie électronique ont été réalisées par l'équipe de Yang Zhao et ont permis de montrer que l'HS retarde l'assemblage des polysaccharides au cours de la phase de croissance lente (croissance isotrope) des cellules et empêche l'amincissement de la paroi au cours de la croissance anisotrope. Les parois semblent aussi moins extensibles.

2.1.2. Manuscrit en préparation qui sera soumis dans The Plant Cell

Remarque : la numérotation des pages et des figures de la thèse n'est pas appliquée au manuscrit de la publication pour le distinguer du reste de la thèse.

(Figures with legends are at the end of the draft)

Chemical perturbation of the coordination between cellulose synthesis and cell wall assembly

Deqiang Li^{1,2}, Julien Renou^{3,6}, Juan Lu¹, Baocai Zhang⁴, Emilie Gineau³, Yajin Ye^{1,2}, Jianmin Shi¹, Zuhua He¹, Samantha Vernhettes³, Herman Höfte^{3*}, Yang Zhao^{1,5*}

1 Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China

3 Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, Centre National pour la Recherche Scientifique, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, RD10, 78026, Versailles Cedex, France

4 State Key Laboratory of Plant Genomics and National Center for Plant Gene Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

5 Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, 650000 Yunnan, China.

6 Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France

*Corresponding author:

Email: yangzhaotoronto@sina.com or herman.hofte@inra.fr

Abstract (200 words):

A major question in plant biology is how the synthesis of cellulose is coordinated with the assembly and remodeling of the cell wall during cell expansion. Here we identify a new molecule, named hypostuntin (HS), which on first sight behaves like a Cellulose Biosynthesis Inhibitor (CBI): continuous treatment with HS inhibits cell elongation and cellulose accumulation, promotes callose deposition, ectopic lignification and changes in cell wall-related gene expression. In addition, three mutations in a catalytic subunit of the Cellulose Synthase Complex (CSC) provide increased tolerance to HS. Interestingly, in contrast to previously studied CBIs, which either cause CSC clearance from the PM, reduced velocity or aberrant trajectories of the CSCs, HS inhibits growth without detectable changes in CSC activity. This suggests that the CSC is not the primary target of HS and that the observed cellulose deficiency is part of a secondary response induced by the drug. Transmission electron microscopy on developing cell walls suggests that HS interferes with a process that coordinates cellulose synthesis with the assembly of an extensible wall. This study illustrates the complexity of the regulation of cell wall deposition and the difficulty to infer causality from genetic or chemical perturbation of the cell wall.

Main messages:

- 1. Hypostuntin (HS) inhibits cell elongation in Arabidopsis and rice**
- 2. HS triggers cell wall modifications and changes in gene expression similar to those induced by other cellulose biosynthesis inhibitors**
- 3. Mutations in CESA3 provide increased tolerance to HS in Arabidopsis**
- 4. HS does not affect GFP-CESA3 plasma membrane location, velocity nor its interaction with Cortical Microtubules.**
- 5. HS interferes with the coordination of cell wall assembly with cellulose synthesis**

INTRODUCTION

The cell wall of growing plant cells consists primarily of cellulose microfibrils and matrix polysaccharides. The former are synthesized by plasma membrane-embedded cellulose synthase complexes (CSC), whereas the latter are synthesized in Golgi bodies and delivered to the cell surface by secretory organelles (Albersheim et al., 2012; Lampugnani et al., 2018). A major challenge is to understand the processes that coordinate the delivery, assembly and remodeling of cell wall components of different subcellular origins during cell expansion (Wolf et al., 2012). Plants expressing GFP-tagged CSCs combined with spinning disc microscopy have been used to study the intracellular trafficking and motility in the plasma membrane of the CSCs (McFarlane et al., 2014). They follow linear trajectories along cortical microtubules (CMTs), propelled by the polymerization of the glucan chains that constitute the cellulose microfibrils. Stresses (osmotic stress, salt, microbial toxins) can put cellulose synthesis on hold by promoting the accumulation of CSCs in microtubule-associated compartments (MASCs, also referred to as Small Cellulose synthase Compartments, SmaCCs) (Crowell et al., 2009; Gutierrez et al., 2009; Endler et al., 2015). CSCs are hexameric complexes containing a multitude of components. These include three distinct catalytic subunits (CESA1, 3 and 6-like for the primary cell wall), presumably 3 per globule of the hexameric CSC (Nixon et al., 2016), the membrane bound cellulase KORRIGAN (KOR1) (Vain et al., 2014), CELLULOSE SYNTHASE INTERACTOR (CSI/POM2) (Bringmann et al., 2012; Gu et al., 2010), which links CSCs to microtubules and COMPANION OF CELLULOSE SYNTHASE (CC) proteins (Endler et al., 2015), which also bind to microtubules, promote microtubule dynamics and control the recycling of CSC to the plasma membrane after their salt stress-induced internalization. Other proteins are involved in the assembly of the CSC in the Golgi apparatus (STELLO) (Zhang et al., 2016), its delivery to the plasma membrane (PATROL1 and Exocyst complex) (Zhu et al., 2018) and the plasma membrane anchoring of the CMTs during cellulose synthesis (CELLULOSE SYNTHASE-MICROTUBULE UNCOUPLINGS (CMU)) (Liu et al., 2016). In addition, all CESAs and KOR are S-acylated (some 100 acylgroups per

CSC), which enhances the hydrophobicity of the complex thus generating specialized plasma membrane domains (Manoj et al., 2016). Finally, BRASSINOSTEROID INSENSITIVE (BRI2) negatively regulates cellulose synthesis through the phosphorylation of CESA1 (Sánchez-Rodríguez et al., 2017). Chemical genetics is a powerful approach to dissect the cell biology of cell wall assembly (Surpin et al., 2005). A multitude of small molecule cellulose biosynthesis inhibitors (CBIs) have been identified (Debolt and Brabham, 2013). The large variation in chemical composition suggests the existence of multiple targets for these molecules. Three main modes of action for CBIs have been identified so far (Debolt and Brabham, 2013): The clearance of the CSCs from the plasma membrane and their accumulation in MASCs/SmaCCs (observed for instance for isoxaben (Gutierrez et al., 2009), C17 (Hu et al., 2016), thaxtomin (Bischoff et al., 2009) and quinoxiphen (Brabham et al., 2014)); the immobilization of CSCs in the plasma membrane (observed for DCB (DeBolt et al., 2007b)) or the induction of aberrant CSC trajectories (morlin (DeBolt et al., 2007a) and cobtorin (Yoneda et al., 2010)). So far, no direct biochemical targets for CBIs have been identified, but the analysis of resistant mutants has shown the involvement of components of the CSC. For instance, mutations in CESA3 (Scheible et al., 2001) and CESA6 (Desprez et al., 2002) provide resistance against isoxaben; other mutations in CESA3 and CESA1 protect against C17 (Hu et al., 2016) and a mutation in CESA1 protects against quinoxiphen (Harris et al., 2012). Interestingly, the mutations in CESA3 do not provide cross-resistance to isoxaben and C17, suggesting different modes of action for these molecules. For cobtorin, the growth inhibition can be reversed by the overexpression of the pectin-modifying enzymes polygalacturonase or pectin methylesterase (Yoneda et al., 2010), suggesting that this molecule targets a process that coordinates cellulose synthesis with matrix deposition.

Here we describe a new molecule, called hypostuntin (HS), which, like CBIs, reduces growth anisotropy, promotes ectopic lignification and changes in the expression of cell wall related genes. In addition, three mutations in CESA3 cause an increased tolerance to the drug. Surprisingly however, HS does not affect the PM location or the motility of the CSCs, nor their interaction with the CMTs. Finally, TEM analysis of developing cell walls in the dark-grown hypocotyl suggests that HS interferes with the assembly of an extensible cell wall.

RESULTS

Hypostuntin (HS) inhibits cell elongation in *Arabidopsis thaliana* and rice

A screen of a library of 12,000 chemicals (Zhao et al., 2007) for growth inhibitory activity on 3-day-old dark-grown *Arabidopsis Columbia* (Col)-0 seedlings identified 236 chemicals that caused a reduction of hypocotyl length for at least 70%. One of these molecules, 2-phenyl-1-[4-(6-(piperidin-1-yl)pyridazin-3-yl) piperazin-1-yl]butan-1-one, C₂₃H₃₁N₅O (Figure 1A; Supplemental Figure S1), named hypostuntin (HS), was studied in more detail in this report. HS inhibited root growth with an IC₅₀ of 20 μM (Figure 1B and 1C; Supplemental Figure S2A and S2B). Structure-activity analysis of HS analogs revealed that both the piperidinyl and ethyl groups are critical for its growth inhibiting activity on dark-grown seedlings (Supplemental Figure S1). No difference in sensitivity for HS was observed for Col-0, Landsberg *erecta* (Ler) or Wassilevskija (WS) accessions (Supplemental Figure S2E). HS also inhibited root and coleoptile growth of rice seedlings with an IC₅₀ of around 50 μM (Supplemental Figure S3A and S3B). Finally, up to 100 μM HS had no growth effect on the bacterium *E.coli* in liquid culture (Supplemental Figure S4A) nor on the yeast *S. cerevisia* grown on solid media (Supplemental Figure S4B). HS caused reduced cell elongation and increased radial expansion as shown in both *Arabidopsis* hypocotyls (Figure 1D, Supplemental Figure S2C and S2D) and rice coleoptiles (Supplemental Figure S3C-E).

HS triggers cell wall modifications and changes expression of cell wall related genes

To investigate the mode of action of HS, we first compared the cell wall composition of 3-day-old dark-grown *Arabidopsis* grown in the continuous presence

or absence of 50 μ M HS. Cell wall preparations of HS-treated seedlings contained less cellulosic or non-cellulosic glucose and more arabinose and galactose relative to mock-treated controls (Figure 2A). These results suggest that in the presence of HS, arabinan and galactan side chains on pectin or arabinogalactan proteins were longer. In addition, HS promoted the accumulation of callose and ectopic lignin in WT seedlings (Figure 2B and 2C). We next used qRT-PCR to study the effects of HS on the expression of cell wall-related genes (Figure 2D-2F). Exposure of 3-day-old dark-grown Col-0 seedlings to HS caused a reduction in transcript levels of primary cell wall CESAs (CESA1, 3, 5 and 6), without significant effects of those encoding secondary cell wall CESAs (CESA7 and 8). In addition, among 50 cell wall-related genes, the transcripts of 10 and 11 genes were significantly downregulated (more than 2-fold) or upregulated (more than 3-fold) respectively. Among the genes that were down-regulated by HS, BGALs are involved in the trimming of galactan side chains (Sampedro et al., 2012) and GAUT1 and 3 play a role in homogalacturonan synthesis and modification (Caffall et al., 2009). Among the up-regulated genes, *XTH9*, *XTH18*, *XTH20*, *XTH23*, *XTH32* and *XTH33* belong to the *Xyloglucan endoTransglycosylase/Hydrolase (XTH)* gene family, most of which encode enzymes that promote xyloglucan-xyloglucan grafting (Rose et al., 2002). PME1 (Pectin MethylEsterase) and PAE (Pectin AcetylEsterase) de-methylesterify and de-acetylate the pectic polysaccharide homogalacturonan (Wolf et al., 2009), and the increased expression of at least one PME (PME5) was shown to promote wall elasticity and prevent the transition from isotropic to anisotropic cell expansion (Peaucelle et al., 2015). Kinetic analysis on eight of these genes showed that the transcriptional responses to HS occurred after a lag-time of at least 3 or 6 h (Supplemental Figure 5). In conclusion, HS-induced changes in cell wall composition and gene expression are reminiscent of those caused by CBIs.

Mutations in CESA3 provide increased tolerance to HS

To identify possible cellular targets of HS, we screened 100,000 ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenized Col-0 M2 seeds grown on 50 μ M HS and identified a mutant, named *hypostuntin resistant 1 (hsr1)*, which showed strong but incomplete

tolerance ($IC_{50} = 150 \mu\text{M}$) to the hypocotyl growth-inhibiting effect of HS (Figure 3A and B). HS tolerance of *hsr1* is semi-dominant and determined by a single locus as shown by the intermediate HS sensitivity ($IC_{50} = 40 \mu\text{M}$) of *hsr1* x Col-0 F1 seedlings and the 1:2:1 segregation ratio of the F2 (χ^2 test, P value = 0.325, n=1207). Using map-based cloning and DNA sequence analysis, we mapped the *hsr1* mutation to the *CESA3* locus (At5g05170) (Figure 3C) and showed that the mutation causes a L₈₈₃F replacement in the predicted fourth trans-membrane domain of the enzyme (Figure 3D). To confirm that this mutation in *CESA3* is causative for the mutant phenotype, we showed that two previously described isoxaben-resistant *CESA3* alleles, *cesa3^{ixr1-1}* and *cesa3^{ixr1-2}* (Scheible et al., 2001), also conferred reduced sensitivity to HS (Figure 3E and 3F) and that *cesa3^{ixr1-1}* and *cesa3^{hsr1}* did not complement each other when combined in F1 plants (Figure 3G). Finally, a *P_{CESA3}::CESA3* transgene restored HS sensitivity to the *cesa3^{hsr1}* mutant (Figure 3H). Together, the results indicate that these mutations in the *CESA3* locus are causative for the increased tolerance to the growth-inhibiting effects of HS.

HS does not affect the targeting of CSCs to the plasma membrane, nor their motility or their interaction with cortical microtubules.

The increased tolerance to HS caused by mutations in the *CESA3* gene suggested that the drug has a mode of action similar to that of the unrelated cellulose CBIs isoxaben or C17. Indeed, resistance against one or the other drug is also conferred by mutations in the *CESA3* gene (Hu et al., 2016) and, as shown above, isoxaben-resistant mutants *cesa3^{ixr1-1}* and *cesa3^{ixr1-2}* showed cross-tolerance to HS. Both isoxaben and C17 favor the rapid (within 1 h) depletion of CSCs from the plasma membrane and their accumulation into “MASCs/SmaCCs” (Crowell et al., 2009; Gutierrez et al., 2009). Unexpectedly however, a first hint for a different mode of action of HS relative to isoxaben came from the observation that *cesa3^{hsr1}* is not more resistant to isoxaben than the WT (Supplemental Figure 6) as well as the synergistic effects of low doses of HS on hypocotyl growth inhibition by isoxaben (Figure 3B, e.g. compare the growth inhibition by 1 nM isoxaben in presence and absence of 10 μM HS). In addition, the C17-tolerant mutants *cesa3^{2C}* and *cesa3^{6P}*

(Hu et al., 2016), did not show cross-tolerance to HS or isoxaben and the 3 HS-tolerant mutants were not more tolerant to C17 (Figure 3I), suggesting distinct modes of action for all three molecules.

We therefore studied the effect of HS on the localization and motility of the CSC using plants expressing GFP-tagged versions of the CSC components CESA3 or the cellulase KORRIGAN (KOR) (Desprez et al., 2007; Vain et al., 2014). Interestingly, whereas 5 h treatment with isoxaben (Gutierrez et al., 2009; Vain et al., 2014) or C17 (Hu et al., 2016) cleared the GFP-labeled punctae from the surface and promoted the formation of labeled MASCs/SmaCCs for either reporter line; HS did not cause CSC accumulation in intracellular punctae (Figure 4A and 4C). In addition, HS treatment did not affect the motility of the plasma membrane-associated particles (Mock: 283 ± 36 nm/min vs HS: 288 ± 88 nm/min (Figure 4B and 4D) as observed for instance upon treatment with the CBI DCB (DeBolt et al., 2007c). We finally also investigated the effect of HS on the interaction of CSCs and microtubules using a line expressing both GFP:CESA3 and the RFP-tagged Microtubule-Binding Domain, MBD. As observed previously (Paredes et al., 2006), the GFP:CESA3 punctae decorated the, mostly transversely-oriented, RFP:MBD-labeled microtubules. After 5 h (Figure 4E and 4F) or 24 h (Figure 4G and 4H) treatment with 100 μ M HS, the GFP-CESA3 punctae still co-localized with the RFP-MBD signal and both microtubules and GFP-CESA3 trajectories had adopted a more oblique or longitudinal orientation, which, as shown below, may be an indirect consequence of the inhibition of cell elongation by HS. To assess the effect of the *cesa3^{hsr1}* mutation on the CSC dynamics, we introduced the GFP:KOR1 reporter into the *cesa3^{hsr1}* background. Again, we did not observe a significant difference in the distribution and in particle velocity in *cesa3^{hsr1}* relative to the WT background both in the absence or presence of HS (Figure 4I and 4J). Together, these results suggest that CSCs are not direct targets of HS. This is surprising given the cellulose deficiency of seedlings continuously grown in the presence of HS and the HS tolerance conferred by mutations in *CESA3*. We therefore studied the cell wall composition of seedlings treated with HS for a shorter period (5 h), but significantly longer than the time required to see the first effects on growth (<1 h, see below). Interestingly, no significant differences in cellulose and neutral sugar content were observed in WT and *cesa3^{hsr1}* in the presence or absence of HS (data not shown), confirming that the previously observed cellulose deficiency

was a secondary effect of the HS treatment. To better distinguish primary from secondary effects we next analyzed the kinetics of HS responses.

HS inhibits hypocotyl elongation stably in WT and transiently in *cesa3^{hsr1}*

We first focused on the growth response to HS. Three-day-old dark-grown seedlings were transferred to a medium containing 50 μ M HS or DMSO and hypocotyl elongation rates were measured over time (Figure 5A,C). Mock-treated Col-0 hypocotyls elongated at a rate of 0.28 \pm 0.04 mm/h. In the presence of HS, however, the elongation rate had dropped to 0.18 \pm 0.05 mm/h within 1 h and further diminished to 0.09 \pm 0.03 mm/h over the 8 hr time period (Figure 5A). The initial growth inhibition by HS was therefore unlikely a consequence of the above-mentioned transcriptional responses (Supplemental Figure S5), which had a lag-time of at least 3 h. In mock-treated *cesa3^{hsr1}*, the elongation rate was initially slightly faster than Col-0 (0.38 \pm 0.07 mm/h) and dropped to 0.23 \pm 0.04 mm/h after 8h (Figure 5C). Interestingly, upon HS treatment, elongation growth rate had dropped to 0.24 \pm 0.05 mm/h within 1 h, however, in contrast to the WT, the growth rate recovered and joined that of the mock-treated mutant within 3 h. The transient elongation inhibition explains the reduced final hypocotyl length of the HS-treated relative to the mock-treated mutant (Figure 5D). Together, the results indicate that HS inhibits, within 1 h, cell elongation in both WT and *cesa3^{hsr1}* but that growth is recovered in *cesa3^{hsr1}* and not in the WT.

HS treatment indirectly inhibits cortical microtubule array rotation

The orientation of CMTs is highly dynamic. In growing cells, CMTs tend to align along intra-organ stress patterns through a, so far unknown, mechanosensing process (Mirabet et al., 2011). Since CMTs guide cellulose deposition, this automatically leads to the reinforcement of tissues along these stress patterns. As shown in Figure 4, CMTs adopted a more oblique to longitudinal orientation 5h after

HS treatment. To investigate whether this is a direct or indirect effect of HS, we studied the orientation of GFP-TUA6-tagged CMT arrays over a 24 h period after HS or mock treatment in WT and *cesa3^{hsr1}*. We distinguished the CMTs facing the outer epidermis wall from those facing the inner epidermis wall (hereafter referred to as «inner CMTs (iCMTs) » and « outer CMTs (oCMTs) » respectively). The orientation of the oCMTs is much more variable than that of the iCMTs, which mostly maintain a transverse orientation and which are required for maintaining normal growth anisotropy (Crowell et al., 2011). In mock-treated Col-0, the relative proportion of transverse and longitudinal oCMTs remained comparable during the 24 h of the experiment, whereas after HS treatment CMTs shifted from transverse to random, oblique and longitudinal already at 3 h to become primarily longitudinal at 24 h. The iCMTs maintained much longer their transverse orientation, and a relatively small proportion had shifted to a more oblique orientation at 24 h. In mock-treated *cesa3^{hsr1}*, CMT orientation was comparable to that of the WT, and HS only induced a small shift in orientation relative to the HS-treated WT. The change in orientation of the oCMTs in Col-0 already at 3 h might be an indirect effect of the rapid inhibition of elongation growth by HS. To investigate this in more detail, we characterized, at a shorter time scale, the rotary movement of oCMTs in the presence and absence of HS in Col-0 and *cesa3^{hsr1}*. This rotary movement is observed in growing hypocotyl cells and underlies the formation of a multi-lamellated cell wall (Chan et al., 2010, 2007). To study this, we used 2-day-old EB1b:GFP transgenic seedlings and collected time-lapse movies with z-stacks every 20 minutes for 6-8 h. In mock-treated WT hypocotyl cells, EB1b:GFP trajectories underwent clockwise or anticlockwise rotation (Figure 6I and 6J), and full 360° rotation within the 7 h time period was observed in over 88% of hypocotyl cells (n=36 cells in 3 hypocotyls) (Figure 6J). HS reduced this rotary movement, but unlike taxol, which completely immobilizes microtubules (Chan et al., 2007), HS only reduced the rotation speed of EB1b-GFP trajectories, which after 7 h finished full rotation in only 25% of the cells (n=64 cells in 4 hypocotyls) (Figure 6I and 6K). In mock-treated *cesa3^{hsr1}*, the rotation of the trajectories was not affected relative to the WT (86%, n=60 cells in 3 hypocotyls) (Figure 6I and 6L). HS treatment of the mutant only partially inhibited the rotary movement relative to the WT and the ratio of the cells in which EB1b-GFP trajectories underwent a full rotation was 75% (n=72 cells of 4 hypocotyls) (Figure 6I and 6M). Given the transient inhibition of the elongation rate by HS in the mutant, it is interesting to note that the rotation rate

during the first 120 min after HS treatment was slower than that during the subsequent time period (Figure 6I). This suggests that the effect of HS on the CMTs is an indirect effect of the inhibition of cell elongation and that HS does not target a pathway that regulates the CMT orientation. This was corroborated by studying the effect of HS on *katanin* (*ktn1*) and *ktn1/cesa3^{hsr1}* mutant seedlings (Supplemental Figure S7). In *ktn1*, CMTs have lost the ability to reorient, leading to a partial loss of cell growth anisotropy (Uyttewaal et al., 2012). HS further reduced hypocotyl elongation in *ktn1* and only slightly in *ktn1/cesa3^{hsr1}* confirming that HS targets a process different from that underlying katanin-dependent CMT re-orientation.

HS interferes with cell wall assembly and remodeling in the hypocotyl epidermis

Whereas in most cells wall deposition is coupled to cell growth, in young epidermis cells of the dark-grown hypocotyl, massive wall deposition takes place in the external wall during a slow isotropic growth phase (Refrégier et al., 2004; Derbyshire et al., 2007). This leads to the formation of an over 1 μm -thick multi-lamellated, but highly extensible cell wall, which during a rapid anisotropic growth phase undergoes significant thinning. In this context, we used transmission electron microscopy to investigate the impact of HS on wall deposition and remodeling in WT and *cesa3^{hsr1}* at three time points marking the transition between slow isotropic growth (42h-48h) and rapid anisotropic growth (48h-72h) (Pelletier et al., 2010). Over the time period studied, hypocotyl elongation growth was comparable in mock-treated Col-0 and *cesa3^{hsr1}*, including the timing of the transition from slow to rapid elongation (Supplemental Figure S8A-C). In the presence of HS, however, elongation growth was greatly reduced for Col-0, and slightly reduced for *cesa3^{hsr1}*. As shown previously (Refrégier et al., 2004), in mock-treated Col-0 seedlings, walls were thickest with a multi-lamellated architecture at 42 h and became substantially thinner at 72 h (Figure 7), while the outer surface of the cell wall became more undulated. This undulation may reflect a gradient in wall elasticity, where upon removal of the turgor pressure during the sample preparation, more elastic inner layers of the wall contract, causing the less elastic outer layers to buckle. The absence of buckling at

42 h suggests that, at this stage, all wall layers had a comparable elasticity. In the presence of HS, Col-0 seedlings showed a thinner wall, lacking the pronounced layered architecture of the mock control. Interestingly, in contrast to the mock control, the thickness of the walls of HS-treated cells increased between 42 h and 48 h, after which it decreased (72 h), but not as much as in the mock-treated control and with no or a small change in the degree of buckling. The results indicate that HS delays normal cell wall assembly during the slow isotropic cell growth phase and prevents the thinning of the cell wall that is normally associated with the rapid anisotropic growth phase. The reduced buckling suggest that HS prevents the differential stiffening of cell wall layers perhaps because the stiffness of the inner wall layers was already high from the onset. In mock-treated *cesa3^{hsr1}*, the cell wall was thinner relative to the WT at 42 h, indicating that the mutation either caused a reduced cell wall deposition rate and/or an increased cell expansion rate. Despite their reduced thickness, however, the walls maintained their growth capacity, as shown by the normal growth rate and the further thinning between 48 h and 72 h. HS treatment slightly reduced the wall thickness at 42 h relative to the mock-treated mutant, but no such differences were seen at 48 h and 72 h consistent with the HS tolerance of the mutant. Also wall maturation appeared to occur normally for *cesa3^{hsr1}* both in the presence or absence of HS, as seen by the gradual increase in the buckling of outer cell wall layers.

In conclusion, this study suggests that the primary target of HS is not cellulose synthesis itself, but the process underlying the assembly of cellulose microfibrils and matrix polymers into an extensible multilamellate structure required for rapid cell expansion.

DISCUSSION

This study shows that HS behaves like CBIs in that it triggers similar phenotypic changes: reduced growth anisotropy, changes in cell wall composition (e.g. reduced cellulose content and increased callose accumulation and ectopic lignification) and

changes in the expression of cell wall-related genes. In addition, different mutations in CESA3 confer partial resistance against both HS and the CBIs isoxaben and C17, with interesting cross-resistance patterns. Indeed, *cesa3^{2C}* and *cesa3^{8P}* showed resistance only to C17, *cesa3^{hsr1}* only to HS, whereas *cesa3^{ixr1-1}* and *cesa3^{ixr1-2}* were resistant to both isoxaben and HS.

A more detailed analysis however shows that, in contrast to previously studied CBIs (Debolt and Brabham, 2013), HS does not directly affect the localization or the activity of (GFP-CESA3- or GFP-KOR-tagged) CSCs, nor their interaction with CMTs. Instead, the drug interferes with the assembly of cell wall polymers, in such a way that they lose the capacity to undergo the rearrangements that underlie normal extension growth. The HS-induced changes in the CMT rotation rate may reflect changes in the intra-organ stress patterns associated with the reduced growth and the reduced expression of *CESA* genes and the inhibition of cellulose synthesis, based upon their timing, also appear to be secondary responses to the cell wall perturbation.

How could HS interfere with wall assembly? To understand this, we studied the cell wall ultrastructure of dark-grown hypocotyl epidermis cells. These cell walls in *Arabidopsis* and other species show, in contrast to most other cells, where wall deposition and cell expansion are tightly coordinated, an extreme temporal separation between wall deposition and cell elongation. Here, extensive cell wall deposition in ordered layers occurs in slowly isodiametrically growing cells before the transition to a rapid anisotropic growth phase during which the cell wall polymers substantially rearrange causing the thinning of the cell wall (Refrégier et al., 2004). The transition from cell wall accumulation to expansion is triggered by the demethylesterification of the pectin polymer homogalacturonan specifically in the longitudinal cell walls (Peaucelle et al., 2015). An intriguing question is what determines the capacity of these cell walls to sustain such dramatic polymer rearrangements. Our current understanding is that it requires the coordination of cellulose and matrix deposition, where pectin binds to nascent microfibrils, through rhamnogalacturonan (RG)-I side chains (Wang et al., 2015; Ralet et al., 2016) and

prevents their aggregation; and where xyloglucan-cellulose binding is restricted to a small number of cellulose-xyloglucan-cellulose cross-link sites (Park and Cosgrove, 2015). The selective removal of these so-called “biomechanical hotspots” by expansins at acidic pH is thought to allow the polymer rearrangements during the rapid growth phase (Zhang et al., 2017; Ivakov et al., 2017).

In this context, the thick and less extensible walls observed in the presence of HS, relative to mock treated controls, may reflect the interference of the drug with the timely incorporation of matrix polymers in the expanding cell wall and/or the promotion of their premature crosslinking. If so, it remains to be explained how mutations in a CSC component can confer partial insensitivity to HS. One possibility is that *cesa3^{hsr1}*, *cesa3^{ixr1-1}* and *cesa3^{ixr1-2}* mutations simply reduce the cellulose deposition rate, thus compensating for a reduced incorporation rate of matrix polymers. We also did not observe a reduced (GFP:KOR-tagged) CSC speed in *cesa3^{hsr1}* as compared to the WT, but we cannot exclude that, during a particular growth stage, the particle speed and/or density was lower in the mutant. An alternative, not mutually exclusive, is that a mechanism exists that coordinates CSC activity with matrix delivery and/or modification during cell wall assembly and that CESA3 physically interacts with a component of this mechanism. Perturbation of this interaction as a result of Isoxaben-induced CSC clearance from the plasma membrane, might, in addition to the inhibition of cellulose synthesis, trigger stress responses contributing to growth inhibition. In this context, HS might amplify these stress responses without inhibiting cellulose synthesis, while *cesa3^{hsr1}*, but also *cesa3^{ixr1-1}* and *cesa3^{ixr1-2}*, would prevent HS-triggered stress responses by changing the CESA3 interaction with this signaling component. Candidates for such a signaling component could be the redundant COMPANION OF CELLULOSE SYNTHASE (CC) 1 and 2, which are part of the CSC, interact with CESAs and microtubules and are required for the reinsertion of CSCs in the plasma membrane after their salt-stress induced accumulation in MASCs/SmaCCs (Endler et al., 2015). Finally, the cross-resistance of the *cesa3^{ixr1-1}* and *cesa3^{ixr1-2}* mutants to HS would suggest an interconnection between the mechanisms that control CSC clearance from the plasma membrane and the signaling pathway controlling matrix properties respectively. Further research

will focus on the study of the HS target and the link between isoxaben and HS signaling.

This study illustrates the complexity of the regulation of cell wall assembly and remodeling in growing cells and how chemical genetics can be used to dissect the signaling processes involved. It also shows that caution is required when inferring causal relationships from mutant or chemically-induced phenotypes, given the difficulties to distinguish primary from secondary effects. HS and HS-resistant mutants will be interesting tools to evaluate the role of CSC-dependent cell wall integrity signaling in growth, morphogenesis and in responses to the environment.

METHODS

Plant materials

EMS mutant lines for *cesa3^{ixr1-1}* and *cesa3^{ixr1-2}* (Heim et al., 1989; Scheible et al., 2001) were purchased from the *Arabidopsis* Biological Resource Center (). *pom2/csi1* (Bringmann et al., 2012) was kindly provided from Staffan Persson. Mutant lines for *cesa3^{ixr1-1}* and *cesa3^{ixr1-2}* was kindly provided from . The T-DNA insertion mutant *ktn1* (SAIL_343_D12) (Chen et al., 2014) was kindly provided from Xu Chen. The GFP-CESA3, GFP-TUA6, GFP-KOR1, EB1b-GFP and the dual marker line expressing GFP-CESA3 and mRFP-MBD were described previously (Chan et al., 2007; Crowell et al., 2009; Desprez et al., 2007; Vain et al., 2014). The GFP-TUA6, GFP-KOR1 and EB1b-GFP lines were also crossed with *cesa3^{hsr1}* and those marker lines in *cesa3^{hsr1}* background were obtained and used for further analysis. Presence of *CESA3^{hsr1}* mutation was verified by a CAPS marker using primers *hsr1* CAPS F and *hsr1* CAPS R, and the subsequent HinfI digestion.

Chemical Genetics Screens

Novel molecules with cell growth inhibitory activities were uncovered from chemical genetic screenings using etiolated 3-day-old Col-0 seedlings against a

12,000 structurally diverse and novel synthetic small molecule chemical library purchased from the Life Chemical Incorporation (Ontario, Canada). The chemical screenings were carried out in 96-well plates as described (Zhao, 2012; Zhao et al., 2007) except the chemical concentration used in the initial screen was 100 μM . The plant chemical genetics phenotypes were observed and imaged using a SZX16 dissecting microscope (Olympus).

Growth conditions and chemical treatment

Surface sterilized *Arabidopsis* seeds were suspended with 0.1% agar, plated on 0.7% solidified agar medium containing 1/2 MS salts (Sigma Aldrich) with 1% sucrose for root experiments or without sucrose for hypocotyl experiments, and then cold-treated at 4°C for 3 days. For root measurements, seedlings were vertically grown at 22°C under 16 h light/8 h dark conditions. For hypocotyl measurements, seeds were exposed to fluorescent white light (150 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 6 h, then plates were wrapped in aluminum foil and seedlings were vertically grown at 22°C under constant dark. Seedlings were scanned and photographed using a SZX16 dissecting microscope (Olympus). The age of the seedlings was defined with respect to the end of stratification. For transcript analysis of cell-wall related genes and confocal microscopy, 3-day-old seedlings on 1/2 MS agar plate were transferred on solid media containing DMSO or hypostuntin, for further growth for 1-6 h (as a short-term treatment) or 12-24 h (as a long-term treatment). For kinetic analysis, 3-day-old dark-grown seedlings were transplanted on 1/2 media supplemented with 0.5% DMSO or 50 μM hypostuntin, followed by continuous dark growth. To prevent growth inhibition from white light, samples were observed under green light and images were taken from a plate within one minute. Average hypocotyl elongation rate was calculated as top displacement in an hour for each seedling. For observing microtubule rotary movement, experiments were performed as described (Chan et al., 2007; Chan et al., 2010) with a few adjustments. In brief, cold-treated seeds were firstly plated on 1/2 MS solid media without sucrose and grown for 24 h at 22°C under 16 h light/ 8 h dark photoperiod condition. Then seedlings were transferred on filter paper soaked with sterile water, placed into microscopy chambers and vertically grown in 16 h light/ 8 h dark condition for one more day. For chemical treatment, 1% DMSO or 100 μM

hypostuntin were prepared as water solution, and 2-day-old seedlings were washed three times by DMSO or hypostuntin solutions before chamber resealing and confocal microscopy.

For chemical genetics assay on seedlings of rice (*Oryza sativa* L), rice dry seeds of *Zhonghua 11*, a japonica cultivar, were surface-sterilized with 10% (v/v) NaClO solution for 10 min and washed with sterilized distilled water for three times. Sterilized rice seeds were placed on 9-cm wide petri dishes containing water and germinated at 28°C for 2 days under dark condition and then 37°C grew for another day, then transferred to 12-well plates, of which each well was filled with 2 ml distilled water containing either 1% DMSO or different concentrations of HS. Seedlings were photographed after 3-day growth at 28°C under a 16/8 h light/dark cycle. Measurement of hypocotyl, root or coleoptile length was performed using ImageJ (W.S. Rasband; National Institutes of Health).

***Escherichia coli* growth and *Saccharomyces cerevisiae* growth assay**

For *Escherichia coli* growth assay, a single colony of *E.coli* DH5 α was inoculated in 3 ml of Luria-Bertani (LB) liquid medium and incubated overnight at 37°C on a shaker (Thermo). Then 20 μ l of the culture was inoculated in 4 ml LB liquid medium containing DMSO or different concentrations of hypostuntin and grew on the shaker at 37°C. The optimal density value was measured every hour from 0 to 8hr after incubation using a SmartSpec Plus spectrometer (Biorad).

For *Saccharomyces cerevisiae* growth assay, a single colony of *S. cerevisiae* that has grown for 48 h on solid medium was then inoculated and suspended in 25 μ l of sterile water. 2.5 μ l of the serially diluted (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) suspensions of *S. cerevisiae* was separately spotted onto petri plates of solid yeast extract peptone dextrose (YPD) medium containing DMSO or various concentrations of hypostuntin. Plates were incubated for 48 h at 30°C before photos were taken.

Callose and lignin staining

Col-0 and *cesa3^{hsr1}* seedlings were grown on either 0.5% DMSO or 50 μ M hypostuntin for 3 days in dark. For callose staining, the seedlings were merged in Eppendorf tubes containing 400 μ l 0.1 mg/ml Aniline Blue Fluorochrome (Sigma-Aldrich) solution and stained for 1 h under dark. Then samples were spread on slides before observation using a BX51TRF microscope (Olympus) under UV light. For lignin staining, seedlings were put on slides on which phloroglucinol in a 20% hydrochloric acid solution was added. After 5-min staining, samples were covered with a cover slip and then observed under a SZX16 dissecting microscope (Olympus) in bright field (BF) mode.

Cell wall monosaccharide composition analysis

The monosaccharide composition analysis was performed as described previously (Zhang et al., 2009). Air dried hypocotyls (50 mg) from 3-day old dark-grown *Arabidopsis* seedlings or 3-day-old rice seedlings either grown with 0.5% DMSO or 50 μ M hypostuntin for *Arabidopsis* and 150 μ M hypostuntin for rice were ground into a fine powder in liquid nitrogen. After washed by phosphate buffered saline buffer and 70% (v/v) ethanol for three times, and rinsed twice in acetone at room temperature, the remaining cell wall residues were dried and used for analyses of cellulose, and neutral monosaccharide composition. Then, 2 mg of destarched alcohol-insoluble materials were hydrolyzed in 2 M trifluoroacetic acid (TFA) at 121°C for 90 min. After air-drying, sodium borohydride treatment and extraction with ethyl acetate, the generated alditol acetates were analyzed by an Agilent 7890 GC system equipped with a 5975CMSD (Agilent) as described (Liu et al., 2013). For cellulose content analysis, the residual pellets were obtained from the remains after TFA treatment were washed and hydrolyzed with 72% H₂SO₄, and the cellulose content was quantified by the anthrone assay (Updegraff, 1969).

Quantitative RT-PCR analysis

Total mRNA was extracted from seedlings using Trizol (Invitrogen), and cDNA templates were synthesized from 0.5 μ g of total RNA using ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) according to the manufacturer's instructions after genome DNA

removal. Real-time qPCR was performed by using the iQ™ SYBR Green Supermix and CFX Connect™ qPCR system (BioRad). The qPCR cycling conditions for amplification were 95°C for 3 min, then 40 cycles of 95°C for 10 s, and 60°C for 30 s followed by 0.1°C/s ramping up to 95°C for fusion curve characterization. qPCR was performed in duplicate on three biological repeats and each sample was normalized with *UBQ10*. Primers are presented in Supplemental Table II.

Hypostuntin resistant mutant screening, map-based cloning, and complementation experiment

100,000 ethyl methane sulfonate (EMS)-mutagenized M2 seeds of Col-0 background were germinated and grown on 1/2 MS solid medium containing 50 µM hypostuntin in dark at 22°C for 3 days, and hypostuntin-resistant seedlings with longer hypocotyls were selected for further characterization. In order to clone the genetic locus responsible for the chemical resistance of the chemical resistant mutant, F1 and F2 progenies from the crosses of the hypostuntin-resistant mutant and Landsberg *erecta* (Ler) wild type were generated and used. About 1000 chemical resistant F2 lines were used to delimit the mutant gene in a 30-kb interval between 5-AB018111-0563 (1.51 Mb) and 5-AB010692-0574 (1.54 Mb) containing 8 candidate genes using all public available InDel and CAPs markers. These genes from both the mutant and wild type were sequenced to identify the mutation site.

For complementation experiment, *pCESA3-CESA3* construct was made by using Gateway cloning technology (Invitrogen). A 7.1-kb fragment of the *CESA3* gene containing its native promoter was amplified by PCR. Subsequently they were introduced in pENTR vector using the pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit (Invitrogen, USA). And then an LR reaction was performed to clone *pCESA3-CESA3* into the pGWB401 binary vector (Nakagawa et al., 2007). *pCESA3-CESA3* construct was transformed into *Arabidopsis cesa3^{hsr1}* plant through flower dip method (Clough and Bent, 1998). Transgenic T1 plants were selected on solid medium containing hygromycin (30 µg/mL, Roche). Seedlings of homozygous T2 transgene line were sensitive to hypostuntin, while the phenotype of hypostuntin-sensitivity segregated in heterozygous T2 line, and the resistant seedlings were identified as negative transformants through gene sequencing.

Semi-thin section sample preparation and microscopy

The rice samples for cross-section were prepared as described (Song et al., 2007). Materials of the top, the middle and the bottom of 3-day-old rice coleoptiles were fixed in FAA (50% ethanol, 5% acetic acid and 5% formaldehyde) for overnight, dehydrated in an ethanol series, and embedded in Paraplast separately (Sigma). Tissue sections (10 μm thick) were cut with a rotary microtome (RM 2235), mounted and stained with toluidine blue. Sections were observed and photographed under an AX10 microscope (Zeiss) with a Zeiss Axio camera. *Arabidopsis* hypocotyl transverse semithin sections of each seedling group were stained by toluidine blue and observed using a BX51TRF microscope (Olympus). Images were made using an Olympus DP71 digital camera.

Transmission electron microscopy observation and measurement of cell wall thickness

Dark-grown *Arabidopsis* seedlings were collected and fixed in 3% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH7.5, with vacuum infiltration for three times and stored at 4°C overnight. After three washes with 0.1 M PBS, seedlings were post-fixed in 1% osmic acid for 2 h. Then the tissues were extensively washed using 0.1 M PBS and dehydrated through graded ethanol solutions. The hypocotyl fragments of the elongation zone from aforementioned tissues were dissected and then embedded in LR white resin (Polysciences, Warrington, PA, USA) and polymerized at 50°C. Transversal ultrathin sections of 100 nm were cut using an ultramicrotome (Ultracut UC6; Leica) and then picked up onto Formvar-coated nickel mesh grids. After drying at room temperature, plant sections were stained with periodic acid, thiocarbohydrazide, and silver proteinate (PATAg) for observing the wall polysaccharides as described (Chan et al., 2010). Grids were examined under an electron microscope (H-7650; HITACHI, Kyoto, Japan) at 100 kV. Cell wall thickness was measured using Image J software (NIH),

and ultrathin sections from three hypocotyls of each seedling group were used for observation and measurement.

Spinning-disk Confocal microscopy

Seedlings expressing GFP-CESA3, GFP-TUA6, EB1b-GFP and dual label lines of GFP-CESA3 and mCherry-MBD were visualized and imaged on an Olympus IX81 confocal microscope equipped with a Yokogawa CSU-X1 spinning disk head, Olympus 100x/1.4 numerical aperture oil objective, and Andor EMCCD iXon Ultra camera (The Core Facility Center, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology) or on an Axio Observer Z1 Zeiss confocal microscope equipped with a Yokogawa CSU-X1 spinning disk, Zeiss 3100/1.4 numerical aperture oil objective, and Roper EMCCD Quantum 512C (Plateforme d'Imagerie Institut JeanPierre Bourgin-Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles). GFP was excited at 488 nm, and mCherry was excited at 561 nm, while emission was collected using band-pass 488/25 and 568/25 filters (Semrock). Typical exposure time was 600 ms for GFP-CESA3, 200 ms for EB1b-GFP, and 300 ms for mCherry-MBD and GFP-TUA6. For time series observation of GFP-CESA3, the video of CESA3 trajectory was taken every 10 s per picture for 10 min in total. To avoid CMT re-orientation of dark-grown hypocotyls caused by light effects, manipulations were performed under green light, and all images were acquired less than 10 min after samples were mounted between slides. For time-lapse microscopy of the rotary movement of EB1b-GFP, chambers were imaged using an Yokogawa CSUX1 spinning disk system featuring a Olympus IX81 confocal microscope equipped with a 40x/1.3NA oil objective lens. A series of z-stack of images (with 1–2 μm z-step intervals) were acquired every 20 s for 6 min and time-lapse images were acquired every 20 minutes.

Image analysis

Image analysis was performed using Image J software (W.S. Rasband; National Institutes of Health). The Stack Reg (Thevenaz et al., 1998) plugin for Image J was performed to correct the focus drift due to the extensive growth of etiolated hypocotyls. To quantify the orientation of cortical microtubules in hypocotyl cells, the

percentage of microtubules at a certain angle range was calculated according to the ratio of the number of these microtubules to the total microtubules measured. Microtubules at the inner face of hypocotyl epidermal cells were measured using the angle tool in Image J according to the orientations relative to hypocotyl growth axis as described (Crowell et al., 2011). Different microtubules angles were classified into following three categories: transverse direction ($-22.5 - 22.5^\circ$), oblique direction ($22.5 - 67.5^\circ / -67.5 - -22.5^\circ$), longitudinal direction ($67.5 - 90^\circ / -90 - -67.5^\circ$). At least 19 cells of different hypocotyls were measured, and in each cell at least 30 microtubules were quantified and analyzed for each treatment. To quantify the percentage of different cell types with certain microtubule orientation at the outer face, the Fibril Tool plug-in for Image J (Boudaoud et al., 2014) was used to measure the prevalent microtubule arrangement of each cell, and subcellular microtubule arrangement types were divided into 4 classes, transverse, oblique, longitudinal and random according to the major microtubule arrangement (Chen et al., 2014). At least 10 hypocotyls were analyzed and 10 cells in each hypocotyl were measured for each treatment. The moving rate of CESA3 was qualified by using Kymographs analysis as described (Bringmann et al., 2012). In brief, after each group of frames were stacked, Kymographs were made using the multiple Kymograph plugin for Image J (http://www.embl.de/eamnet/html/body_kymograph.html), and then particle velocities were calculated from the slopes of kymographs. The brightness and contrast tool of ImageJ and the Time stamper plug-in (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/stamper.html>) were used for movie editing.

Accession numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative under the following accession numbers: CESA3 (At5g05170), TUA6 (AT4G14960), KOR1 (AT5G49720 EB1b (AT5G62500), MBD (from MAP4, M72414)

Supplemental data

Supplemental Figure 1. The structure and bio-activity relationship analysis using hypostuntin analogs.

Supplemental Figure 2. Hypostuntin inhibits Arabidopsis seedlings growth.

Supplemental Figure 3. Hypostuntin has cell growth inhibition effect on seedlings of *Oryza sativa* (rice).

Supplemental Figure 4. Hypostuntin does not affect growth of *E.coli* nor *S.cerevisiae*.

Supplemental Figure 5. Effects of a short-term hypostuntin treatment on the expression of the cell wall synthesis-related genes of Col-0 seedlings.

Supplemental Figure 6. Growth inhibition comparison between hypostuntin and isoxaben treatment.

Supplemental Figure 7. The effect of hypostuntin on hypocotyl elongation in *ktn1* and *ktn1 cesa3^{hsr1}* mutants.

Supplemental Figure 8. Detailed kinetic analysis of dark-grown Col-0 and *cesa3^{hsr1}* hypocotyl growth.

Table S1. Primers used for mapping and genotyping.

Table S2. Primers used for qPCR.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Xu Chen (Fujian Agriculture and Forestry University) for kindly providing the seeds of EB1b-GFP and *ktn1-1*. We thank Staffan Persson (University of Melbourne) for kindly providing the seeds of *pom2/csi1*. We thank Yihua Zhou (Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS) for helpful discussions and advice. We thank Haimin Li and Wenbo Li (SIPPE) for experimental support. We thank Xiaoyan Gao and Zhiping Zhang (SIPPE) for technical assistance in electron microscopy, Xiaoshu Gao and Yunxiao He for technical assistance in confocal microscopy, Jiqin Li and Hua Wang (SIPPE) for technical assistance in semi-thin section preparation. This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31171293 and 31371361), « one hundred talents » program of Chinese Academy of Sciences to Yang Zhao and the French National

Agency for Research (ANR) grants “Wallintegrity”, “GrowPec” and “Pectosign” to HH. The École Doctorale Sciences du Végétal provided funding for Julien Renou’s salary. The IJPB benefits from the support of the LabEx Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-10-LABX-0040-SPS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.H., S.V. and Y.Z. conceived the work and wrote the paper.

J.R., S.V. and D.L performed image acquisition and analysis.

J.R and D.L. performed molecular analysis of crosses.

D.L., J.L., B.Z., E.G.,Y.Y., J.S., Z.H. performed chemical screen and genetic screen.

D.L. performed TEM.

REFERENCES

- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R.R., and Staehelin, L.A.** (2012). *Plant Cell Walls, From Chemistry to Biology* (Garland Science: New York, USA).
- Bischoff, V., Cookson, S.J., Wu, S., and Scheible, W.R.** (2009). Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J Exp Bot* **60**: 955–965.
- Brabham, C., Lei, L., Stork, J., Barrett, M., Gu, Y., and DeBolt, S.** (2014). Indaziflam herbicidal action: a potent cellulose biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol.*

- Bringmann, M., Li, E., Sampathkumar, A., Kocabek, T., Hauser, M.T., and Persson, S.** (2012). POM-POM2/CELLULOSE SYNTHASE INTERACTING1 Is Essential for the Functional Association of Cellulose Synthase and Microtubules in Arabidopsis. *Plant Cell*.
- Caffall, K.H., Pattathil, S., Phillips, S.E., Hahn, M.G., and Mohnen, D.** (2009). Arabidopsis thaliana T-DNA mutants implicate GAUT genes in the biosynthesis of pectin and xylan in cell walls and seed testa. *Mol Plant* **2**: 1000–1014.
- Chan, J., Calder, G., Fox, S., and Lloyd, C.** (2007). Cortical microtubule arrays undergo rotary movements in Arabidopsis hypocotyl epidermal cells. *Nat Cell Biol* **9**: 171–175.
- Chan, J., Crowell, E., Eder, M., Calder, G., Bunnewell, S., Findlay, K., Vernhettes, S., Höfte, H., and Lloyd, C.** (2010). The rotation of cellulose synthase trajectories is microtubule dependent and influences the texture of epidermal cell walls in Arabidopsis hypocotyls. *J. Cell Sci.* **123**.
- Crowell, E.F., Bischoff, V., Desprez, T., Rolland, A., Stierhof, Y.-D., Schumacher, K., Gonneau, M., Höfte, H., and Vernhettes, S.** (2009). Pausing of golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**.
- Crowell, E.F., Timpano, H., Desprez, T., Franssen-Verheijen, T., Emons, A.-M., Höfte, H., and Vernhettes, S.** (2011). Differential regulation of cellulose orientation at the inner and outer face of epidermal cells in the Arabidopsis hypocotyl. *Plant Cell* **23**.
- DeBolt, S. and Brabham, C.** (2013). Chemical genetics to examine cellulose biosynthesis. *Front. Plant Sci.* **3**.
- DeBolt, S., Gutierrez, R., Ehrhardt, D.W., Melo, C. V, Ross, L., Cutler, S.R., Somerville, C., and Bonetta, D.** (2007a). Morlin, an inhibitor of cortical microtubule dynamics and cellulose synthase movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5854–5859.
- DeBolt, S., Gutierrez, R., Ehrhardt, D.W., and Somerville, C.** (2007b). Nonmotile cellulose synthase subunits repeatedly accumulate within localized regions at

the plasma membrane in *Arabidopsis* hypocotyl cells following 2,6-dichlorobenzonitrile treatment. *Plant Physiol* **145**: 334–338.

DeBolt, S., Gutierrez, R., Ehrhardt, D.W., and Somerville, C. (2007c). Nonmotile Cellulose Synthase Subunits Repeatedly Accumulate within Localized Regions at the Plasma Membrane in *Arabidopsis* Hypocotyl Cells following 2,6-Dichlorobenzonitrile Treatment. *PLANT Physiol*.

Derbyshire, P., Findlay, K., McCann, M.C., and Roberts, K. (2007). Cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls involves dynamic changes in cell wall thickness. *J Exp Bot* **58**: 2079–2089.

Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., Höfte, H., Gonneau, M., and Vernhettes, S. (2007). Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**.

Desprez, T., Vernhettes, S., Fagard, M., Refrégier, G., Desnos, T., Aletti, E., Py, N., Pelletier, S., and Höfte, H. (2002). Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform CESA6. *Plant Physiol*. **128**.

Endler, A., Kesten, C., Schneider, R., Zhang, Y., Ivakov, A., Froehlich, A., Funke, N., and Persson, S. (2015). A Mechanism for Sustained Cellulose Synthesis during Salt Stress. *Cell* **162**: 1353–1364.

Gu, Y., Kaplinsky, N., Bringmann, M., Cobb, A., Carroll, A., Sampathkumar, A., Baskin, T.I., Persson, S., and Somerville, C.R. (2010). Identification of a cellulose synthase-associated protein required for cellulose biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 12866–12871.

Gutierrez, R., Lindeboom, J.J., Paredez, A.R., Emons, A.M., and Ehrhardt, D.W. (2009). *Arabidopsis* cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nat Cell Biol* **11**: 797–806.

Harris, D.M. et al. (2012). Cellulose microfibril crystallinity is reduced by mutating C-terminal transmembrane region residues CESA1A903V and CESA3T942I of

cellulose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 4098–4103.

- Hu, Z. et al.** (2016). Mitochondrial defects confer tolerance against cellulose deficiency. *Plant Cell* **28**.
- Ivakov, A.A., Flis, A., Apelt, F., Fuenfgeld, M., Scherer, U., Stitt, M., Kragler, F., Vissenberg, K., Persson, S., and Suslov, D.** (2017). Cellulose synthesis and cell expansion are regulated by different mechanisms in growing *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell*.
- Lampugnani, E.R., Khan, G.A., Somssich, M., and Persson, S.** (2018). Building a plant cell wall at a glance. *J. Cell Sci.* **131**: jcs207373.
- Liu, Z., Schneider, R., Kesten, C., Zhang, Y., Somssich, M., Zhang, Y., Fernie, A.R., and Persson, S.** (2016). Cellulose-Microtubule Uncoupling Proteins Prevent Lateral Displacement of Microtubules during Cellulose Synthesis in *Arabidopsis*. *Dev. Cell*.
- Manoj, K., Wightman, R., Atanassov, I., Gupta, A., Hurst, C.H., Hemsley, P.A., and Turner, S.** (2016). S-Acylation of the cellulose synthase complex is essential for its plasma membrane localization. *Science* (80-.). **353**: 166–169.
- McFarlane, H.E., Doring, A., and Persson, S.** (2014). The cell biology of cellulose synthesis. *Annu Rev Plant Biol* **65**: 69–94.
- Mirabet, V., Das, P., Boudaoud, A., and Hamant, O.** (2011). The role of mechanical forces in plant morphogenesis. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 365–385.
- Nixon, B.T. et al.** (2016). Comparative Structural and Computational Analysis Supports Eighteen Cellulose Synthases in the Plant Cellulose Synthesis Complex. *Sci. Rep.* **6**: 28696.
- Paredez, A.R., Somerville, C.R., and Ehrhardt, D.W.** (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* (80-.). **312**: 1491–1495.
- Park, Y.B. and Cosgrove, D.J.** (2015). Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall. *Plant Cell Physiol* **56**: 180–194.

- Peaucelle, A., Wightman, R., Höfte, H., and Hofte, H.** (2015). The Control of Growth Symmetry Breaking in the Arabidopsis Hypocotyl. *Curr Biol* **25**: 1746–1752.
- Pelletier, S. et al.** (2010). A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown Arabidopsis hypocotyls. *New Phytol.* **188**.
- Ralet, M.C., Crepeau, M.J., Vigouroux, J., Tran, J., Berger, A., Salle, C., Granier, F., Botran, L., and North, H.M.** (2016). The affinity of xylan branches on rhamnogalacturonan I for cellulose provides the structural driving force for mucilage adhesion to the Arabidopsis seed coat. *Plant Physiol.*
- Refrégier, G., Pelletier, S., Jaillard, D., and Höfte, H.** (2004). Interaction between wall deposition and cell elongation in dark-grown hypocotyl cells in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **135**.
- Rose, J.K., Braam, J., Fry, S.C., and Nishitani, K.** (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol* **43**: 1421–1435.
- Sampedro, J., Gianzo, C., Iglesias, N., Guitian, E., Revilla, G., and Zarra, I.** (2012). AtBGAL10 is the main xyloglucan beta-galactosidase in Arabidopsis and its absence results in unusual xyloglucan subunits and growth defects. *Plant Physiol.*
- Sánchez-Rodríguez, C., Ketelaar, K., Schneider, R., Villalobos, J.A., Somerville, C.R., Persson, S., and Wallace, I.S.** (2017). BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 negatively regulates cellulose synthesis in *Arabidopsis* by phosphorylating cellulose synthase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Scheible, W.R., Eshed, R., Richmond, T., Delmer, D., and Somerville, C.** (2001). Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in Arabidopsis *lxr1* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10079–84.
- Surpin, M., Rojas-Pierce, M., Carter, C., Hicks, G.R., Vasquez, J., and Raikhel, N.**

- V (2005). The power of chemical genomics to study the link between endomembrane system components and the gravitropic response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4902–4907.
- Uyttewaal, M., Burian, A., Alim, K., Landrein, B., Borowska-Wykret, D., Dedieu, A., Peaucelle, A., Ludynia, M., Traas, J., Boudaoud, A., Kwiatkowska, D., and Hamant, O.** (2012). Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in Arabidopsis. *Cell* **149**: 439–451.
- Vain, T., Crowell, E.F., Timpano, H., Biot, E., Desprez, T., Mansoori, N., Trindade, L.M., Pagant, S., Robert, S., Höfte, H., Gonneau, M., and Vernhettes, S.** (2014). The cellulase KORRIGAN is part of the cellulose synthase complex. *Plant Physiol.* **165**.
- Wang, T., Park, Y.B., Cosgrove, D.J., and Hong, M.** (2015). Cellulose-Pectin Spatial Contacts Are Inherent to Never-Dried Arabidopsis Primary Cell Walls: Evidence from Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiol* **168**: 871–884.
- Wolf, S., Hématy, K., Höfte, H., Hematy, K., and Hofte, H.** (2012). Growth control and cell wall signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 381–407.
- Wolf, S., Mouille, G., and Pelloux, J.** (2009). Homogalacturonan methylesterification and plant development. *Mol Plant* **2**: 851–860.
- Yoneda, A., Ito, T., Higaki, T., Kutsuna, N., Saito, T., Ishimizu, T., Osada, H., Hasezawa, S., Matsui, M., and Demura, T.** (2010). Cobtorin target analysis reveals that pectin functions in the deposition of cellulose microfibrils in parallel with cortical microtubules. *Plant J* **64**: 657–667.
- Zhang, T., Vavylonis, D., Durachko, D.M., and Cosgrove, D.J.** (2017). Nanoscale movements of cellulose microfibrils in primary cell walls. **3**: 17056.
- Zhang, Y. et al.** (2016). Golgi-localized STELLO proteins regulate the assembly and trafficking of cellulose synthase complexes in Arabidopsis. *Nat. Commun.* **7**.
- Zhao, Y., Chow, T.F., Puckrin, R.S., Alfred, S.E., Korir, A.K., Larive, C.K., and**

Cutler, S.R. (2007). Chemical genetic interrogation of natural variation uncovers a molecule that is glycoactivated. *Nat. Chem. Biol.*

Zhu, X., Li, S., Pan, S., Xin, X., and Gu, Y. (2018). CSI1, PATROL1, and exocyst complex cooperate in delivery of cellulose synthase complexes to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**: E3578–E3587.

FIGURES WITH LEGENDS

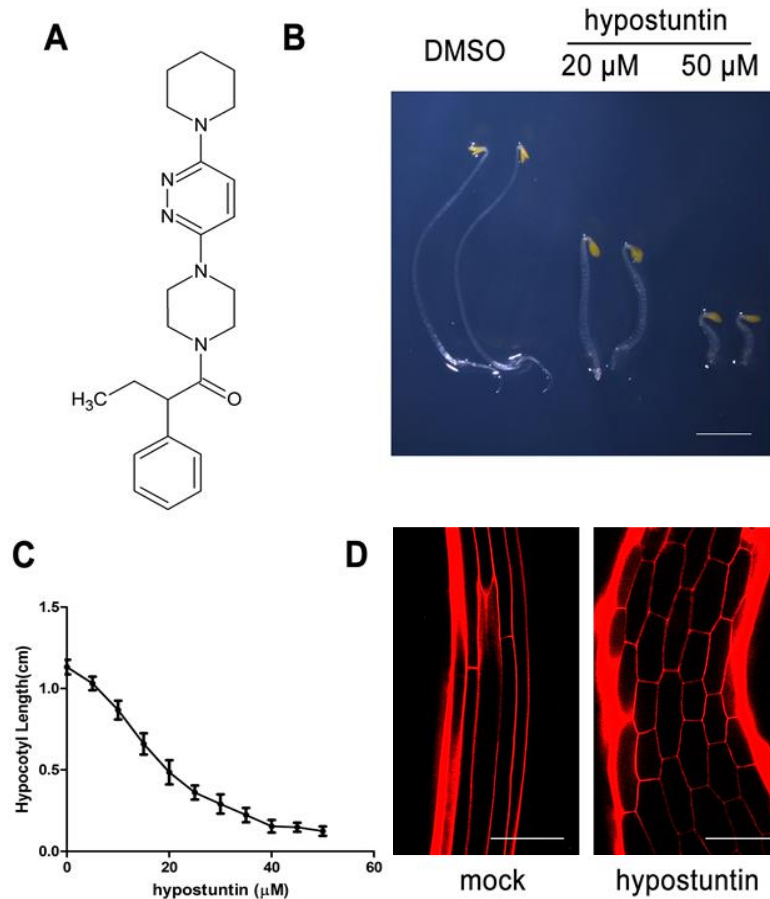


Figure 1. Hypostuntin inhibits Arabidopsis cell elongation. (A) The chemical structure of hypostuntin. (B) Chemical genetic phenotypes of 3-day-old Col-0 seedlings grown in dark on either 0.5% DMSO (left), 25 μ M (middle) or 50 μ M hypostuntin (right). Scale bar = 2 mm. (C) Dose response curve of dark-grown hypocotyl growth on hypostuntin. IC₅₀ = 20 μ M. Data represent mean \pm SD, n=20. (D) Propidium iodide (PI) stained 3-day-old etiolated hypocotyl cells treated with 0.5% DMSO or 50 μ M hypostuntin. Scale bar = 100 μ m.

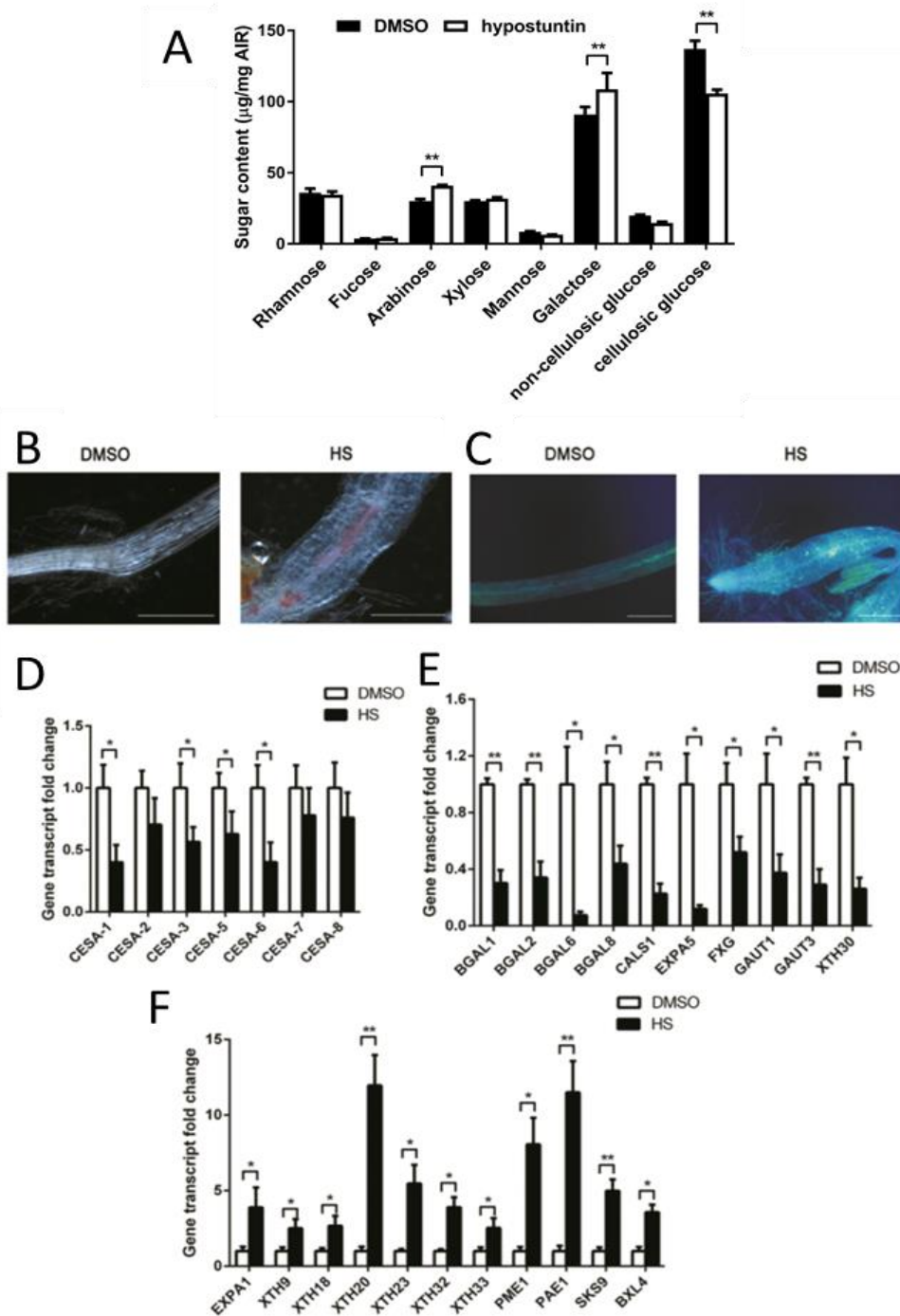


Figure 2. Hypostuntin induces changes similar to those of cellulose biosynthesis inhibitors. (A) Cell wall monosaccharide composition of 3-day-old WT *Arabidopsis* seedlings grown in the dark on either DMSO or 50 µM hypostuntin. Data represents mean \pm SE, $n=5$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, Student's t -test. (B) Lignin accumulation: red staining with phloroglucinol to observe the lignin accumulation (C). Callose accumulation: white staining with aniline blue. scale bar = 500 µm (D-F) RNA expression of a selection of cell wall synthesis related genes in Col-0 under mock or HS treatment. Values shown are means \pm SE (biological replicates $n=3$ and 2 technical repeats for each test). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, student's t test.

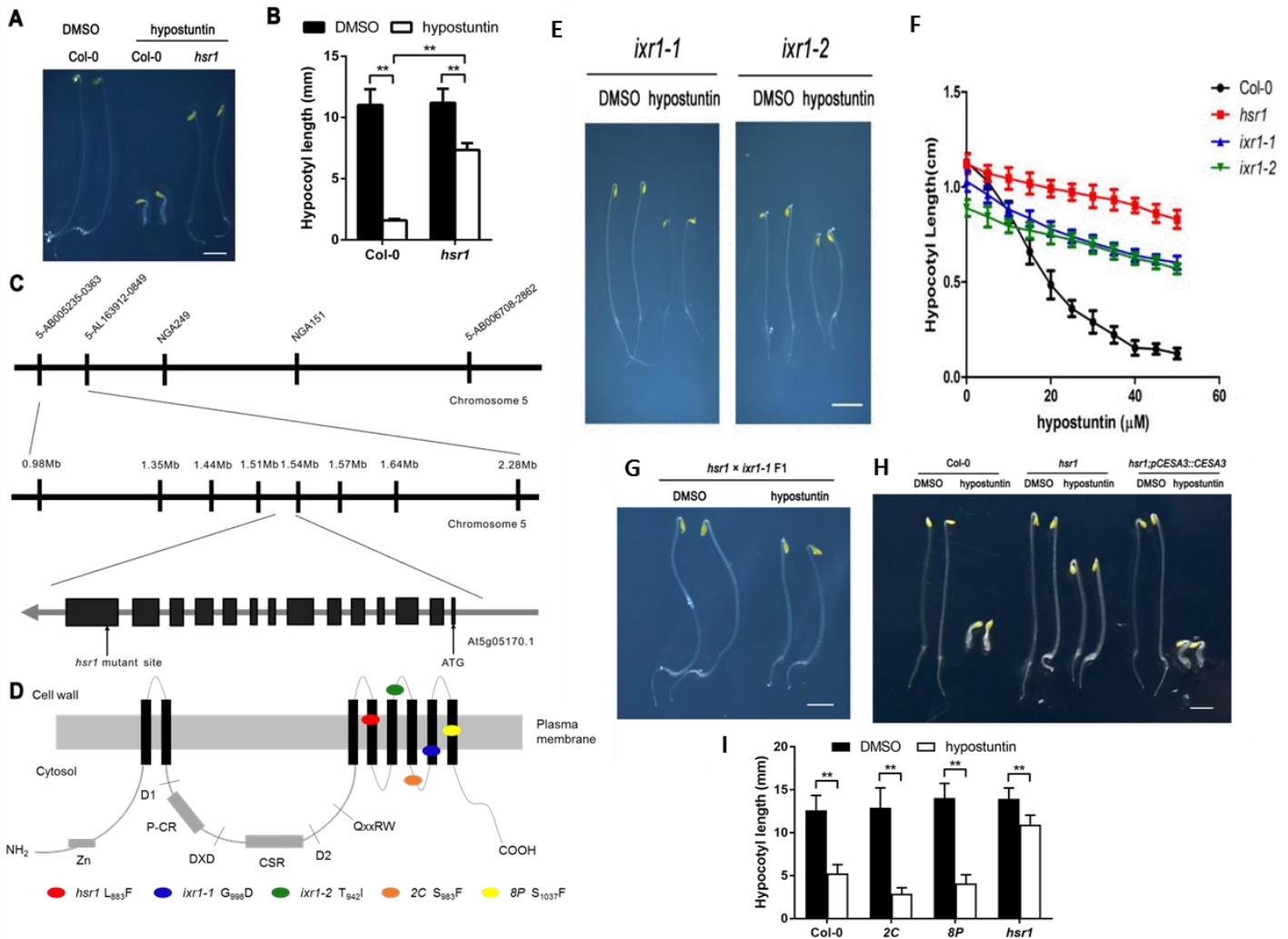


Figure 3. Mutations in CESA3 confer increased tolerance to HS. (A,B) : 3-day-old phenotype of WT and *cesa3^{hsr1}* seedlings grown in the dark in presence of 50μM hypostuntin or control (0.5% DMSO), photo, scale bar = 2 mm. (A) and quantification of hypocotyl lengths (B), bars represent SD, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, student's *t* test, n=20. Genetic mapping and cloning of *hsr1* mutant locus (C). Schematic representation of the domain structure of the CESA3 protein and positions of mutations discussed in this study (D). (E,F) *cesa3^{ixr1-1}* and *cesa3^{ixr1-2}* mutations also confer resistance to hypostuntin. Photos (E) and hypocotyl length quantification (F) of 3-day-old dark-grown seedlings. Complementation test (G) and complementation of *cesa3^{hsr1}* phenotype by a *pCESA3::CESA3* transgene (H). Scale bars = 2 mm. (I) *cesa3^{2C}* and *cesa3^{8P}* mutations don't confer any resistance to hypostuntin. Quantification of hypocotyl lengths of 4-day-old WT, *cesa3^{2C}*, *cesa3^{8P}* and *cesa3^{hsr1}* seedlings grown in the dark in presence of 10 μM hypostuntin or control (0.5% DMSO). ***P* < 0.01, student's *t* test, n=60

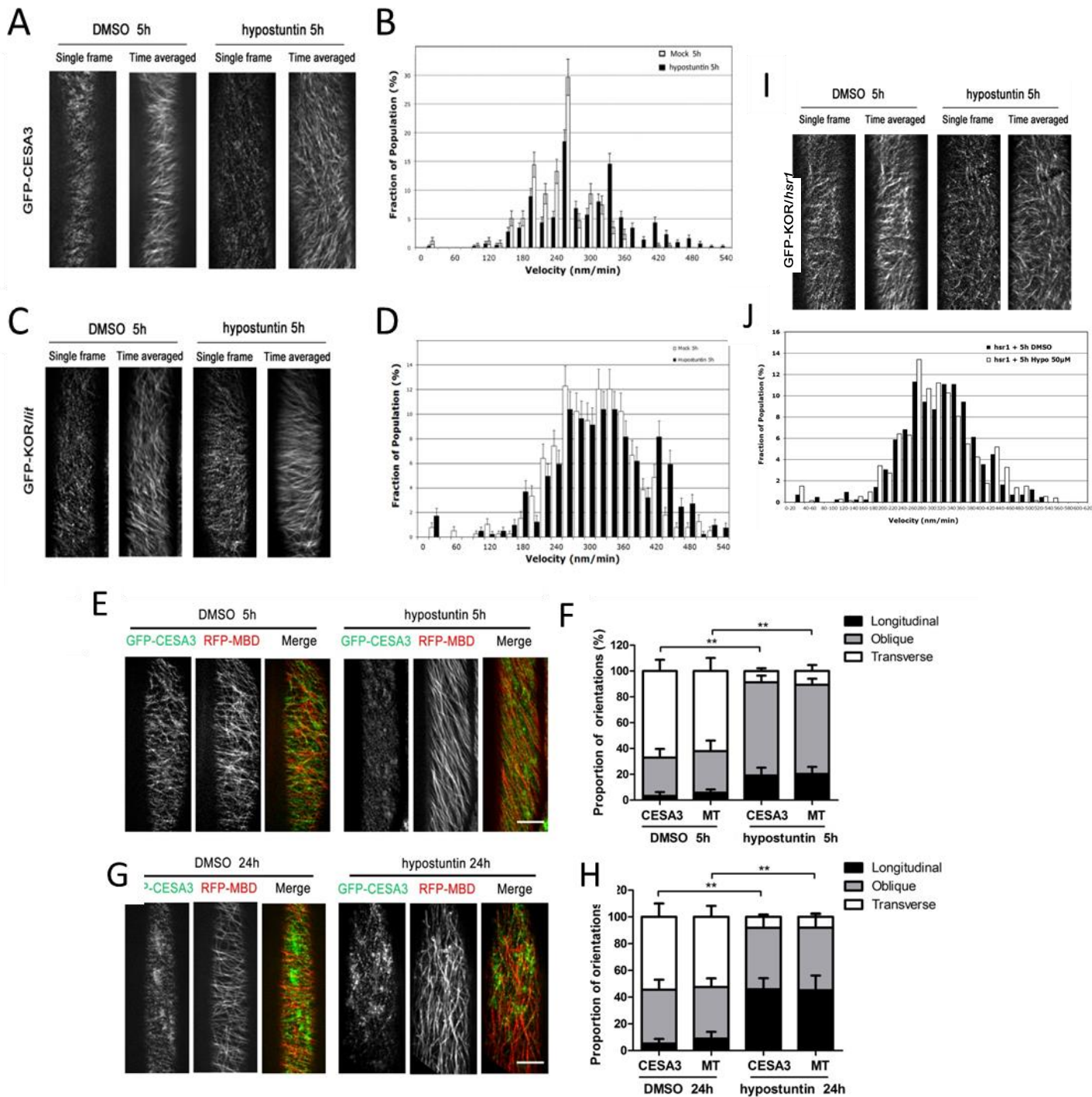


Figure 4. Hypostuntin does not affect the Cellulose Synthase Complex plasma membrane location, velocity nor its interaction with cortical microtubules. (A-D) Representative single frame and time-projection images (10 min, 61 frames) (A,C) and distribution of velocities (B,D) of GFP-CESA3 (A,B) or GFP-KOR (in *kor^{lit}* background) (C,D) particles in the plasma membrane of hypocotyl cells after 5 h treatment with mock (1% DMSO) (A,C left) or 100 μ M hypostuntin (A,C right). (E-H) Single frame image and quantification of the angle of CESA trajectories or microtubules of epidermal cells of 3-day-old etiolated hypocotyls expressing GFP-CESA3 and RFP-MBD after 5 h (E,F) or 24 h (G,H) treatment with

mock (1% DMSO) or 100 μ M hypostuntin, scale bar = 10 μ m. Error bars represent SE. ** Student's *t* test $P < 0.01$, $n = 15$ cells in each treatment. (E) : Representative single frame and time-projections images (10 min, 61 frames) (I) and distribution of velocities (J) of GFP-KOR (in *lit,cesa3^{hsr1}* genetic background) particles in the plasma membrane of hypocotyl cells after 5h treatment with mock (1% DMSO) (left) or 100 μ M hypostuntin (right). Velocities of GFP-CESA3 and GFP-KOR particles were calculated from kymograph analysis from at least 5 cells for each treatment ($n = 5$). Data represent mean \pm SD.

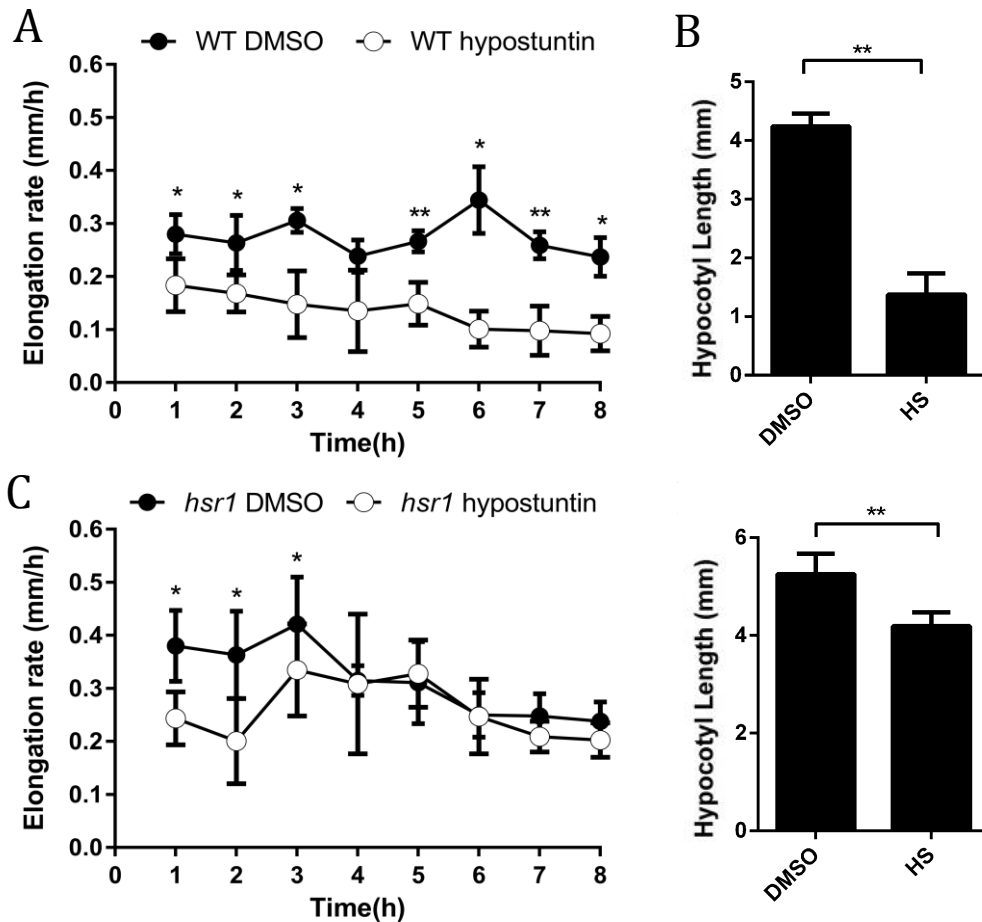


Figure 5. : The growth kinetics of Arabidopsis dark-grown hypocotyl under HS treatment. 3-day-old dark-grown seedlings of Col-0 (A, B) and *cesa3^{hsr1}* (C, D) were transplanted to the 1/2 MS solid medium containing 0.5% DMSO or 50 μ M hypostuntin. (A, C) Hypocotyl elongation rate of Col-0 (A) and *cesa3^{hsr1}* (C) seedlings under DMSO or hypostuntin. (B and D) Hypocotyl elongation of Col-0 (B) and *cesa3^{hsr1}* (D) seedlings after transplant for 24 hr. Hypocotyl elongation was measured as a relative to the length of seedlings at 0 h time point after the transfer *P<0.05, **P<0.01, student's t test. Data represent mean \pm SD, n=10.

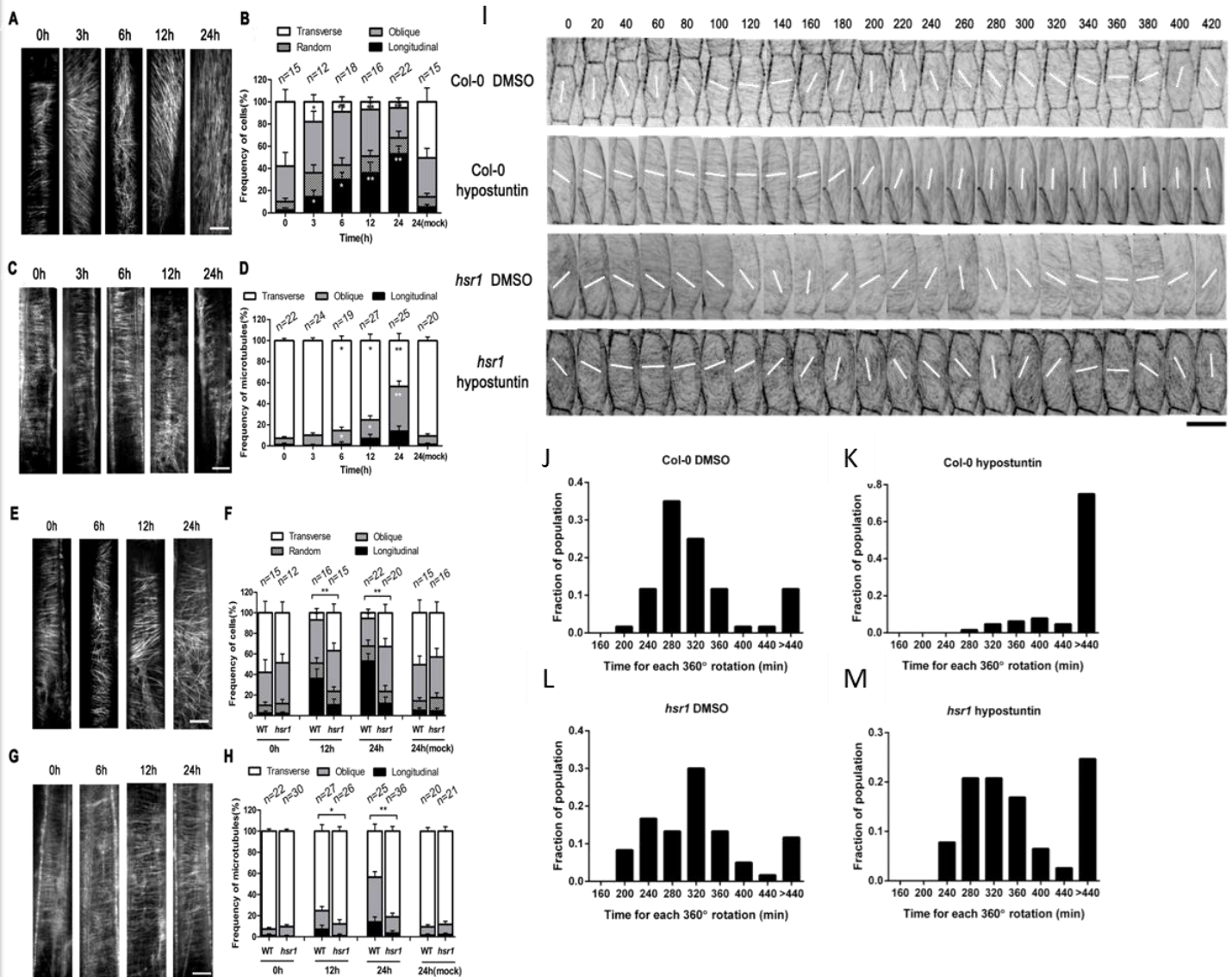


Figure 6. HS induced changes in CMT orientation in wild type and *cesa3^{hsr1}*. (A-D) Microtubules orientation at the outer face (A) or the inner face (C) of the epidermal cells of dark-grown hypocotyls of GFP-TUA6 transgenic lines were visualized after either 1% DMSO or 100 μ M hypostuntin treatment for different time period. Scale bar, 10 μ m. (B, D) Quantitative analysis of the angles of differently oriented microtubules in hypocotyl cells described above. Microtubules orientation were measured as transverse ($-22.5 - 22.5^\circ$), oblique ($22.5 - 67.5^\circ / -67.5 - -22.5^\circ$) or longitudinal ($67.5 - 90^\circ / -90 - -67.5^\circ$). Data represent mean \pm SEM, n represents the number of hypocotyls used. Student's *t*-test was used for transverse microtubules and longitudinal microtubules. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (E-H) Visualization of the microtubules orientation at the outer face (E) or the inner face (G) of the epidermal cells in *cesa3^{hsr1}* background compared to wild-type after either 1% DMSO or 100 μ M hypostuntin treatment for different time period. Scale bar, 10 μ m.

(F, H) Quantitative analysis of the angles of differently oriented microtubules in hypocotyl cells described above. Data represent mean \pm SEM, and Student's *t*-test was used for transverse microtubules (** $p < 0.01$) (I) The long-term rotation pattern of EB1b-GFP comets in hypocotyl epidermal cell under DMSO or hypostuntin treatment. Montages of movie frames were shown from 0 h to 7 h. The net-alignment of EB1b-GFP trajectories were shown in white lines at 20 min intervals. (J-M) Histograms of EB1b-GFP trajectory rotation time costs. The ratio of cells in which microtubules underwent a 360° rotation is 88.3% in Col-0 mock group (J), 25.0% in Col-0 hypostuntin group (K), 86.7% in *cesa3^{hsr1}* mock group (L) and 75.3% in *cesa3^{hsr1}* hypostuntin group (M).

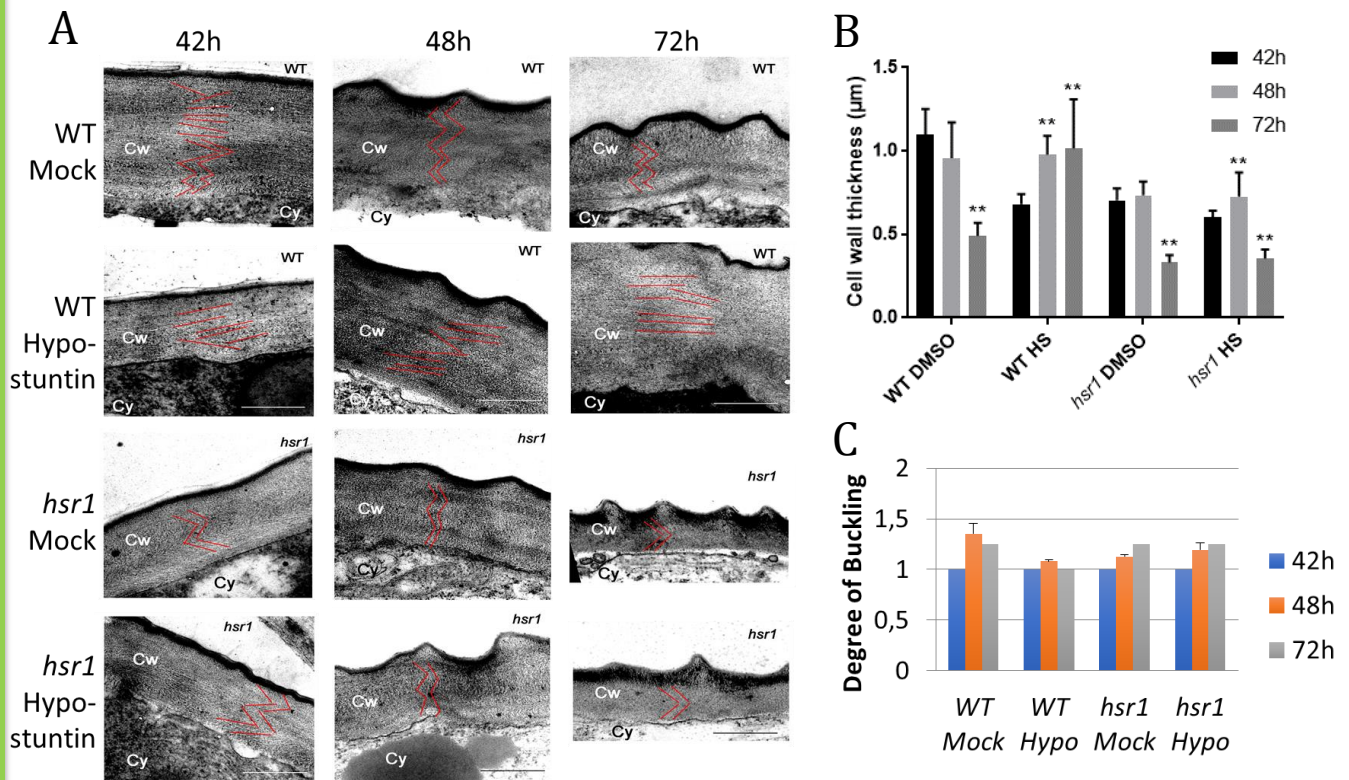
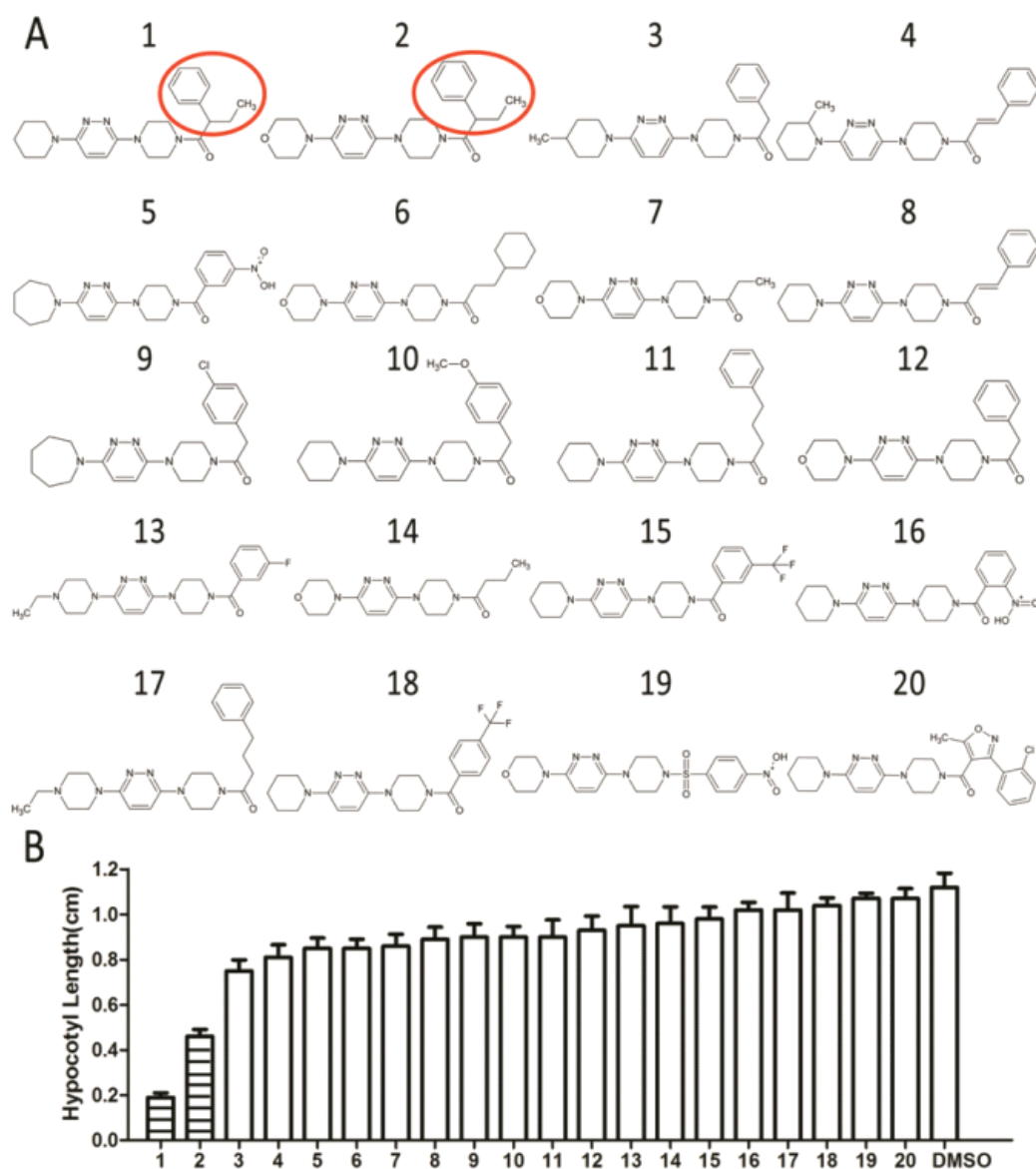
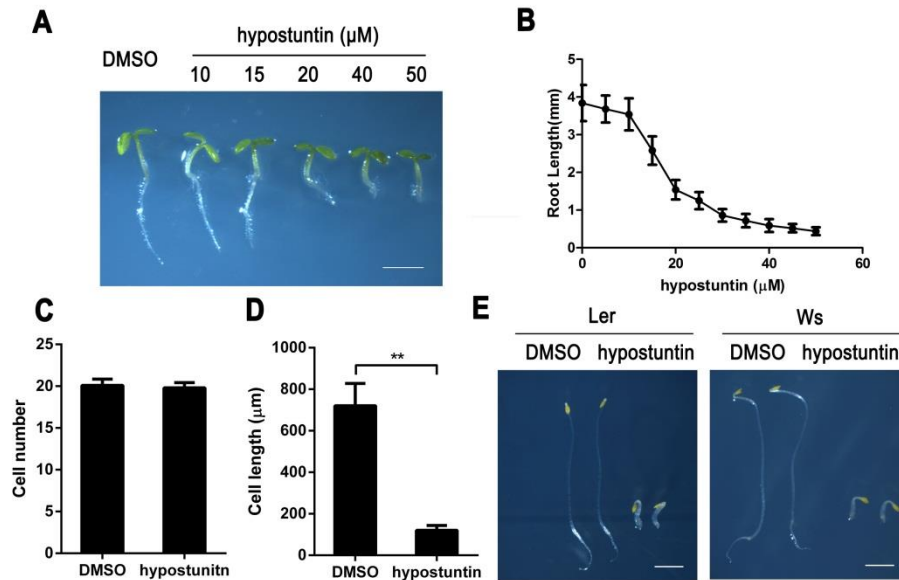


Figure 7. Electron microscopic sections of the outer wall of 42-h-old, 48-h-old and 72-h-old Arabidopsis hypocotyl epidermal cells and their analysis. (A) Transmission electron micrographs of ultrathin cross-sections from the external epidermal cell wall. Seedlings of Col-0 or *cesa3^{hsr1}* were grown on 0.5% DMSO or on 50 µM hypostuntin for 42 h, 48 h and 72 h, and sections were acquired at the hypocotyl elongation zone. The architecture of the outer epidermal cell wall was shown. The red lines highlight the orientation of different wall layers. Cy, cytoplasm; Cw, cell wall. Scale bars, 500 nm. (B) The cell wall thickness measurement of the epidermal cells of Col-0 and *cesa3^{hsr1}* mutant grown for 42 h, 48 h and 72 h. (C) The buckling degree of cell wall in Col-0 or *cesa3^{hsr1}* grown for 42 h, 48 h and 72 h. Buckling degree was calculated as the ratio of the length between cell wall surface and cell wall inside. Each experiment was replicated three times. Data represent mean \pm SD, student's t test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 30$ cells of 3 hypocotyls.

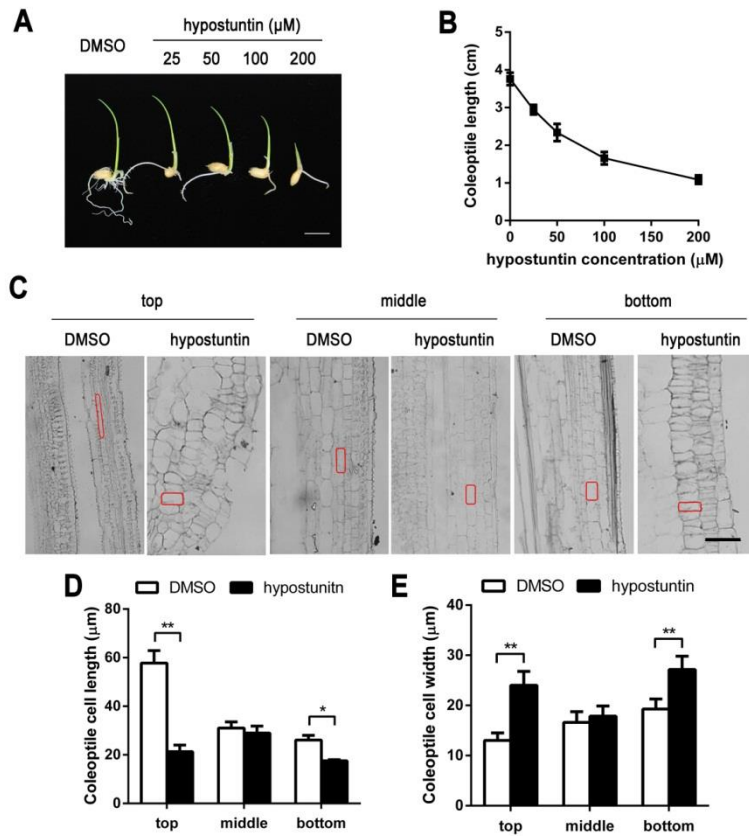


Supplemental Figure 1. The structure and bio-activity relationship analysis using hypostuntin analogs. (A) The chemical structures of hypostuntin (No.1) and its 19 analogs (No.2-20) acquired from the Life Chemical library by using eMolecule web-tool (<https://www.emolecules.com/>). (B) The length of 3-day-old etiolated hypocotyls grown on each assaying compound at a concentration of 50 μ M was measured. Columns filled with lines means seriously reduced hypocotyl growth (over 50% length reduction). Data represent mean \pm SD, n=20.

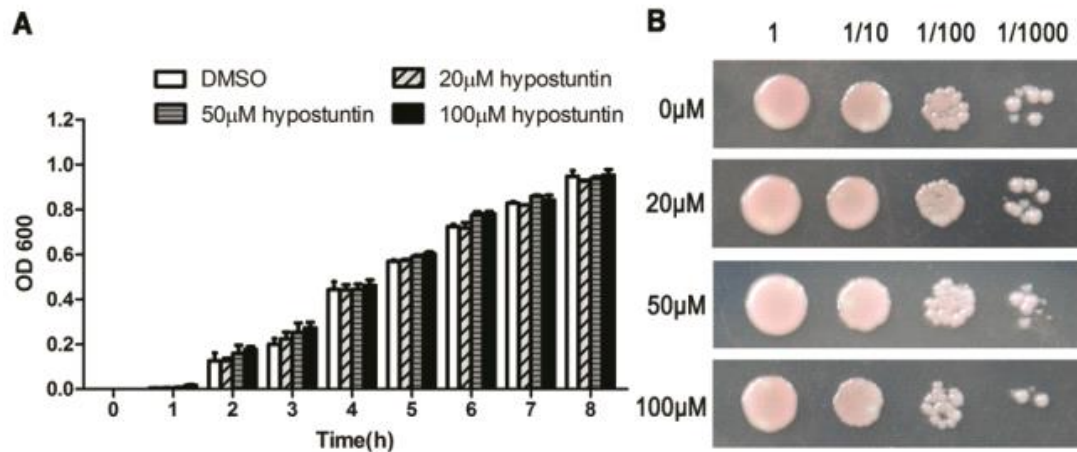


Supplemental Figure 2. Hypostuntin inhibits Arabidopsis seedlings growth.

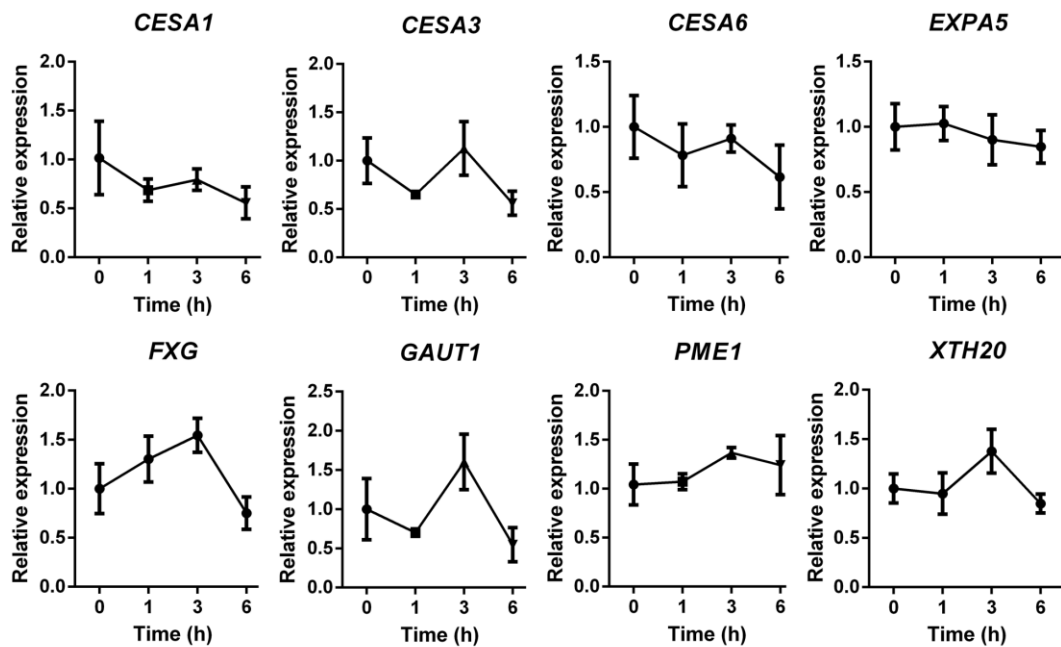
(A) Chemical genetic phenotypes of 3-day-old light-grown Arabidopsis seedlings grown on either DMSO or hypostuntin. Scale bar, 2 mm. (B) Dose response curve of Arabidopsis root growth on hypostuntin. Data represent mean \pm SD, $n=20$. (C) Number of epidermal cells in a file from the base to the top of 3-day-old dark-grown hypocotyls. (D) Length of the 13rd epidermal cell from the base of the hypocotyl. For (C) and (D), Data represent mean \pm SD, $**P < 0.01$, student's t test, $n=10$. (E) Phenotypes of 3-day-old Ler or Ws seedlings grown in dark on either 0.5% DMSO or 50 μM hypostuntin. Scale bar, 2 mm.



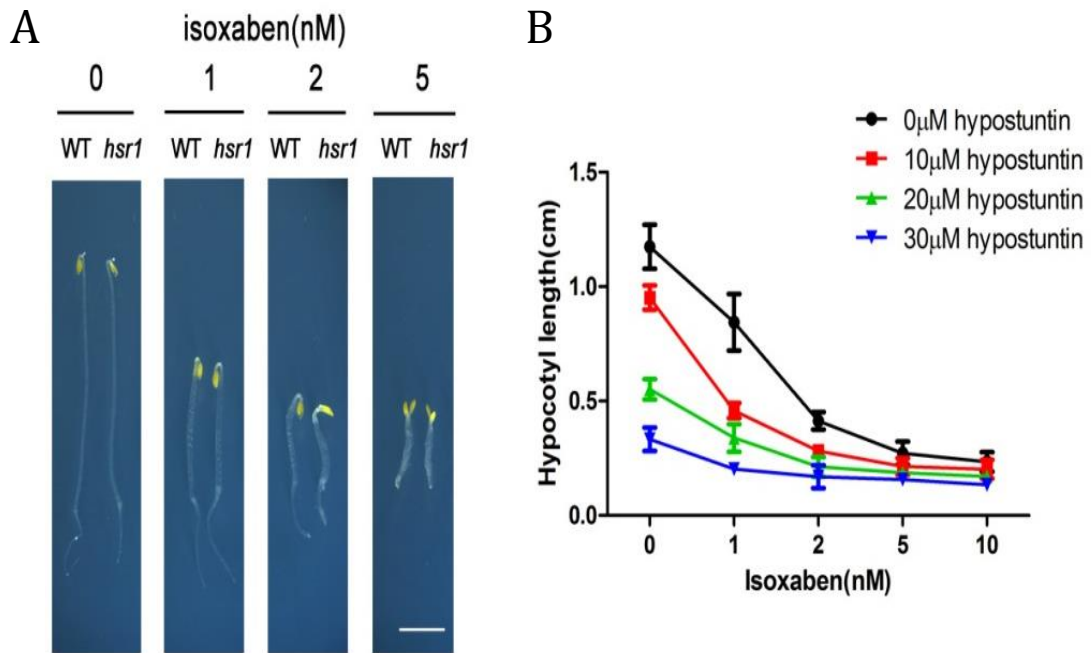
Supplemental Figure 3. Hypostuntin has cell growth inhibition effect on seedlings of *Oryza sativa* (rice). (A) The chemical genetic phenotypes of 3-day-old wild type rice seedlings in water with different concentrations of hypostuntin ranging from 0, 25, 50, 100 to 200 μM . Scale bar, 10 mm. (B) Dose curve of inhibition on growth of rice seedlings caused by HS. (C) Cross-section of different parts of rice coleoptile with DMSO or hypostuntin treatment. One parenchyma cell in each picture was outlined in red as a highlighted representative. Scale bar, 50 μm . (D and E) Comparison of parenchyma cell length (D) and width (E) of rice coleoptiles. Data represent mean \pm SD, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, student's t test, $n=10$.



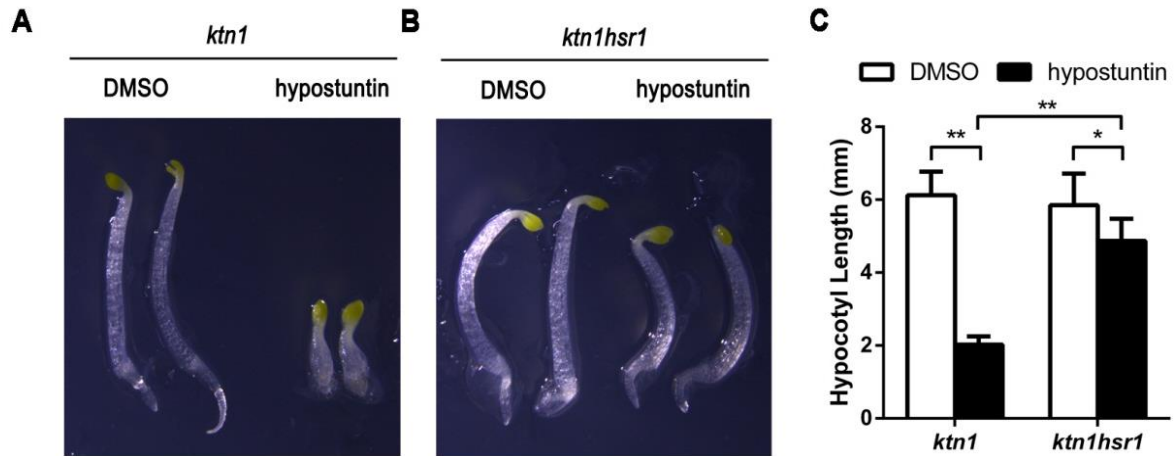
Supplemental Figure 4. Hypostuntin does not affect growth of *Escherichia coli* nor *Saccharomyces cerevisiae*. (A) The cell densities of *E.coli* DH5α grown in liquid LB media with different concentrations of hypostuntin in a time course were measured under OD₆₀₀. Data represent mean ± SD, n=3. (B) The growth of *S. cerevisiae* AH109 cells on YPDA solid medium with different concentrations of hypostuntin at different starting cell density.



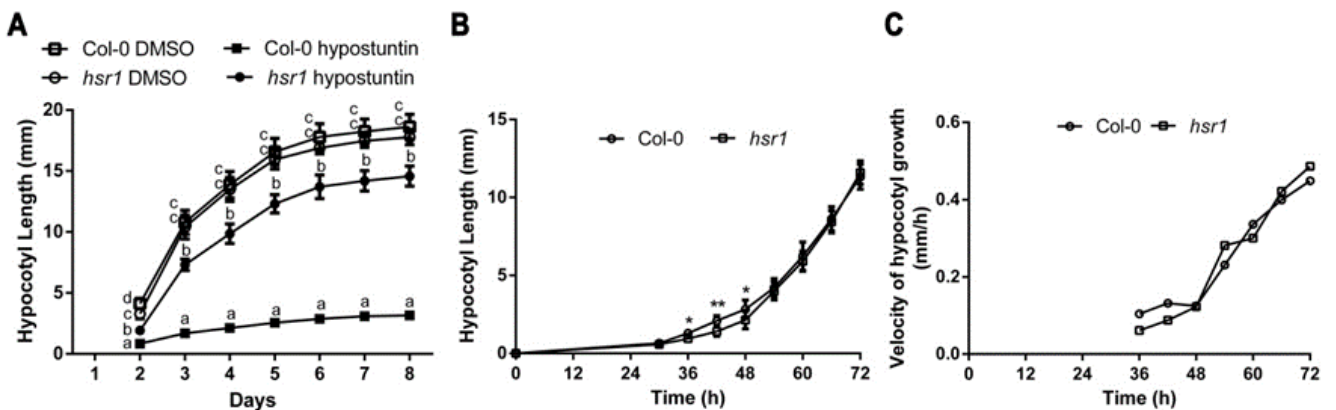
Supplemental Figure 5. Effects of a short-term hypostuntin treatment on the expression of the cell wall synthesis-related genes of Col-0 seedlings. The expression kinetics of some *CESA* and xyloglucan (*XyG*) genes of Col-0 seedlings under 50 μM hypostuntin treatment. Values shown are means ± SE (biological replicates n=3 and 2 technical repeats for each). Student's *t* test, **P*<0.05, ***P*<0.01.



Supplemental Figure 6. Isoxaben sensitivity of *cesa3^{hsr1}* mutant. (A) *cesa3^{hsr1}* is sensitive to isoxaben treatment. 3-day-old dark-grown seedlings grown on 0, 1, 2, 5 nM isoxaben were imaged. Scale bar, 2mm. (B) The hypocotyl length of 3-day-old seedlings grown on combinations of different concentrations of hypostuntin and isoxaben were measured. Data represent mean \pm SD. n=10.



Supplemental Figure 7. The effect of hypostuntin on hypocotyl elongation in *ktn1* and *ktn1 cesa3^{hsr1}* mutants. (A and B) Dark-grown seedlings of *ktn1* (A) or *ktn1hsr1* (B) mutant grown on 0.5% DMSO or 50 μ M hypostuntin. (C) Dark-grown hypocotyl length of *ktn1* and *ktn1cesa3^{hsr1}* seedlings in the absence or presence of hypostuntin. Data represent mean \pm SD. Student's t test, n=15, *P<0.05, **P<0.01.



Supplemental Figure 8. Hypocotyl growth in Col-0 and *cesa3^{hsr1}* in absence or presence of hypostuntin. (A) Dark-grown hypocotyl length of Col-0 and *cesa3^{hsr1}* in absence or presence of hypostuntin (50 μ M) during 8 days. (B) Dark-grown hypocotyl length of Col-0 and *cesa3^{hsr1}* between 0 h and 72 h and their corresponding rate of growth (C).

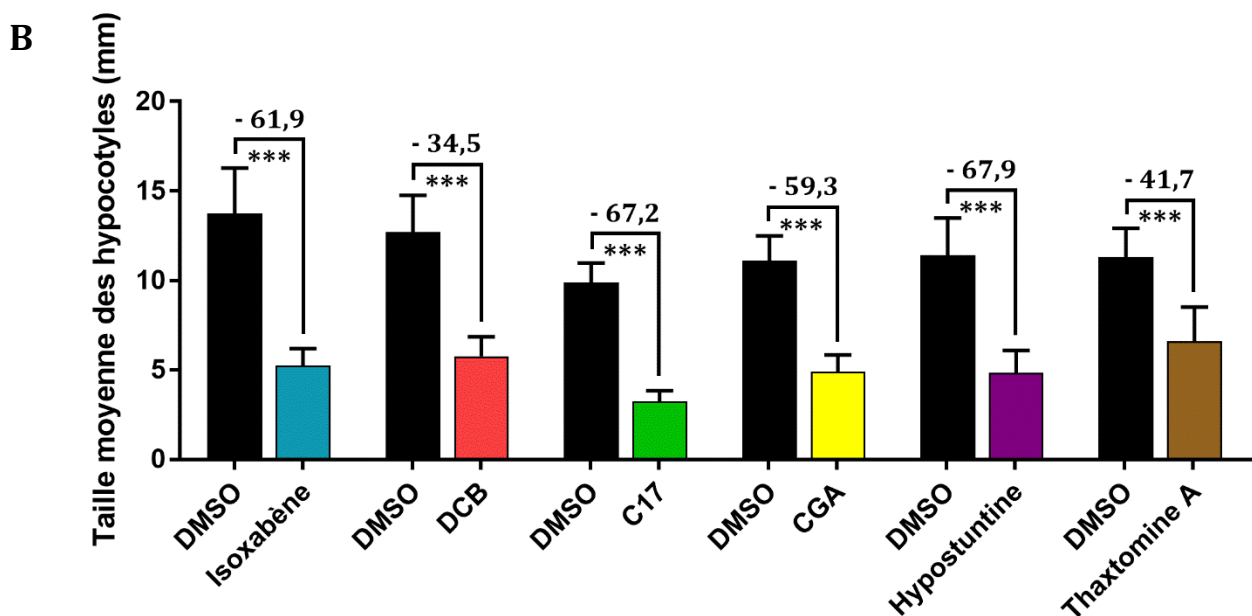
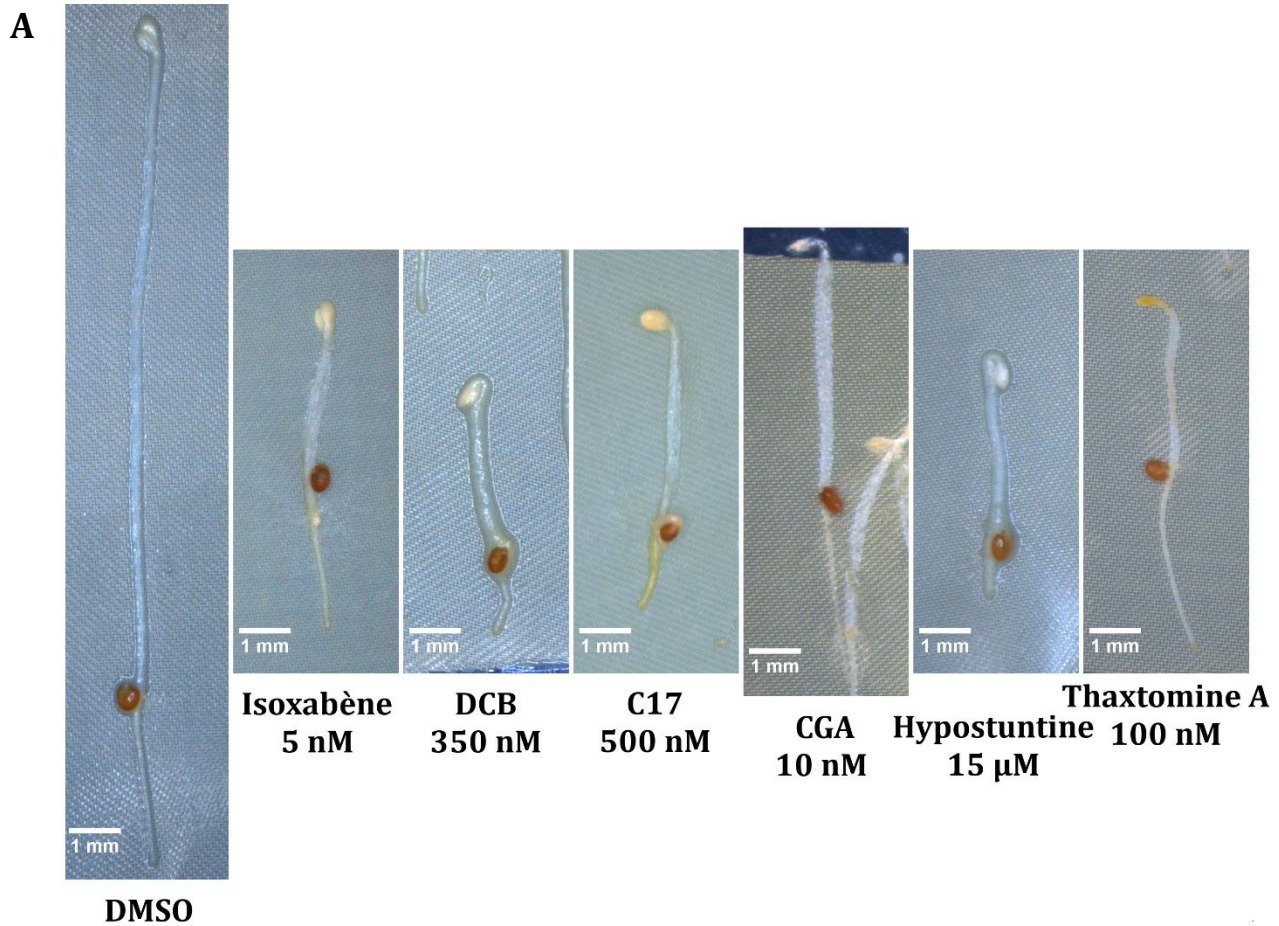


Figure 37. Les CBI inhibent la croissance d'*Arabidopsis thaliana*

Les CBI étudiés dans le cadre de la thèse inhibent tous la croissance de l'hypocotyle de plantules cultivées 4 jours à l'obscurité. (A) Photographies de plantules traitées à des concentrations suffisantes pour observer une inhibition de croissance marquée. (B) Moyennes des tailles des hypocotyles (mm) des plantules cultivées en présence de CBI ou du traitement témoin (DMSO). Le pourcentage d'inhibition de croissance est indiqué ainsi que le résultat du t-test :*** = p-value<0,001. n = 41-78

2.2. Impact des CBI sur l'organisation et la composition de la paroi

2.2.1. Inhibiteurs de la croissance de l'hypocotyle

Les mutants d'*Arabidopsis thaliana* qui sont déficients en cellulose sont généralement nains. Des plantules d'*Arabidopsis thaliana* ont été traitées pendant 4 jours en présence des six CBI étudiés (à des concentrations décrites comme ayant un effet inhibiteur) afin de vérifier s'ils provoquent bien une inhibition de la croissance. Ces tests ont été réalisés à l'obscurité et sur un milieu sans saccharose, deux conditions requises pour favoriser la croissance de l'hypocotyle (Gendreau et al., 1997). Les six CBI sont solubilisés dans le solvant organique diméthylsulfoxyde (DMSO). Par conséquent, le traitement contrôle est constitué de milieu de culture additionné de DMSO. Les traitements ayant été réalisés à des périodes différentes, chaque condition traitée a un témoin DMSO qui lui est propre. A l'obscurité, la croissance des hypocotyles et des racines est impactée par les CBI (Figure 37A). De plus, les plantules traitées aux CBI semblent présenter une expansion radiale exagérée avec des hypocotyles plus épais que pour le traitement DMSO. Les tailles des hypocotyles ont alors été mesurées à l'aide du logiciel d'analyse d'image appelé Image J et les résultats montrent que les six CBI inhibent la croissance des plantules à 4 jours (Figure 37B). Ces inhibitions sont comprises entre 41,7 et 67,9% par rapport aux conditions témoins. Ces valeurs sont donc proches des 50% d'inhibition de croissance (IC50) connues pour certains de ces CBI chez *Arabidopsis thaliana* (Tableau 1, partie 1.4).

2.2.2. Impact des CBI sur la dynamique et la localisation du CSC

Afin d'analyser l'impact des CBI sur le déplacement et la localisation des CSC, des mutants *cesa3^{je5}* exprimant la construction fonctionnelle GFP-CESA3 ont été utilisés (Desprez et al., 2007). Des cellules des épidermes d'hypocotyles cultivés 72 heures à l'obscurité ont été traités jusqu'à 5 heures avec les différents CBI et la localisation des GFP-CESA3 a été observée par microscopie confocale à spinning disk. Un traitement court avec une forte concentration en CBI a été choisi afin d'observer uniquement les effets primaires des CBI sur la localisation de GFP-CESA3. Des séries d'images de 7 ou 10 min sont acquises au niveau de cellules localisées en haut de l'hypocotyle (zone d'élongation) (Figure 35) avec un intervalle de temps compris entre 5 ou 10 secondes selon les traitements.

Une section optique représentative de chaque traitement est représentée (Figure 38A). Pour chaque traitement, des GFP-CESA3 intégrées aux CSC sont visualisées sous forme de particules (exemple = flèche rouge). Comme les GFP-CESA3 sont présentes dans différents compartiments intracellulaires ainsi que dans la membrane plasmique, il est important de réaliser des séries d'images afin d'observer le déplacement des CSC. En effet certains déplacements sont caractéristiques et permettent de conclure quant à la localisation des GFP-CESA3 (Desprez et al., 2007). En réalisant une projection temporelle des séries d'images (Figure 38B), des trajectoires sont clairement visibles (exemple = trait jaune). Il est alors possible de suivre le déplacement des CSC le long de ces trajectoires en réalisant des

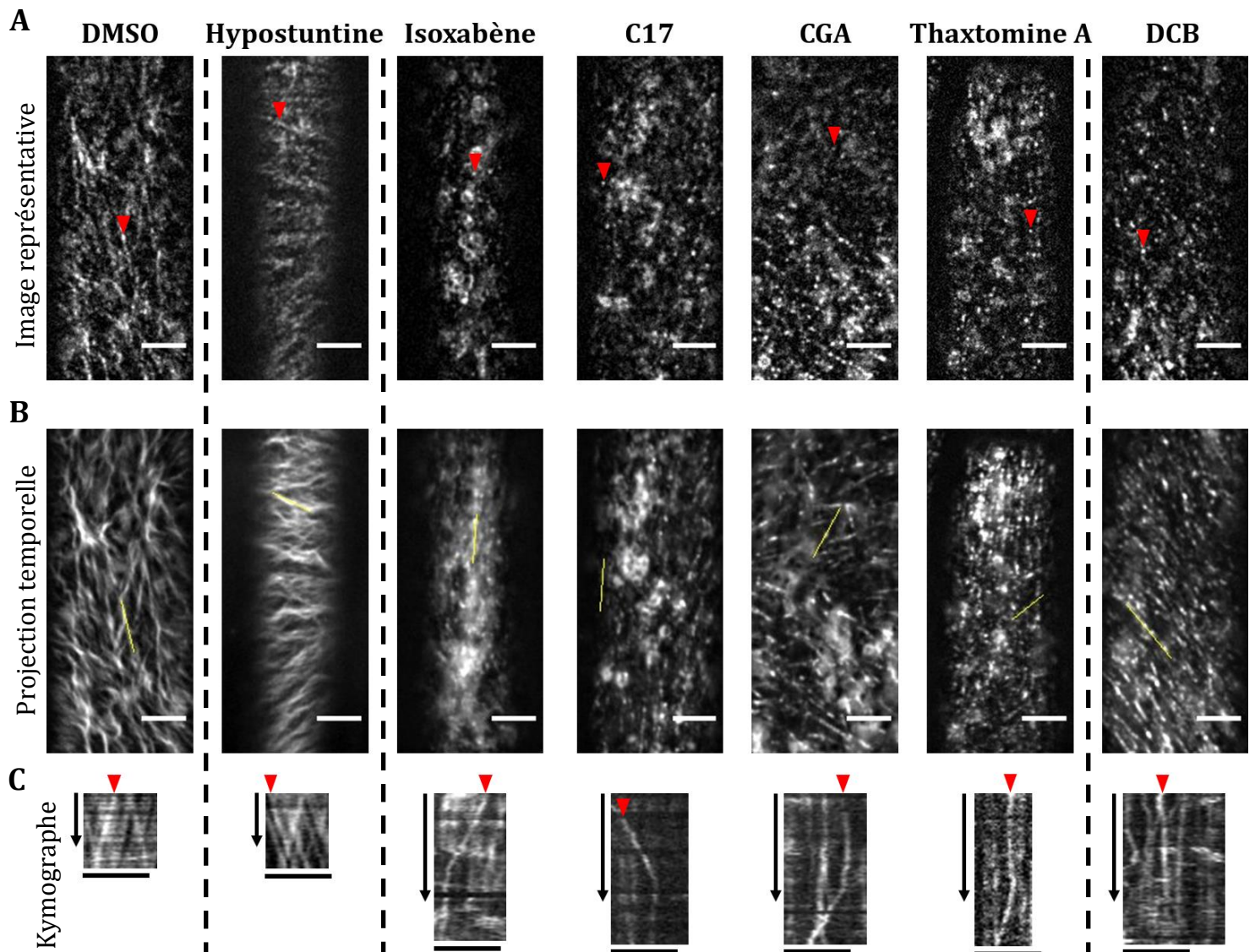


Figure 38. Les CBI impactent différemment la localisation et la dynamique du CSC à la membrane plasmique

Des plantules âgées de 72 heures exprimant GFP-CESA3 ont été traitées respectivement avec du DMSO, 100 nM d'Isoxabène, 5 μ M de DCB, 50 μ M de C17, 10 nM de CGA, 100 μ M d'Hypostuntine et 20 μ M de Thaxtomine A pendant 1h30 (pour le DCB) à 5h. Les cellules de l'épiderme de l'hypocotyle sont visualisées par microscopie confocale à spinning disk. (A) Image représentative de chaque traitement et correspondant aux GFP-CESA3 observées dans différents types de vésicules (exemple= flèche rouge). (B) La projection temporelle de l'ensemble des images du film permet l'observation des trajectoires (exemple = ligne jaune). A partir de celle-ci, un kymographe (C) est réalisé représentant le déplacement des particules dans l'espace (échelle horizontale) et dans le temps (échelle verticale). Barres d'échelle = 5 μ m. Flèche du kymographe = 5 min. On observe que les GFP-CESA3 sont à la membrane plasmique et présentent des mouvements bidirectionnels en présence de l'hypostuntine comme pour le témoin. Avec l'Isoxabène, le C17, le CGA et la Thaxtomine A, des mouvements erratiques sont observés et sont caractéristiques des SmaCC/MASC. Enfin, avec le DCB les GFP-CESA3 sont immobiles à la membrane plasmique.

kymographes (Figure 38C). Un kymographe est la représentation graphique du déplacement d'une particule dans le temps et dans l'espace. On peut en déduire des informations sur la direction et la vitesse du mouvement des particules (Figure 39).

Concernant le traitement DMSO, le kymographe présente des pentes constantes qui correspondent à des particules ayant des vitesses constantes (Figure 38C). On observe également des pentes allant de gauche à droite ou de droite à gauche. Ceci est dû au fait qu'un CSC peut se déplacer dans les deux directions opposées, le long d'un CMT. Il est possible à partir des kymographes de calculer la vélocité des particules. Ainsi, après 5 heures d'incubation dans du DMSO, la vélocité moyenne des GFP-CESA3 est de 298 ± 98 nm/min (Figure 40A). Ces valeurs sont similaires à celles généralement calculées pour les CSC se déplaçant dans la membrane plasmique (Desprez et al., 2007 ; Paredez et al., 2006). Ainsi, le kymographe présenté dans la Figure 38C est caractéristique d'un déplacement de CSC à la membrane plasmique.

Comme décrit dans la partie 2.1 des résultats, en présence d'Hypostuntine, la localisation et les mouvements des GFP-CESA3 sont identiques à ceux observés pour le témoin DMSO. On observe en effet des GFP-CESA3 localisés à la membrane plasmique (Figure 38B) et avec des pentes constantes dans les deux directions au niveau du kymographe (Figure 38C). En ce qui concerne la vélocité des GFP-CESA3, après 5 heures de traitement à l'Hypostuntine, elle est significativement équivalente au traitement témoin DMSO (t-test, p-value = 0,7556) avec en moyenne des particules à 283 ± 74 nm/min (Figure 40B).

Pour l'Isoxabène, le C17, le CGA ainsi que la Thaxtomine A, l'effet sur la localisation des GFP-CESA3 est équivalent. Les coupes optiques représentatives des traitements (Figure 38A) présentent des particules correspondant aux GFP-CESA3, souvent très brillantes mais aussi des anneaux intenses qui sont les vésicules du réseau *trans*-golgien délivrant les CSC à la membrane plasmique. Ces vésicules sont localisées plus profondément dans les échantillons imagés ce qui suggère qu'il n'y a plus de GFP-CESA3 à la membrane plasmique. Les projections temporelles des séries d'images montrent toutefois que ces points peuvent être alignés (Figure 38B). Les kymographes quant à eux présentent des ruptures de pentes (Figure 38C), caractéristiques de particules qui changent brusquement de vitesse (Figure 39). Ces mouvements sont caractéristiques des SmaCC/MASC qui sont des compartiments associés aux extrémités « - » des microtubules corticaux (CMT). Les SmaCC/MASC reflètent alors les mouvements de dépolymérisation des CMT. Ces quatre CBI entraînent donc la disparition des GFP-CESA3 de la membrane plasmique et leur accumulation dans les SmaCC/MASC. Certains travaux suggèrent que l'accumulation dans les SmaCC/MASC est due à un phénomène accru d'endocytose car de tels phénomènes peuvent être observés très rapidement (en 6 minutes dans la racine après un choc osmotique) (Crowell et al., 2009). D'autres auteurs suggèrent plutôt que la sécrétion des CSC à la membrane plasmique est bloquée (Gutierrez et al., 2009). Ils s'accordent en revanche pour dire que l'absence des FP-CESA

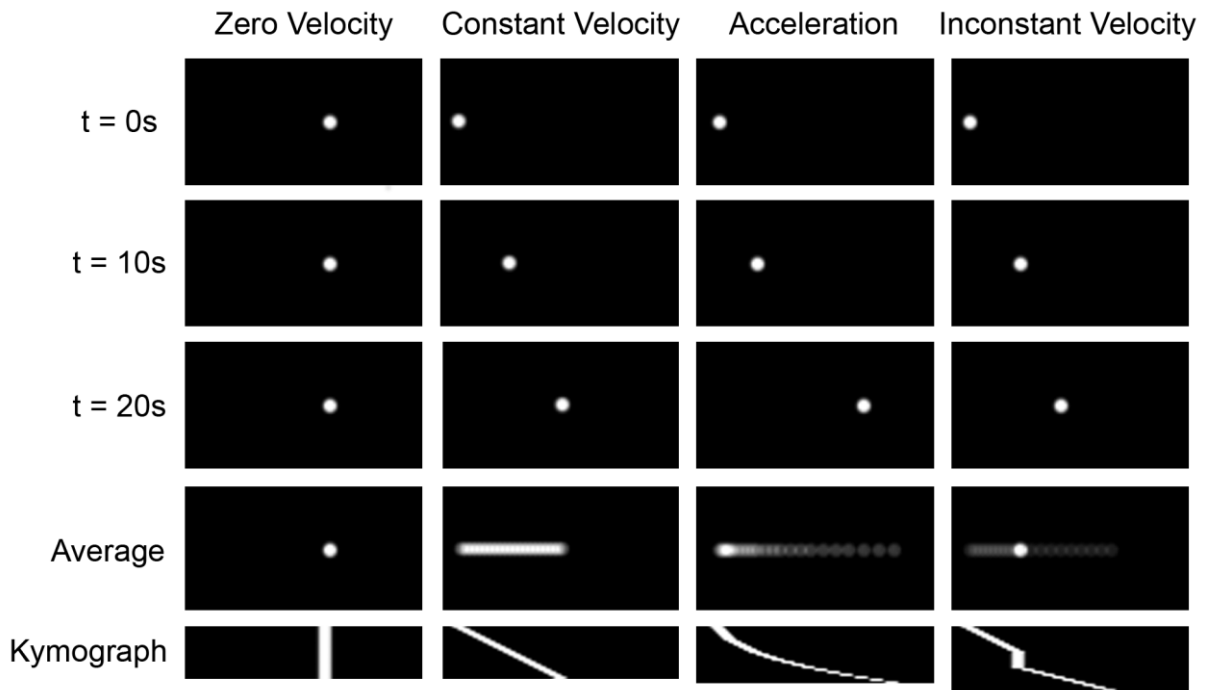


Figure 39. Méthode d'interprétation des kymographes

Cas théoriques de déplacement de particules observées par microscopie confocale à spinning disk. Dans le premier cas, la particule est immobile, la moyenne de toutes les images du film (projection temporelle) est donc un unique point. Le kymographe représente son déplacement au cours du temps : un trait vertical est observé. Dans le cas d'une particule qui se déplace avec une vitesse constante, le kymographe présente une pente constante. Si la particule accélère au cours du temps, le kymographe présentera une courbe. Enfin dans le cas d'une particule présente des changements abrupts de vitesse, la pente du kymographe présentera des changements d'angle. Issu de Crowell et al. (2009)

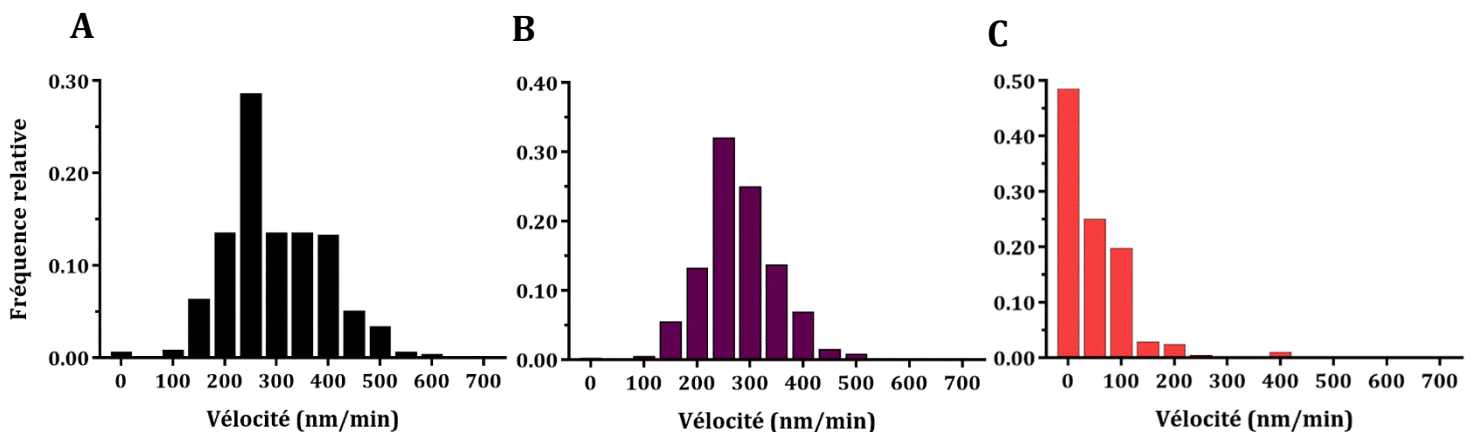


Figure 40. La vitesse des CSC diffère selon les traitements

L'analyse des kymographes à l'aide du logiciel Image J permet de calculer la vitesse des GFP-CESA3. La vitesse de plus de 210 particules par conditions a été mesurée pour au moins trois plantes différentes. L'histogramme de distribution des vitesses calculées est représenté pour les traitements de 5h de DMSO (A), 5h d'Hypostuntine 50 μM (B) et 1h30 de DCB 5 μM (C).

à la membrane plasmique reflète une absence de CSC contenant ces FP-CESA et qu'il y a donc une diminution voire une absence de polymérisation des microfibrilles de cellulose.

Pour le traitement DCB, la projection temporelle des séries d'images présente des points alignés plus denses que dans les cas de l'Isoxabène, le C17, le CGA et la Thaxtomine A mais moins denses que dans le cas du DMSO (Figure 38B). Le kymographe présente des pentes à la verticale (Figure 38C), ce qui est caractéristique des particules qui sont à l'arrêt (Figure 39). Enfin, la mesure des vitesses des GFP-CESA3 montre que ces derniers sont quasiment immobiles : la vitesse moyenne est de 51 ± 60 nm/min après 1h30 de traitement au DCB 5 μ M (Figure 40C). Le déplacement du CSC étant corrélé avec la polymérisation, on peut en déduire que le DCB stoppe la polymérisation des microfibrilles de cellulose.

En conclusion le classement des CBI réalisé par DeBolt et al. est vérifié par l'analyse de la dynamique des CSC (Brabham, DeBolt, 2013 ; Tatenno et al., 2016). L'Isoxabène, le C17, le CGA et la Thaxtomine A appartiennent au premier groupe de CBI qui provoque une disparition des GFP-CESA3 de la membrane plasmique et une accumulation dans les SmaCC/MASC tandis que le DCB, du deuxième groupe, immobilise les GFP-CESA3 à la membrane plasmique. Ces effets apparaissent clairement après quelques heures de traitements ce qui laisse à penser que la perturbation des CSC par les CBI est un effet primaire des traitements. Par contre, l'Hypostuntine n'engendre aucune modification de la localisation ou de la dynamique des GFP-CESA3. Dans le manuscrit sur l'Hypostuntine, on a montré que l'Hypostuntine change en fait l'orientation des CMT et des trajectoires de GFP-CESA3. Il n'est donc pas classable parmi les CBI classiques.

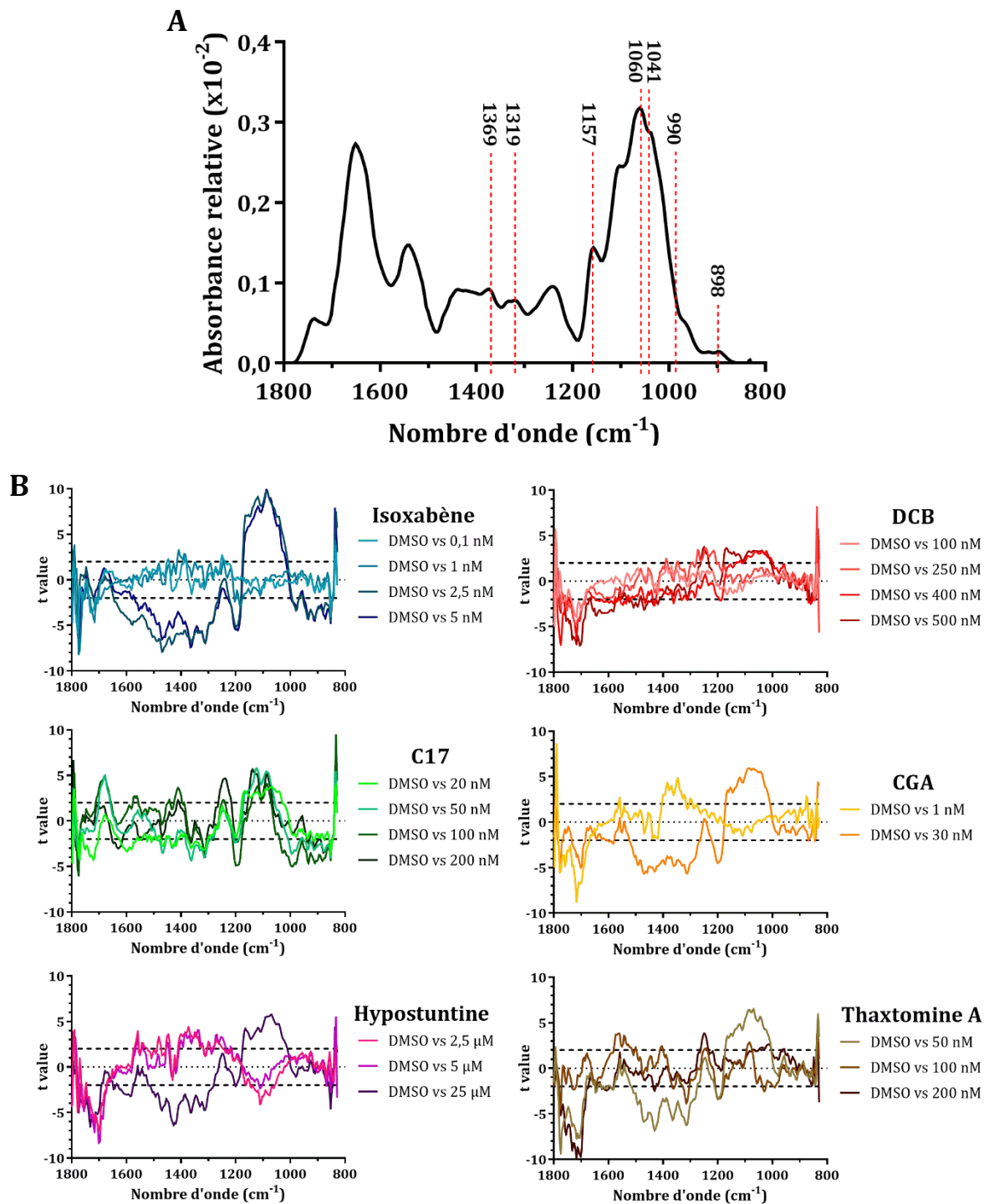


Figure 41. La paroi des plantules traitées avec des doses croissantes de CBI ont une composition et/ou une structure altérée

L'analyse des spectres d'absorbance relative normalisés en FT-IR d'hypocotyles de plantules de 4 jours cultivées à l'obscurité en présence des différents CBI permet de mettre en évidence des changements de structure et/ou de composition de la paroi. (A) Exemple de moyenne des spectres correspondant au contrôle DMSO. L'axe des abscisses représente le nombre d'onde (inverse de la longueur d'onde, en cm^{-1}). Les nombres d'ondes généralement assignés à la cellulose sont indiqués (pointillés rouges) (Mouille et al. 2003) (B) Résultats des t-tests pour chaque CBI : les t-values sont représentées pour les comparaisons entre les spectres moyens du DMSO et ceux des autres traitements. Les lignes en pointillés noirs représentent les seuils à partir desquels une significativité est assurée à 95% de confiance. Dans ce cas, les valeurs positives indiquent une plus forte absorption dans le contrôle DMSO que pour la condition traitée et inversement pour les t-values négatives.

2.2.3. Mise en évidence des modifications pariétales engendrées par les CBI avec la micro-spectroscopie FT-IR

Pour étudier l'impact global des CBI sur la composition et/ou la structure de la paroi, des spectres d'absorption d'hypocotyles de plantules cultivées à l'obscurité sont obtenus par micro-spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR). Cette technique permet de collecter des données d'absorption IR sur un spectre large de longueurs d'ondes. L'absorption de la lumière IR va dépendre pour des molécules organiques du type de liaison qui les compose. Ainsi, en analysant les spectres FT-IR de paroi, on peut obtenir des informations sur sa composition et/ou sa structure. Chaque polymère pariétal étant composé de liaisons chimiques différentes, il possède une signature spectrale qui lui est propre. Néanmoins, de nombreuses liaisons sont communes aux différents polysaccharides ce qui peut rendre la lecture des spectres FT-IR assez complexe. Il a toutefois été montré que l'on pouvait détecter des déficiences en cellulose de mutants d'*Arabidopsis thaliana* avec cette approche et les distinguer d'autres mutants par exemple affectés dans l'organisation du cytosquelette ou des xyloglucanes (Mouille et al., 2003 ; Robert et al., 2004). En effet, plusieurs nombres d'ondes peuvent être associés à l'absorbance de la cellulose (Figure 41A). On retrouve ainsi les liaisons CH₂ qui absorbent à 1369 et 1319 cm⁻¹, la liaison glycosidique C-O-C à 1157 cm⁻¹, les liaisons C-O-C et C-C au sein des cycles de glucose à 1060 et 1037 cm⁻¹ et les liaisons entre monomères à 990 et 898 cm⁻¹. En ce qui concerne la zone de 1250 et 1600 cm⁻¹, plusieurs nombres d'ondes caractéristiques sont connus : 1369 et 1319 cm⁻¹ peuvent être associés à la liaison CH₂ de la cellulose, 1245 cm⁻¹ aux liaisons C-O des pectines. De plus, certains pics d'absorbance dans cette zone ont été identifiés lors de déficiences en cellulose sans pouvoir les associer aux polymères pariétaux (Mouille et al., 2003).

Les plantules ont été traitées 4 jours en présence des CBI, conditions comparables à celles présentées dans la publication de Mouille et al. (2003) et permettent d'obtenir des modifications pariétales détectables par FT-IR. Les gammes de concentrations utilisées permettent de déterminer les modifications pariétales qui sont dose-dépendantes. Les spectres d'absorbance d'une vingtaine de plantes sont analysés et normalisés pour chaque traitement, en accord avec les méthodes employées par Mouille et al. (2003). La moyenne de ces spectres d'absorbance relative permet de comparer les différentes conditions d'entre elles. Pour pouvoir comparer l'effet des CBI par rapport au contrôle, des tests statistiques sont réalisés. Les résultats des t-tests pour chaque nombre d'onde des spectres mettent en évidence les différences significatives entre les traitements aux CBI et le contrôle DMSO (Figure 41B). Les fortes concentrations d'Isoxabène mais aussi le CGA à 30 nM et l'Hypostuntine à 25 µM ont des profils très similaires. Dans ces conditions, des différences significatives sont observées par rapport au contrôle : les t-value sont positives entre 1050 et 1150 cm⁻¹ indiquant une perte d'absorbance par rapport au témoin DMSO et négatives entre 1250 et 1600 cm⁻¹ indiquant une plus forte absorbance par rapport au DMSO. La perte d'absorbance entre 1050 et 1150 cm⁻¹ peut s'expliquer par la déficience en cellulose dont les pics d'absorption se situent surtout dans cette zone. Ces drogues perturbent fortement

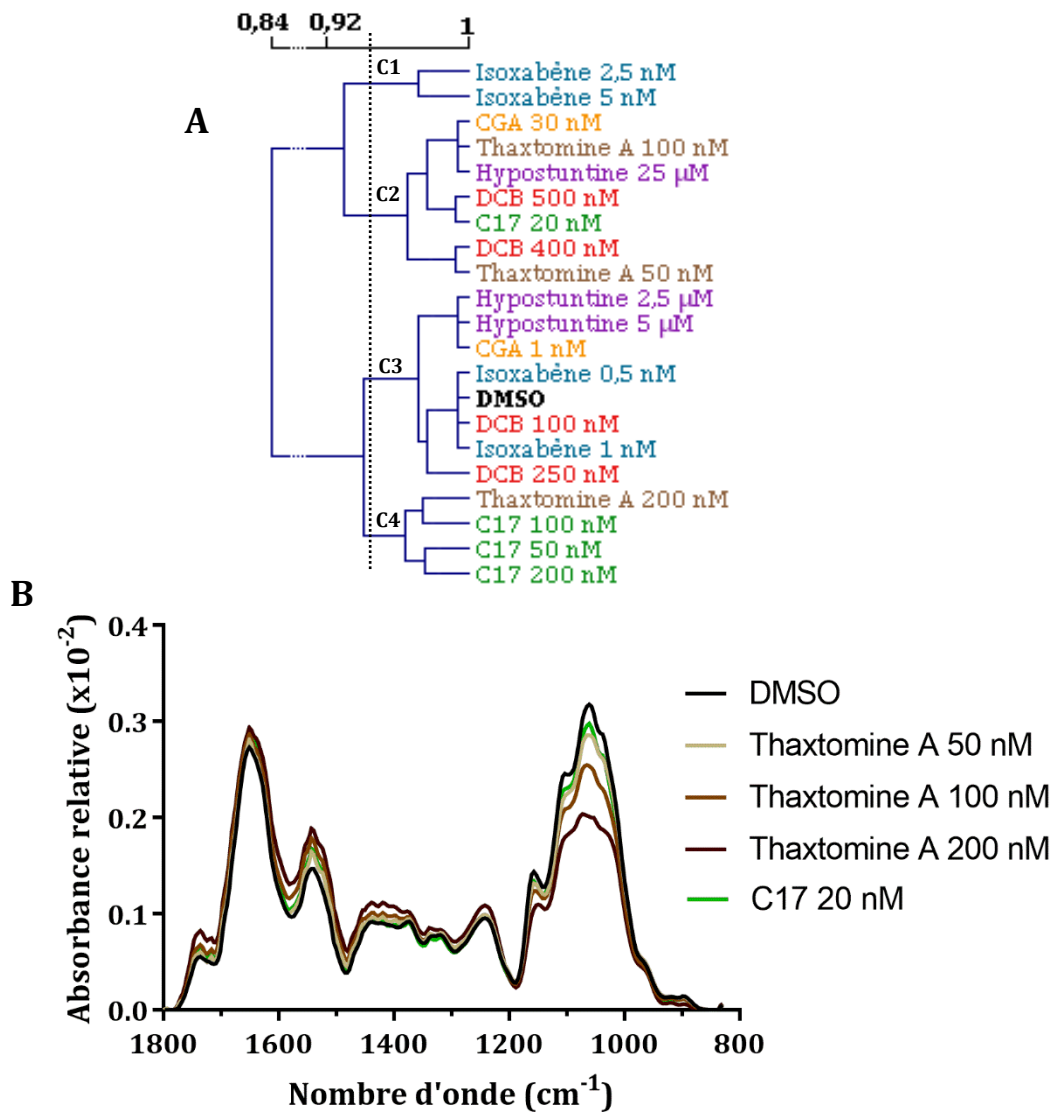


Figure 42. Le C17 n'impacte pas la paroi de la même façon que les autres CBI

Afin de classer les différents traitements CBI, un regroupement hiérarchique HCL par la méthode du « complete linkage » permet l'identification de 4 clusters dénommés C1, C2, C3 et C4. (A) Le dendrogramme représente le résultat de ce regroupement hiérarchique. Un seuil arbitraire (ligne noire) est appliqué au dendrogramme pour identifier les clusters. Les plantules traitées avec de fortes concentrations en CBI se retrouvent dans le cluster C2 tandis que celles traitées avec de faibles concentrations sont regroupées avec le DMSO dans le cluster C3. Les plantules traitées avec de l'Isoxabène à forte concentration constituent le cluster C1 tandis que les plantules traitées avec le C17 sont regroupées dans le cluster C4. (B) Moyennes des spectres obtenus lors d'une seconde expérience pour confirmer l'impact de la Thaxtomine A à 200 nM et du C17 à 20 nM. Les autres conditions de traitement à la Thaxtomine A ont aussi été répétées pour mettre en évidence l'effet progressif du CBI sur la paroi (perte d'absorbance pour la gamme de nombres d'ondes correspondants à la cellulose).

l'organisation pariétale à fortes concentrations et notamment la cellulose alors que quasiment aucune différence significative n'est observée pour les concentrations faibles. En ce qui concerne la Thaxtomine A, il est toutefois surprenant que le traitement à 200 nM n'est pas entraîné d'effet significatif alors que c'est le cas à 50 nM (malgré une altération de croissance observée). Les traitements aux DCB conduisent quant à eux à peu de différences significatives : une légère diminution de l'absorbance est significative dans la zone de 1050 à 1150 cm^{-1} (avec une t-value > 2) pour les concentrations élevées de DCB par rapport au DMSO. Enfin, la majorité des traitements C17 présentent des profils différents des autres CBI. Seul le traitement à 20 nM de C17 est proche des profils concernant les concentrations fortes d'Isoxabène, CGA et Hypostuntine.

Pour permettre la classification fine de tous ces traitements les uns avec les autres, un regroupement hiérarchique HCL basé sur la moyenne des spectres d'absorbance relative a été réalisé (Figure 42A). Un seuil arbitraire a été appliqué au dendrogramme pour identifier 4 clusters nommés C1, C2, C3 et C4. Ces regroupements confirment ce qui a été observé précédemment. En effet, les plantules traitées avec de fortes concentrations se retrouvent dans le cluster C2 pour la majorité des CBI et se différencient alors bien des concentrations plus faibles, regroupées avec le témoin DMSO dans le cluster C3. Les plantules traitées avec de fortes concentrations en Isoxabène possèdent des spectres avec une absorbance relative encore plus forte que les autres dans la zone de 1050 à 1150 cm^{-1} et constituent alors le cluster C1. Il est curieux de noter que les plantules traitées avec 200 nM de Thaxtomine A sont regroupées en dehors du cluster similaire au DMSO, avec les plantules traitées avec de fortes concentrations en C17 (le cluster C4). Le C17 semble donc impacter de manière différente l'organisation de la paroi.

Une autre expérience a été menée avec les traitements DMSO, C17 20 nM et Thaxtomine 50, 100 et 200 nM afin de confirmer l'effet de la Thaxtomine. Les moyennes des spectres d'absorbance relative obtenues présentent des différences avec la première expérience (Figure 42B). Cette fois, les traitements Thaxtomine A engendrent tous des absorbances relatives plus faibles que le contrôle dans la zone de 1050 à 1150 cm^{-1} (caractéristique d'une déficience en cellulose) avec un effet dose-dépendant. Ces résultats confirment qu'il y a bien eu un problème d'expérimentation pour le traitement Thaxtomine à 200 nM dans la première expérience. Le spectre moyen du traitement C17 à 20 nM est quant à lui beaucoup plus proche de celui du DMSO.

En conclusion, la micro-spectroscopie FT-IR permet de distinguer l'impact des CBI sur l'organisation de la paroi. Les polysaccharides pariétaux ayant des structures chimiques proches, l'analyse des spectres est difficile car plusieurs polymères peuvent absorber aux mêmes nombres d'onde. L'Isoxabène, le CGA, l'Hypostuntine et la Thaxtomine A semblent toutefois impacter la paroi de façon similaire en provoquant une déficience en cellulose lors de traitements longs. Pour le DCB, deux interprétations sont possibles : soit l'impact sur l'organisation pariétale n'est pas significatif (peu probable

vis-à-vis des travaux de Mouille et al. 2003 et Robert et al. 2004) soit les concentrations nécessaires pour les observer n'ont ici pas été suffisantes. Ce qui est plus intrigant en revanche c'est l'effet du C17 sur la paroi. Les spectres obtenus avec le C17 semblent différents des autres et la clustérisation hiérarchique les classe dans une catégorie distincte. Ceci suggère que les perturbations pariétales engendrées par C17 diffèrent clairement des autres CBI. Les analyses biochimiques des parois permettraient de mieux caractériser ces perturbations.

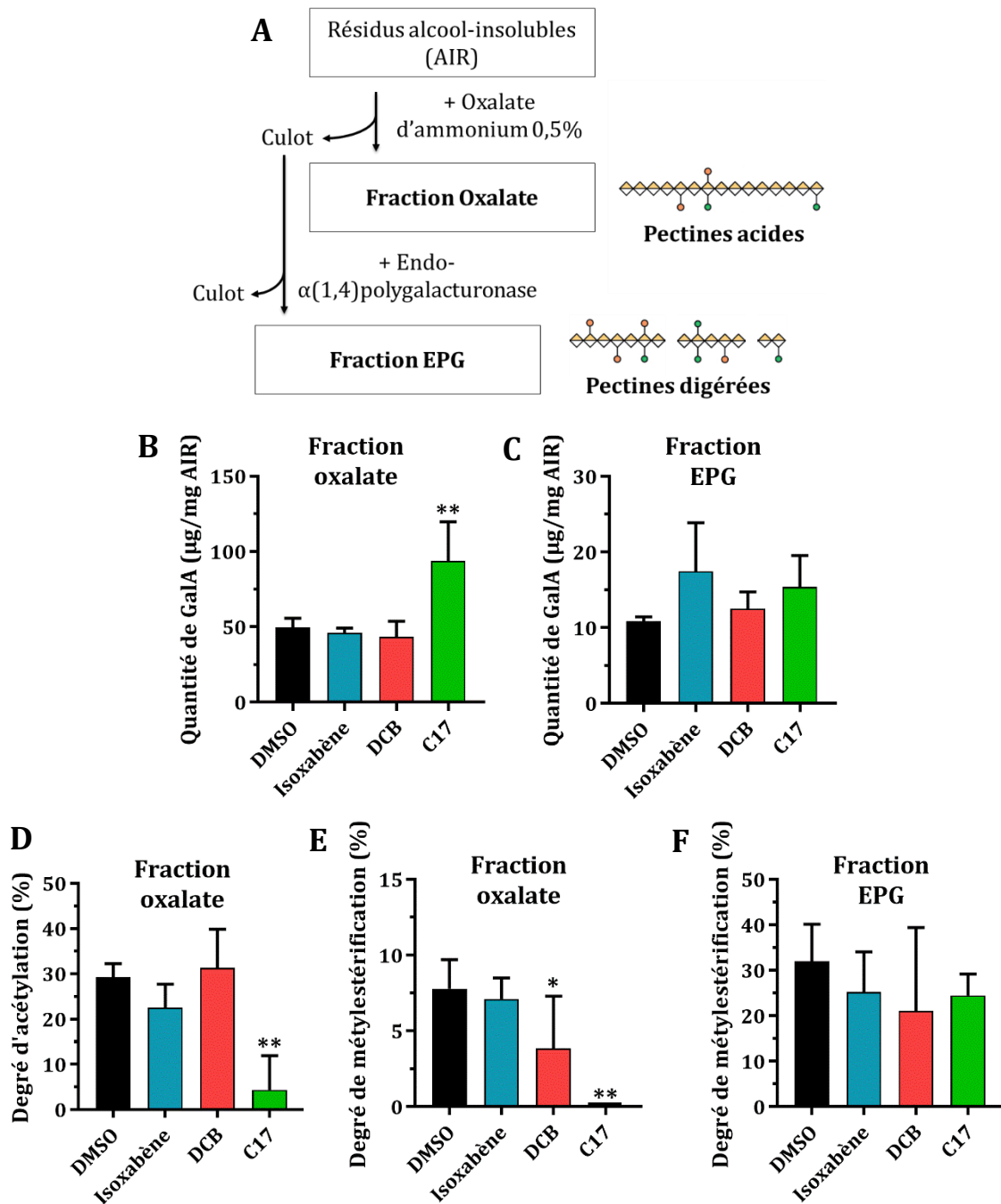


Figure 43. Les pectines acides sont modifiées par le traitement C17

Les pectines issues de plantules cultivées 4 jours à l'obscurité et traitées pendant 14h avec de l'Isoxabène 100 nM, DCB 5 μM , C17 50 μM et du DMSO (contrôle) ont été extraites. (A) Différentes populations de pectines sont extraites, tout d'abord par chélation à l'oxalate d'ammonium (pectines acides) puis par digestion avec des endo- $\alpha(1,4)$ -polygalacturonases (EPG). La quantité d'acides galacturoniques (GalA) a été dosée pour la fraction oxalate (B) et la fraction EPG (C). Le dosage des groupes méthyles et acétyles a permis la quantification du degré d'acétylation pour la fraction oxalate (D) et du degré de méthylestérification pour la fraction oxalate (E) et la fraction EPG (F). Les résultats des tests one-way ANOVA sont indiqués : pvalue < 0,05 (*) 0,01 (**).

2.2.4. Impact de certains CBI sur la structure des pectines et hémicelluloses

La paroi est une structure dynamique qui est constamment remodelée lors du développement de la plante et face aux différents stress qu'elle peut subir. Un traitement CBI entraîne généralement une déficience en cellulose ce qui va engendrer des remaniements auprès des autres composants pariétaux. Par conséquent j'ai étudié la composition des autres polysaccharides majeurs de la paroi primaire tels que les pectines (homogalacturonanes) et hémicelluloses (xyloglucanes) de plantules traitées.

2.2.4.1. Impact de certains CBI sur l'état de méthylestérification et d'acétylation des pectines

J'ai mené cette première étude seulement sur trois CBI qui sont l'Isoxabène, le DCB et le C17. Un dosage des acides uroniques ainsi que la détermination du degré de méthylestérification et d'acétylation de ces pectines ont été réalisés. Selon les procédures utilisées, différentes populations de pectines peuvent être extraites (Figure 43A). Tout d'abord, un traitement à l'oxalate d'ammonium à 0,5 % permet de récupérer les pectines les plus acides qui sont ainsi chélatées dans le surnageant. La digestion du culot de la première extraction par une d'endo- α (1,4)polygalacturonase (EPG) d'origine fongique va alors permettre d'extraire une seconde population de pectines. L'activité de l'EPG permet en effet de cliver les liaisons entre les résidus d'acide galacturonique (GalA) non méthylestérifiés. Ainsi, deux fractions de pectines extraites sont analysées.

Parmi les trois inhibiteurs testés, seul le C17 impacte la quantité de pectines extractibles par chélation à l'oxalate d'ammonium (Figure 43B) : l'application de C17 double la quantité de GalA dans cette fraction. En ce qui concerne la fraction EPG, aucune différence significative n'est observée entre les traitements au niveau de la quantité de pectines extraites (Figure 43C). Les plantules traitées au C17 présentent une diminution de 85% du degré d'acétylation des pectines acides issues de la fraction oxalate par rapport au DMSO (Figure 43D) et ces pectines sont également totalement déméthylestérifiées (Figure 43E). Le DCB entraîne aussi une réduction du degré de méthylestérification des pectines issues de la fraction oxalate mais cette réduction est moins importante que celle observée avec le traitement C17. En ce qui concerne la fraction EPG, aucune différence significative n'est mise en évidence entre les traitements au niveau du degré de méthylestérification (Figure 43F).

En conclusion, les dosages d'acides uroniques et la détermination des degrés de méthylestérification et d'acétylation des pectines de la fraction EPG ont permis de montrer que ces pectines n'étaient impactées par aucun des traitements CBI. Seules les pectines acides extraites par chélation à l'acétate d'ammonium montrent des différences ; le traitement au C17 engendre alors l'accumulation de pectines plus extractibles, très peu acétylées et pas du tout méthylestérifiées. Les plantules traitées avec les autres CBI seront bientôt également analysées de la même manière afin de voir si tous les CBI agissent différemment ou bien si on peut déterminer certaines classes de CBI.

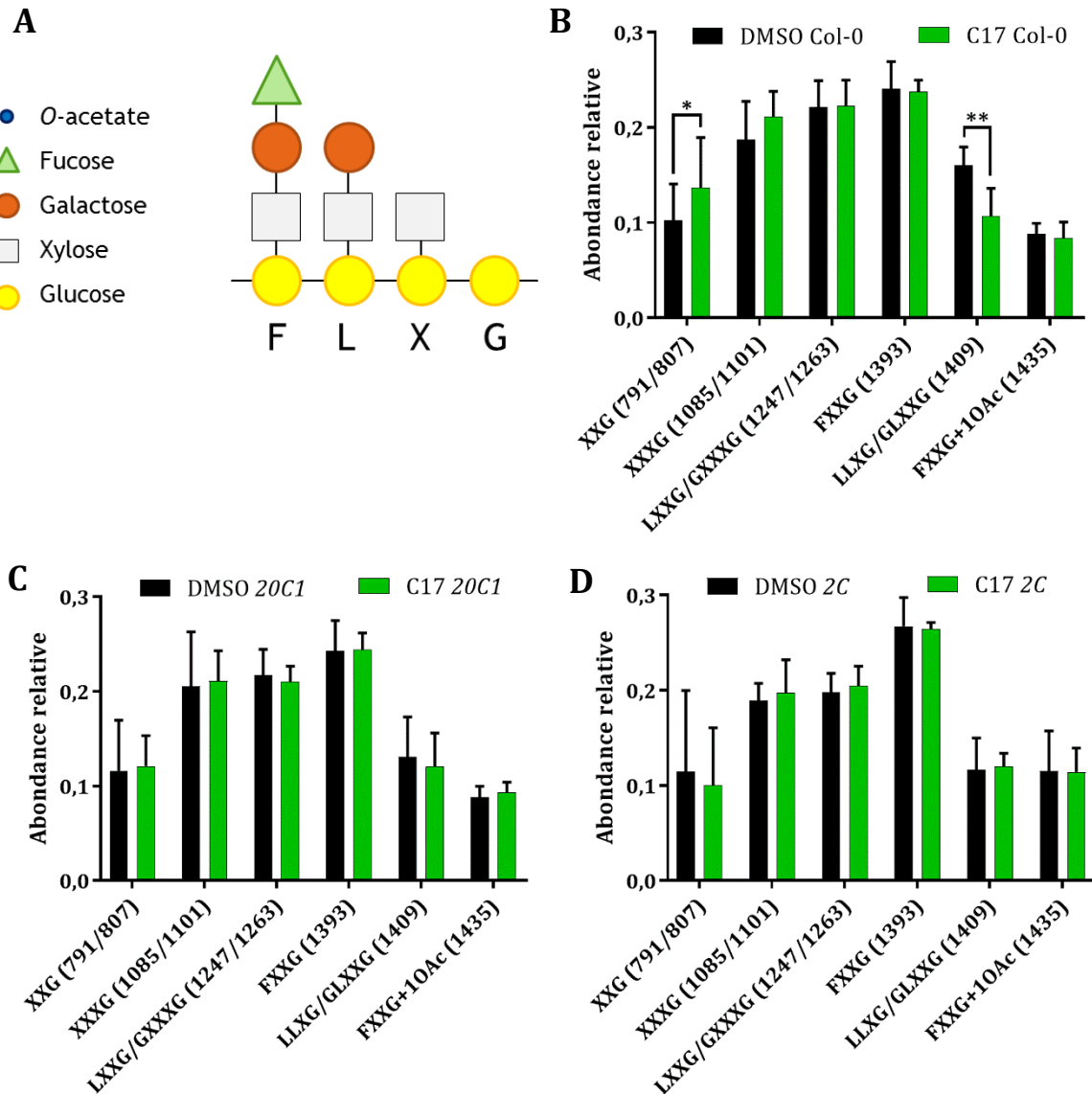


Figure 44. Effet du C17 sur la structure des xyloglucanes analysée par OLIMP

L’empreinte enzymatique des xyloglucanes d’hypocotyles issus de plantules cultivées 4 jours à l’obscurité et traitées pendant 14h avec du C17 50 μ M ou du DMSO (contrôle) a été analysée par spectrométrie de masse. (A) Schéma des différents motifs détectables par cette méthode. L’abondance relative de différents oligosaccharides libérés est présentée pour le sauvage Col-0 (B) et les mutants résistants au C17 *cesa1^{20C1}* (C) et *cesa3^{2C}* (D). Le rapport m/z est mentionné entre parenthèses pour chaque oligosaccharide analysé. Le rapport m/z à 1435 correspond à l’oligosaccharide de type FXXG avec un o-acetate. Les résultats des tests two-way ANOVA sont indiqués : p-value < 0,05 (*) 0,01 (**)

2.2.4.2. Impact du traitement C17 sur la structure des xyloglucanes

Les plantules traitées pendant 14h avec le C17 présentent des pectines très modifiées ce qui doit impacter l'organisation de la paroi. Les profils FT-IR associés au C17 étant différents des autres, on peut supposer que d'autres polymères pariétaux peuvent aussi impacter cette organisation. La composition des xyloglucanes, hémicelluloses majoritaires de la paroi, a donc été analysée en utilisant la méthode OLIMP (OLigo Mass Profiling) (Günl et al., 2011). Les plantules ont été digérées par des endo-cellulases et les oligosaccharides libérés ont été caractérisés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Plusieurs types de décorations des xyloglucanes peuvent alors être distingués par cette méthode (Figure 44A).

On observe pour les plantules traitées au C17, un enrichissement en oligosaccharides de type XXG et un appauvrissement de ceux de type LLXG/GLXXG par rapport aux plantules traitées au DMSO (Figure 44B). Puisqu'il y a moins d'oligosaccharides avec des décorations de fucose et de galactose mais plus d'oligosaccharides avec juste des xyloses, on peut penser que les xyloglucanes ont subi une défucosylation et une dégalactosylation suite au traitement C17. En ce qui concerne les mutants résistants au C17, *cesa1^{20C1}* et *cesa3^{2C}* (et le mutant *cesa1^{3D}* non montré ici), aucune différence significative n'est observée entre le traitement C17 et le contrôle DMSO (Figure 44C, et 44D). L'effet que semble avoir le CBI sur le sauvage est donc absent chez les mutants résistants.

Finalement, le traitement C17 semble remodeler aussi les xyloglucanes en entraînant la perte de certaines décorations. L'absence de ce remodelage pour les mutants résistants au CBI conforte l'idée que les perturbations engendrées par le C17 impactent également les xyloglucanes. Ces expériences seront répétées afin de confirmer les résultats et des marquages immunohistochimiques à l'aide d'anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques des xyloglucanes seront réalisées. Les plantules traitées avec les autres CBI seront également bientôt analysées par la méthode de l'OLIMP.

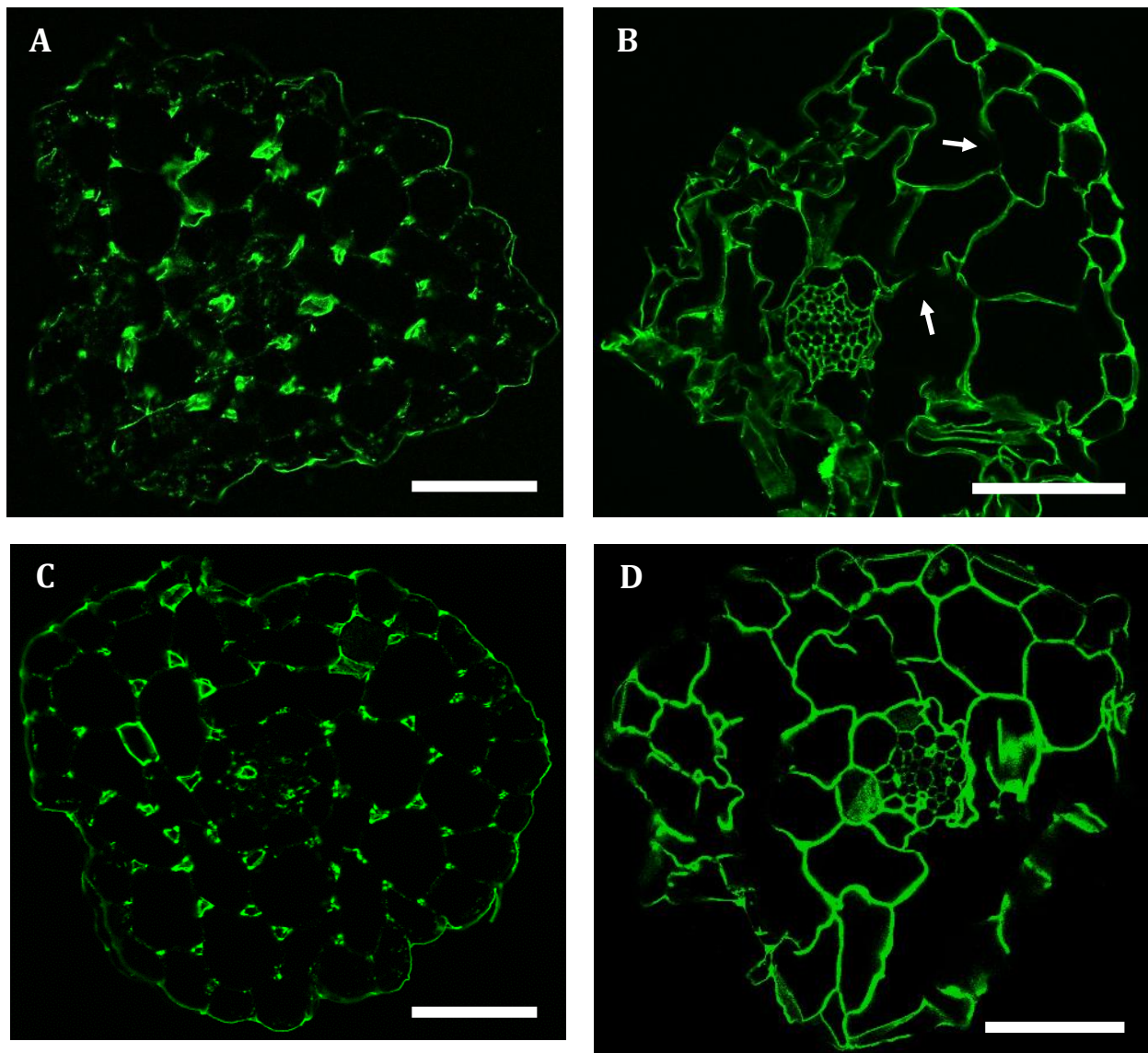


Figure 45. Une déficience en cellulose peut entraîner la déméthylestérification des pectines au niveau des parois de l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana*

Coupes optiques de microscopie confocale représentatives de coupes transversales d'hypocotyles de plantules sauvages Col-0 (A, C, D) ou du mutant *cesa6^{prc1-1}* (B), cultivées 4 jours à l'obscurité, incluses dans de la cire puis marquées avec l'anticorps JIM5 dirigé contre des épitopes d'homogalacturonanes ayant un faible degré de méthylestérification. La mutation *cesa6^{prc1-1}* (B) favorise la présence de pectines déméthylestérifiées au niveau des parois par rapport au témoin DMSO (A). Des absences de marquage pour *cesa6^{prc1-1}* correspondant à des parois incomplètes sont notifiées par des flèches blanches. Un traitement de 5h au DCB 5 μ M (C) ne montre pas de différence par rapport au contrôle tandis que le traitement de 5h d'Isoxabène à 100 nM (D) entraîne à l'inverse une déméthylestérification des pectines comme celle visualisée chez le mutant *cesa6^{prc1-1}*. La coloration et les contrastes ont été ajustés par traitement des images de microscopie. Barres d'échelle = 50 μ m

2.2.5. Etude immunohistochimique de l'impact des CBI sur l'état de méthylestérification des pectines

Une approche immunohistochimique a été entreprise afin de compléter l'approche biochimique qui nous a permis de mettre en évidence des différences au niveau de l'état de méthylestérification des pectines après traitement avec certains CBI. Une approche immunohistochimique permet de détecter plus localement les modifications de la composition pariétale. Des plantules cultivées à l'obscurité, âgées de 4 jours, ont été incubées pendant 5 heures avec les CBI ou avec du DMSO (contrôle). Ces traitements courts à de fortes concentrations ont été choisis en espérant qu'ils pourraient engendrer des modifications pariétales détectables à l'aide d'anticorps dirigés contre des épitopes très spécifiques de la paroi tout en évitant les effets secondaires des CBI causés par l'altération de croissance elle-même. Après le traitement, les plantes ont été rapidement fixées pour éviter tout remaniement pariétal ultérieur. Une étape d'inclusion a ensuite été réalisée pour obtenir des blocs de cire qui ont été découpés au microtome.

Une fois les coupes obtenues, elles ont été incubées avec différents anticorps qui détectent spécifiquement l'état de méthylestérification des pectines. Ces anticorps proviennent du laboratoire de Paul Knox. Il existe des anticorps qui sont capables de se lier à des pectines déméthylestérifiées et reconnaissent des zones de pectines partiellement déméthylestérifiées. C'est le cas de l'anticorps JIM5 (Knox et al., 1990 ; W G Willats et al., 2001). Un premier test a été réalisé avec des plantules sauvages Col-0 traitées avec 5 μ M de DCB, 100 nM d'Isoxabène ou le contrôle DMSO. Le mutant *cesa6^{prc1-1}* qui est déficient en cellulose et impacté au niveau de l'état de méthylestérification des pectines a été inclus dans cette analyse comme référence. Il a en effet été montré que les perturbations de la synthèse de cellulose pouvaient aussi modifier la composition en pectines (His et al., 2001 ; Peng et al., 2000 ; Mouille et al., 2003). Après le marquage avec JIM5, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire Alexa488 pour permettre de visualiser le marquage par fluorescence (Figure 45). Mes résultats montrent que la qualité des coupes n'est pas très bonne car il n'y a pas eu une préservation correcte des tissus. Ceci est difficile car ces organes sont gorgés d'eau et les cellules ont donc tendance à se plasmolyser lors de la fixation. On observe néanmoins que pour le contrôle DMSO (Figure 45A), le marquage est majoritairement aux arêtes entre les cellules, autour des méats. C'est en effet à cet endroit que l'on trouve beaucoup d'HG déméthylestérifiés responsables de l'adhésion cellulaire (William G.T. Willats et al., 2001). Le mutant *cesa6^{prc1-1}* (Figure 45B) présente une expansion radiale exagérée avec des cellules en cours de plasmolyse. Un marquage JIM5 est détecté au niveau des arêtes des cellules comme chez le témoin mais également tout le long des parois. Les parois du mutant *cesa6^{prc1-1}* semblent présenter donc une modification de l'état de méthylestérification des HG. Globalement, on y trouve donc plus de zones de pectines déméthylestérifiées. De plus, des absences de marquage JIM5 sont observables au niveau de certaines parois. Ceci est une caractéristique de ce mutant qui présente des parois incomplètes (Fagard et al., 2000). En ce qui concerne le traitement DCB (Figure 45C), toutes les

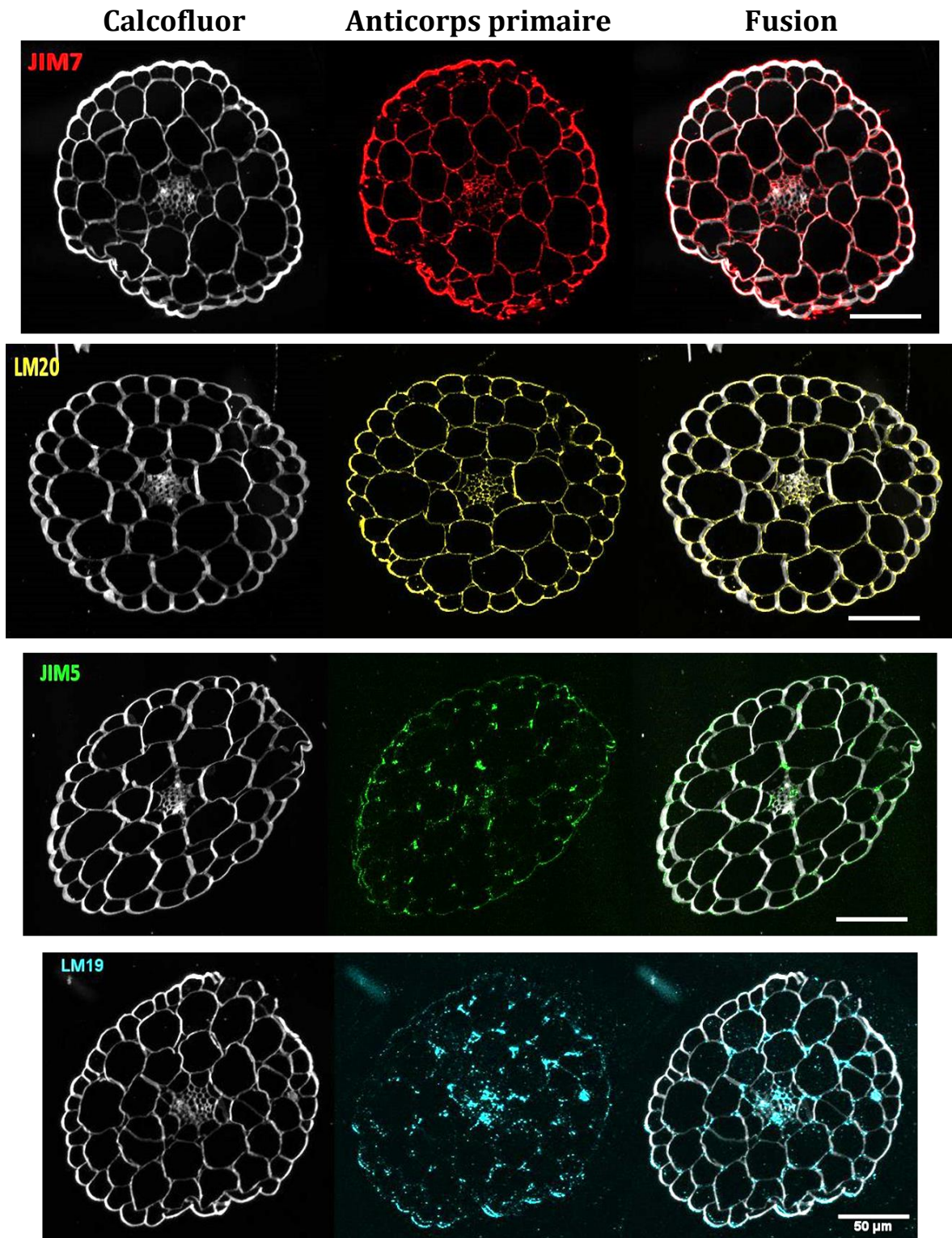


Figure 46. L'état de méthylestérification des homogalacturonanes peut être détecté à l'aide de différents anticorps

Coupes optiques de microscopie confocale représentatives de coupes transversales d'hypocotyles de plantules sauvages Col-0 cultivées 4 jours à l'obscurité et traitées au DMSO. Les coupes ont été incluses dans des blocs de résine LR White et marquées avec différents anticorps primaires dirigés contre les homogalacturonanes. JIM7 et LM20 interagissent avec les pectines ayant un degré de méthylestérification élevé tandis que JIM5 et LM19 reconnaissent des pectines à faible degré de méthylestérification. Chaque coupe est colorée également au Calcofluor pour permettre de visualiser les parois entières. La coloration et les contrastes ont été ajustés par traitement des images de microscopie. Barres d'échelle = 50 µm

images acquises ne montrent aucune différence visible de marquage JIM5 avec les images obtenues après le traitement DMSO. Seules les arêtes entre les cellules présentent un marquage, là où la majorité des HG sont déméthylestérifiés. Enfin, le traitement Isoxabène (Figure 45D) entraîne un marquage JIM5 très similaire à celui obtenu pour les hypocotyles du mutant *cesa6^{prc1-1}*. L'Isoxabène semble donc entraîner rapidement l'apparition d'épitopes d'HG faiblement méthylestérifiés. Ces résultats confirment les résultats obtenus par His et al. (2001) qui ont montré que le mutant *korrigan* (déficient en cellulose) présente des parois plus marquées avec l'anticorps JIM5 que les plantules sauvages.

J'ai souhaité ensuite améliorer le protocole afin d'obtenir des images de meilleure qualité et de pouvoir comparer les effets de tous les CBI sur l'état de méthylestérification puisque j'étais déjà capable de voir des différences entre les traitements DCB et Isoxabène. Au cours du premier protocole, j'avais utilisé comme fixateur le RCL2 (solution commerciale à base d'acide acétique et d'éthanol qui est vendue pour ses effets analogues au formaldéhyde mais qui n'est pas toxique). Lors de la fixation, les plantules sont d'abord soumises à un vide léger pour faciliter la pénétration du fixateur et ensuite, des phases de déshydratation avec des bains successifs d'éthanol sont réalisées avant d'inclure dans des blocs de cire les échantillons. Au cours de ma thèse j'ai fait varier différents paramètres du protocole comme le temps sous vide, le type de fixateur, les temps et le nombre de phases de déshydratation et de réhydratation afin d'obtenir une meilleure intégrité des tissus. Plusieurs protocoles ont d'ailleurs été publiés pour faire de l'histochimie de coupes d'hypocotyles de plantules étiolées mais les plantules étaient plus âgées (et donc moins fragiles) et ces plantules n'ont pas été traitées avec des CBI qui fragilisent les parois. En éliminant l'étape de vide pour la fixation des tissus, en rallongeant et multipliant les étapes pour la réhydratation et surtout en incluant les plantes dans de la résine LR White, j'ai pu d'obtenir des coupes où l'intégrité des tissus était bien mieux préservée (Figure 46).

En utilisant de la résine, les coupes peuvent être colorées avec du Calcofluor après l'incubation de l'anticorps secondaire, ce qui permet de visualiser rapidement l'intégrité des tissus et notamment l'état de la paroi en détectant un marquage cellulosique. Dans tous les cas, le marquage cellulosique est continu et correct (Figure 46). J'ai ensuite comparé les résultats des marquages obtenus avec les anticorps JIM5 et LM19 qui est l'anticorps du laboratoire de Paul Knox qui remplace maintenant JIM5. Il se lie de façon plus efficace aux HG non méthylestérifiés et à priori il reconnaît des régions moins méthylestérifiées que JIM5 (Verhertbruggen et al., 2009). Les marquages obtenus avec LM19 semblent plus précis que ceux obtenus avec JIM5 (Figure 46). Il y a en effet plus de marquages localisés le long de la paroi dans le cas de JIM19. Ensuite j'ai pu comparer les marquages JIM7 et LM20. JIM7 est utilisé depuis plusieurs années pour détecter les HG qui sont méthylestérifiés et cet anticorps n'est pas capable de se lier aux pectines déméthylestérifiées. Par contre, quand on augmente le pH, on déméthylestérifie les pectines et il a été remarqué que le marquage LM20 est perdu plus rapidement que JIM5. Cet anticorps doit être plus sensible pour détecter les zones contenant des HG

méthylestérifiés. Les images obtenues avec JIM5 et LM19 présentent le même type de marquage mais il semble que les marquages soient légèrement plus précis (plus de zones marquées) dans le cas de LM20. Le protocole a été très long à mettre en place, j'ai préparé des blocs contenant les plantules traitées avec les différents CBI pendant 14 heures avec de fortes concentrations mais les blocs n'ont pas pu encore être coupés.

En conclusion, j'ai pu mettre en place un protocole visant à détecter l'état de méthylestérification des pectines au niveau d'hypocotyles de plantules *d'Arabidopsis thaliana* cultivées 4 jours à l'obscurité. L'utilisation des anticorps dirigés contre les HG plus ou moins méthylestérifiés permettra de mieux caractériser les modifications pariétales engendrées par les CBI. Les résultats préliminaires montrent qu'un traitement à l'Isoxabène entraîne la déméthylestérification des HG alors que cela n'a pas été observé pour le traitement DCB. Après avoir analysé les blocs déjà préparés pour les autres CBI, il serait également intéressant de réaliser des coupes longitudinales d'hypocotyles pour mettre en évidence des différences de composition pariétale entre les parois transversales et longitudinales.

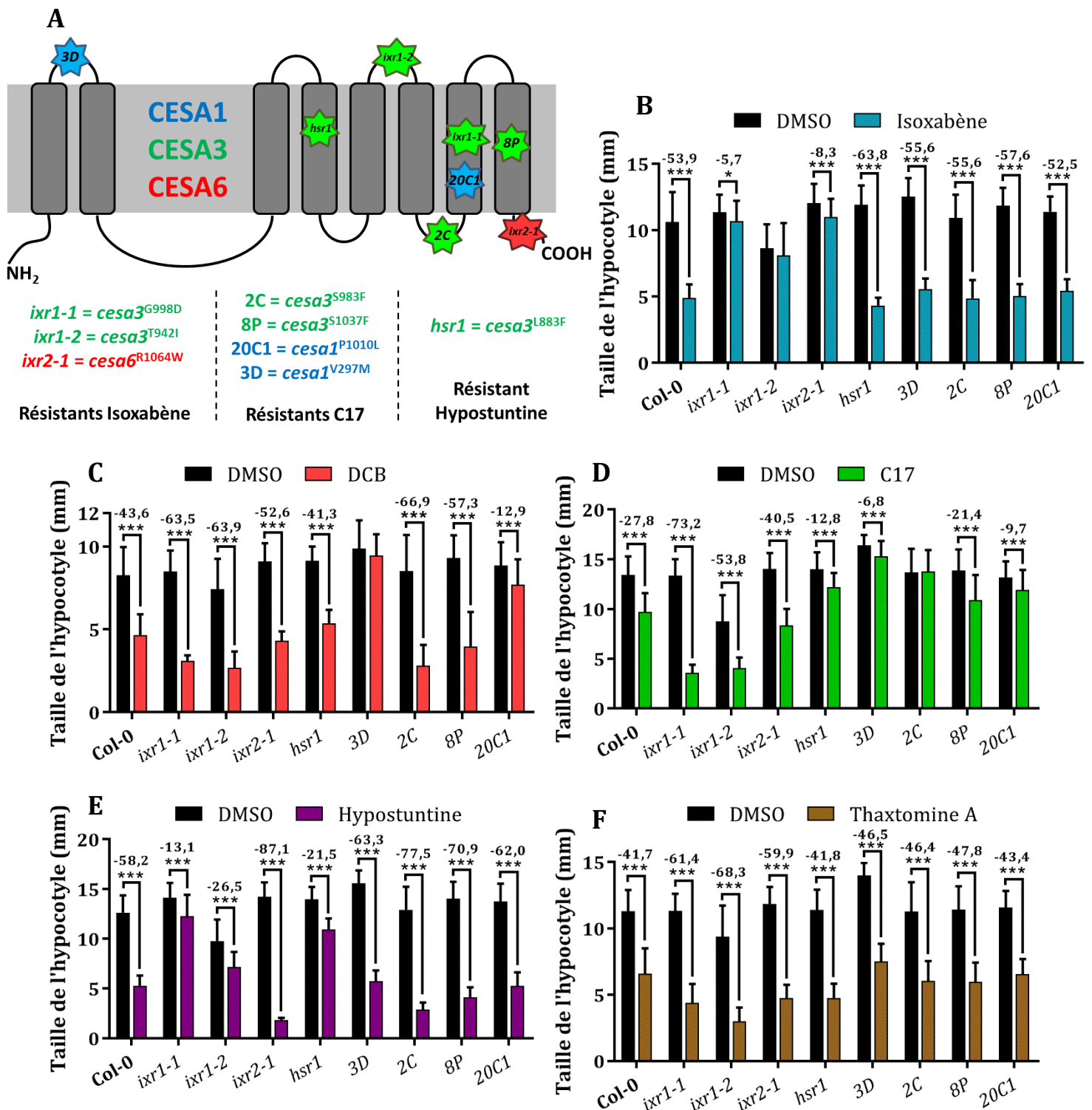


Figure 47. La résistance de mutants *cesa* aux CBI est dépendante de l'isoforme CESA mutée

Plusieurs mutations *cesa1*, *cesa3* et *cesa6* confèrent une résistance connue aux CBI. (A) Structure schématique d'une CESA avec la position des mutations *cesa* conférant des résistances aux CBI. Echelle non représentative. Les tailles moyennes des hypocotyles de ces mutants cultivés 4 jours à l'obscurité en présence d'Isoxabène 2 nM (B), DCB 350 nM (C), C17 100 nM (D), Hypostuntine 10 μ M (E) et Thaxtomine A 100 nM (F) ont été calculées. Pour chaque génotype étudié, le pourcentage d'inhibition de taille ainsi que les résultats des t-test sont indiqués : p-value < 0,05 (*) 0,001 (***). n > 50

2.3. Rôle des CESA de paroi primaire dans la résistance aux CBI

2.3.1. Tests de résistance croisés aux CBI de mutants *cesa*

Certains mutants *cesa* ont été isolés suite à leur résistance à des CBI (Figure 47A) (détails en Annexe 1). Ces mutations ne sont pas localisées à un seul endroit des CESA mais on peut noter qu'aucune des mutations n'est présente dans la grande boucle cytosolique contenant les sites catalytiques des CESA. La majorité des mutations se situe au niveau des domaines transmembranaires ou dans des régions très proches des domaines transmembranaires, soit du côté apoplastique soit du côté cytosolique. Certains CBI sont des herbicides efficaces à condition qu'ils soient déposés sur des plantes à de jeunes stades de développement. Par conséquent jusqu'à présent, seules des mutations au niveau des CESA de paroi primaire ont été isolées et confèrent des résistances aux CBI. Afin de mieux comprendre les modes d'action des CBI et de les comparer entre eux, des tests de résistances pour chaque CBI ont été réalisés avec les divers mutants identifiés comme résistants à l'une ou l'autre des drogues étudiées. Des plantules de 4 jours ont été cultivées à l'obscurité en présence des CBI et la taille moyenne des hypocotyles a donc été calculée pour chaque cas. La quantité de CGA au laboratoire n'étant pas suffisante pour réaliser ces tests de résistance, ils n'ont malheureusement pas pu être effectués dans le cadre de ma thèse.

En ce qui concerne le traitement Isoxabène à une concentration de 2 nM, la concentration utilisée est proche de l'IC₅₀: 53,9% d'inhibition de croissance est observée pour le sauvage (Figure 47B). Les mutants *cesa* connus pour être résistants à ce CBI sont *cesa3^{ixr1-1}*, *cesa3^{ixr1-2}* et *cesa6^{ixr2-1}*. On observe que la croissance de ces trois mutants est bien moins inhibée que celle des plantules sauvages par l'Isoxabène. Ainsi l'Isoxabène n'engendre aucune différence significative sur la taille des hypocotyles *cesa3^{ixr1-2}* comparée à celle obtenue lors du traitement contrôle DMSO. Pour *cesa3^{ixr1-1}* et *cesa6^{ixr2-1}*, l'inhibition de croissance est significative mais faible : elle est inférieure à 10%. La croissance des autres mutants *cesa* testés, qui sont résistants à l'Hypostuntine et au C17, est inhibée de la même manière que les plantules sauvages. Les mutants résistants à l'Hypostuntine et au C17 ne sont pas résistants à l'Isoxabène.

Le traitement DCB à une concentration de 350 nM cause une inhibition de la taille moyenne des hypocotyles de plantules sauvages Col-0 de l'ordre de 43,6% (Figure 47C). Aucun mutant *cesa* montrant une résistance au DCB n'a jusqu'alors été identifié. Or, on observe ici que deux mutants connus pour être résistants au C17, *cesa1^{20C1}* et *cesa1^{3D}*, sont aussi résistants au DCB. En effet, le mutant *cesa1^{3D}* est très résistant au DCB car il ne présente aucune différence significative de la taille moyenne d'hypocotyles lorsqu'il est traité avec du DCB comparé au traitement DMSO. Le mutant *20C1* quant à lui est inhibé que de 12,9% par le CBI ce qui est nettement inférieur à l'inhibition de croissance des autres mutants *cesa*. Ces derniers présentent en effet des réductions de croissance similaires à celles observées pour les plantules sauvages.

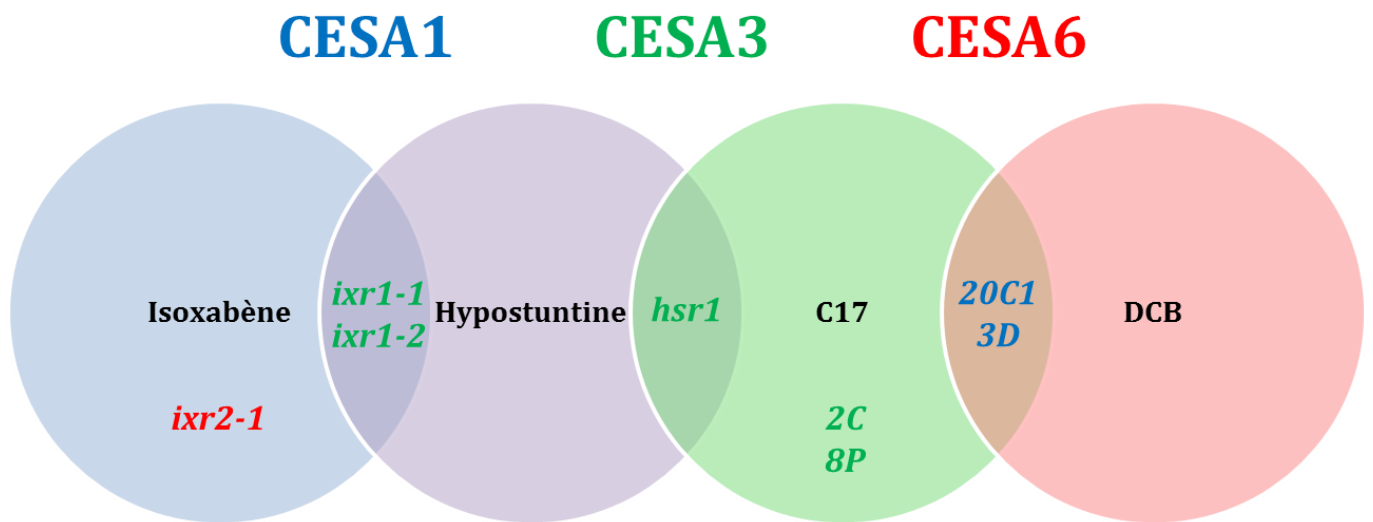


Figure 48. Bilan des tests de résistances croisés

Diagramme de Venn illustrant les résultats des tests de résistance de mutants *cesa* à différents CBI. Les noms des mutants sont figurés avec un code couleur lié à l'isoforme de CESA mutée (CESA1, CESA3 ou CESA6). Les mutants présents dans un cercle sont résistants à un CBI. Les mutants localisés à l'intersection de deux cercles sont résistants à deux CBI. On observe alors que la résistance aux CBI est dépendante de l'isoforme CESA présente dans le CSC.

Le traitement C17 à une concentration de 100 nM entraîne une légère inhibition de croissance : 27,8% par rapport au traitement DMSO. Les mutants résistants au C17 et testés lors de cette expérience sont : *cesa1^{20C1}*, *cesa1^{3D}*, *cesa3^{2C}* et *cesa3^{8P}*. Ils sont presque tous plus résistants que les plantes sauvages à l'exception du mutant *cesa3^{8P}* qui est tout de même impacté avec une réduction de taille de 21,4%. On remarque néanmoins que les mutants résistants à l'Isoxabène (*cesa3^{ixr1-1}*, *cesa3^{ixr1-2}* et *cesa6^{ixr2-1}*) sont hypersensibles au C17. Le mutant *cesa3^{hsr1}* résistant à l'Hypostuntine est de façon surprenante lui aussi résistant au C17 puisque la taille moyenne des hypocotyles des plantules traitées ne diminue que de 12,8% par rapport à celle obtenue pour le traitement témoin.

Le traitement Hypostuntine à une concentration de 10 µM inhibe la taille des hypocotyles des plantules sauvages de 58,2% (Figure 47E). Le mutant identifié pour sa résistance à l'Hypostuntine est *cesa3^{hsr1}*. On observe en effet que celui-ci n'a une réduction de la taille des hypocotyles que de 21,5%. De plus comme nous avons pu le montrer dans le manuscrit sur l'Hypostuntine, les mutants *cesa3^{ixr1-1}* et *cesa3^{ixr1-2}* présentent également une résistance au CBI. Ils ne présentent que des réductions de la taille moyenne des hypocotyles de 13,6% et 26,5% respectivement. En revanche, il est intéressant de noter que le mutant *cesa6^{ixr2-1}* qui est aussi résistant à l'Isoxabène est hypersensible à l'Hypostuntine avec une réduction de la taille moyenne des hypocotyles de 87,1% par rapport au traitement témoin.

Avec un traitement à 100 nM de Thaxtomine A, la croissance de Col-0 est réduite de 41,7% (Figure 47F). Si on compare la croissance des mutants *cesa* étudiés en présence de Thaxtomine A avec celle du sauvage, peu de différences apparaissent. Seuls *cesa3^{ixr1-1}* et *cesa3^{ixr1-2}* traités au CBI semblent légèrement plus inhibés avec respectivement 61,4% et 68,3% d'inhibition. Finalement, aucun mutant *cesa* n'a montré à ce jour de résistance à la Thaxtomine A.

En conclusion, plusieurs mutations des isoformes de CESA de paroi primaire confèrent des résistances à un ou plusieurs CBI (Figure 48). On constate que pour des mutants résistants à un même inhibiteur, la localisation des mutations est assez variée mais elles sont toutes proches des domaines transmembranaires. Au cours de mon travail, de nouvelles résistances ont pu être identifiées. Parmi les mutants résistants à l'Isoxabène, seuls ceux mutés dans *CESA3* sont aussi résistants à l'Hypostuntine. De la même manière, parmi les mutants résistants au C17, seuls ceux qui sont mutés dans *CESA1* sont aussi résistants au DCB. C'est un argument supplémentaire pour dire que les CESA auraient des rôles différents dans le CSC. Ces mutations pourraient permettre de changer les interactions entre les différentes CESA au niveau d'un même CSC. On peut alors imaginer que cela rendrait moins accessible le CBI au CSC : la liaison du CBI à sa cible potentielle au niveau du CSC serait alors inhibée.

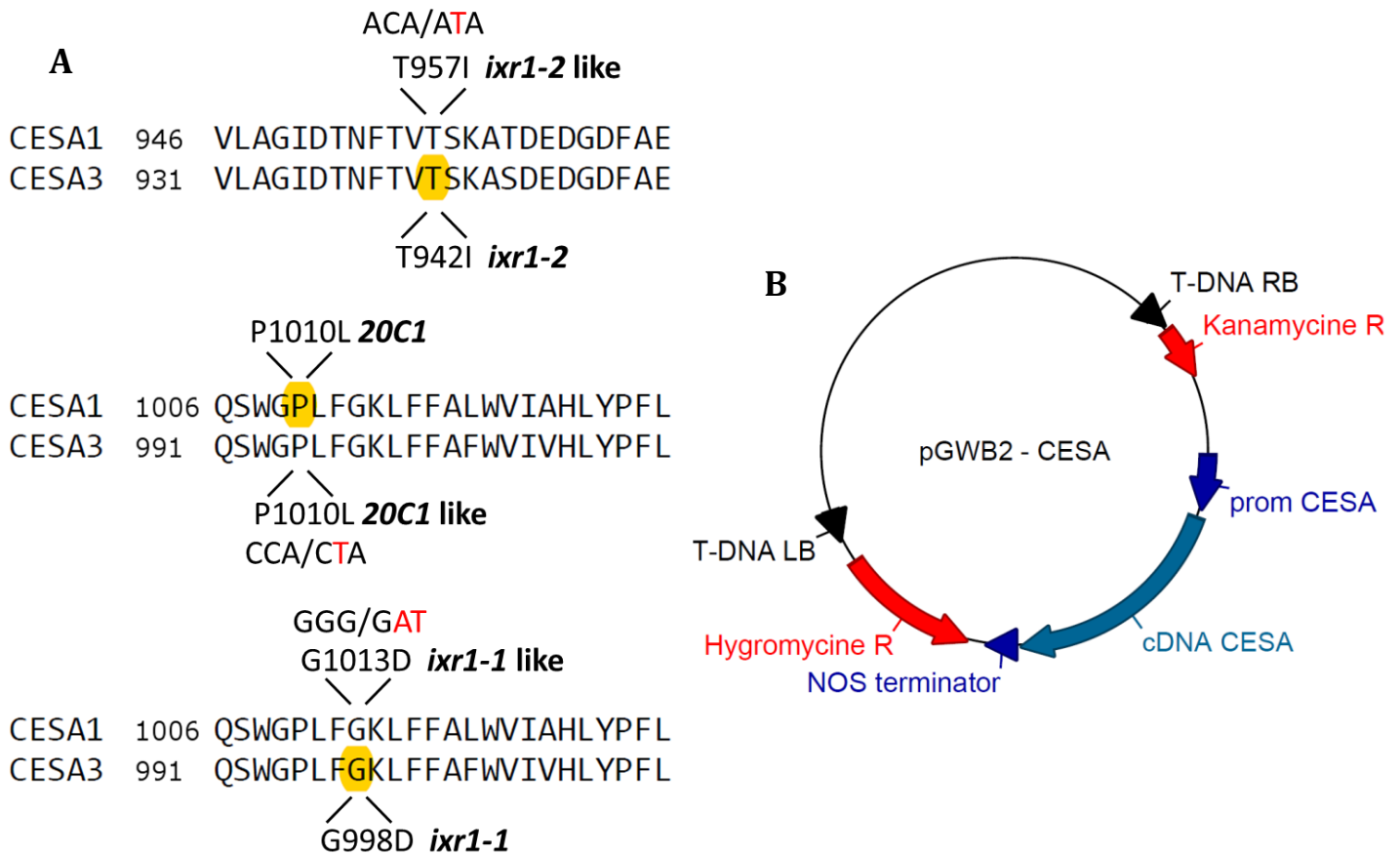


Figure 49. Stratégie de clonage pour l'obtention de nouvelles lignées *cesa3*^{20C1} like, *cesa1*^{ixr1-1} like et *cesa1*^{ixr1-2} like

Afin de transposer une mutation spécifique d'une isoforme vers une autre CESA, l'ADNc correspondant (*CESA1* ou *CESA3*) a été amplifié avec des amorces spécifiques pour recréer la mutation sélectionnée (principe de la mutagenèse dirigée). (A) Alignement de portions de séquences protéiques de *CESA1* et *CESA3*, contenant les trois mutations ponctuelles désirées (surlignées en jaune). Les nucléotides des ADNc modifiés sont en notés rouge et les nouveaux acides aminés modifiés sont indiqués. L'ADNc portant une mutation « *cesa-like* » est alors transféré dans un vecteur final (B) possédant le promoteur *CESA* correspondant à l'ADNc (vecteur pGWB2) et des gènes codant pour des antibiotiques permettant la sélection des plantes transformée

2.3.2. Nouvelles constructions génétiques pour mieux comprendre le rôle des CESA dans le mode d'action des CBI

Afin de mieux comprendre le rôle de chaque isoforme de CESA dans la réponse aux CBI, j'ai décidé de tester si en changeant l'isoforme mutée on pouvait conserver la résistance aux inhibiteurs. En produisant une CESA1 possédant soit l'équivalent de la mutation *cesa3^{ixr1-1}* soit l'équivalent de la mutation *cesa3^{ixr1-2}*, la question est de savoir si la résistance à l'Isoxabène et à l'Hypostuntine est conservée. De la même manière, en exprimant une CESA3 mutée d'une manière équivalente à *cesa1^{20C1}*, peut-on obtenir des plantes qui résistent à la fois au C17 et au DCB ?

Pour cela, j'ai réalisé de la mutagenèse dirigée (Figure 49). Des vecteurs pDONR207 contenant les ADNc de *CESA1* ou *CESA3* étaient disponibles au laboratoire. J'ai alors réalisé à partir de ces vecteurs des mutagenèses dirigées des *CESA*. Pour chaque construction, un couple d'amorces spécifiques contenant la mutation souhaitée a été utilisé (Figure 49A). Ensuite j'ai transféré cet ADNc muté par recombinaison homologue dans le vecteur gateway contenant le promoteur de *CESA* approprié (Figure 49B). En remplaçant ainsi un ou deux nucléotides dans la séquence de *CESA1* ou *CESA3*, j'ai alors obtenu des versions mutées *cesa-like*. Dans *CESA1* j'ai donc introduit des mutations *ixr1-1* et *ixr1-2 like* et dans *CESA3*, des mutations *20C1-like*.

Ces constructions ont été ensuite introduites dans les fonds mutants faibles *cesa3^{je5}* et *cesa1^{rsw1-10}* (voir Figure 29 , partie 1.4). Ces deux fonds génétiques ont déjà été utilisés pour introduire les GFP-CESA3 dans *cesa3^{je5}* et GFP-CESA1 dans *cesa1^{rsw1-10}* et les tests de complémentation ont permis de montrer que les constructions étaient fonctionnelles ; ce qui nous permettrait dans un deuxième temps d'étudier aussi la localisation de protéines mutées « *cesa-like* » en ajoutant une protéine fluorescente. L'idéal serait d'utiliser en théorie des mutants nuls *cesa1* et *cesa3* à l'état hétérozygote (non létal) pour introduire ces constructions mais toutes les tentatives de complémentation avec des protéines fusions pour ces fonds génétiques dans notre laboratoire ont échoué.

Les graines des plantes de seconde génération après transformation viennent d'être récoltées. La descendance de ces plantes va être ressemée de façon à sélectionner des plantes homozygotes pour la mutation *cesa1^{rsw1-10}* ou la mutation *cesa3^{je5}*. Les premiers tests de résistance seront alors effectués et permettront de comprendre si chaque isoforme mutée « *cesa-like* » peut conférer la résistance au CBI étudié ou bien si elle a un rôle particulier au sein du CSC. Si il s'avère possible d'obtenir des plantes « *cesa-like* » résistantes, la création de plantes transgéniques exprimant des CESA doublement mutées sera envisagée afin d'obtenir des plantes résistantes à la fois au C17, au DCB, à l'Isoxabène et à l'Hypostuntine.

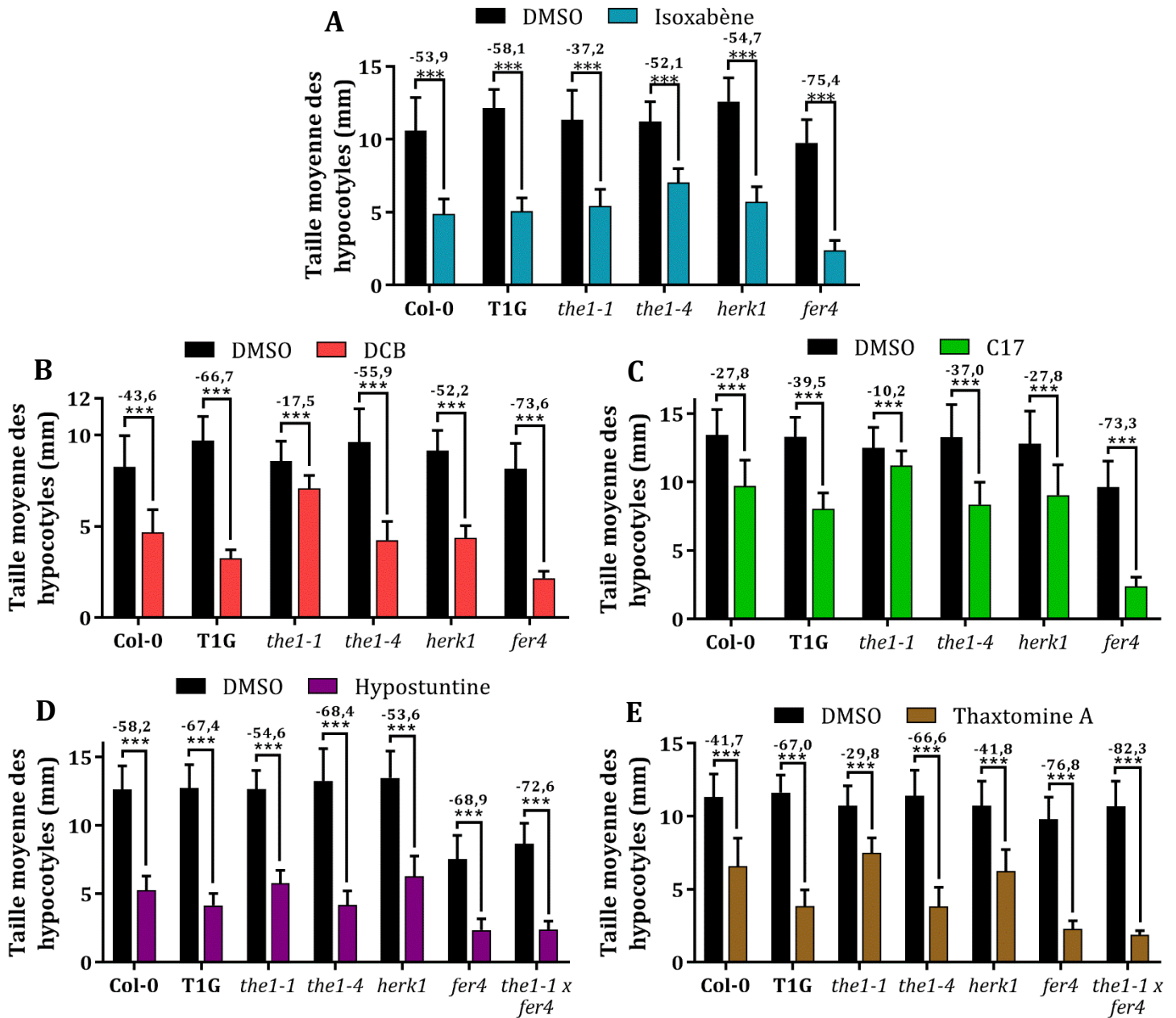


Figure 50. La perception des perturbations engendrées par les CBI dépend de la présence de certains récepteurs CrRLK1

Les tailles moyennes des hypocotyles de plantules sauvages, mutantes affectées dans des récepteurs CrRLK1 ou de plantules surexprimant THESEUS1 (THE1) cultivées 4 jours à l'obscurité en présence d'Isoxabène 2 nM (B), DCB 350 nM (C), C17 100 nM (D), Hypostuntine 10 µM (E) et Thaxtomine A 100 nM (F) ont été calculées. Pour le récepteur THESEUS1 (THE1) : *the1-1* engendre une perte de fonction de la protéine, *the1-4* un gain de fonction et la construction *p35S::THE1-GFP* (T1G) surexprime la protéine. Les mutations *herk1* et *fer4* entraînent la perte de fonction des récepteurs HERCULES1 (HERK1) et FERONIA (FER). Pour chaque génotype étudié, le pourcentage d'inhibition de taille ainsi que les résultats des t-test sont indiqués : p-value < 0,001 (***) . n > 50

2.4. Perception et voies de signalisation associées aux CBI

2.4.1. Tests de résistance de mutants affectés pour certains récepteurs

Pour déterminer les récepteurs qui peuvent être impliqués dans la perception des modifications pariétales engendrées par les CBI, des tests de résistance de différents mutants affectés dans des récepteurs ont été entrepris. Le récepteur *CrRLK1 THESEUS1* (THE1) a été mis en évidence pour son rôle dans le contrôle de l'intégrité pariétale lors d'une déficience en cellulose. Sa présence permet de stopper la croissance du mutant *cesa6^{prc1-1}* (Hématy et al., 2007). De plus, les travaux récents de Gonneau et al. (2018) montrent que certains éléments de réponse engendrés lors de l'interaction de THE1 avec le peptide RALF34 dépendent de la présence d'un autre *CrRLK1*, FERONIA (FER). Comme décrit précédemment dans l'introduction, FER est au centre de nombreux complexes de récepteurs et joue un rôle majeur dans la croissance. Un autre *CrRLK1*, HERCULES1 (HERK1) est exprimé dans l'hypocotyle et contribue comme THE1 à réguler l'expansion cellulaire (Guo et al., 2009). Les mutants affectés dans ces différents récepteurs ont été cultivés en présence de CBI pendant 4 jours à l'obscurité et les longueurs des hypocotyles ont ensuite été mesurées. La mutation *the1-1* engendre une perte de fonction de la protéine alors que la mutation *the1-4* entraîne un gain de fonction (Merz et al., 2017). La construction *p35S::THE1-GFP* (T1G) surexprime la protéine THE1 (Hématy et al., 2007). Les mutants *herk1* et *fer4* entraînent la perte de fonction des récepteurs HERK1 et FER.

En ce qui concerne le traitement Isoxabène à une concentration de 2 nM, on observe que tous les génotypes ont une taille moyenne des hypocotyles réduite par rapport au témoin DMSO (Figure 50A). Cependant le mutant *the1-1* semble moins inhibé par l'Isoxabène avec 37,2% de réduction de la taille comparé à une réduction de 53,9% du sauvage Col-0. Ainsi tout comme pour la déficience en cellulose engendrée par *cesa6^{prc1-1}*, la perte de fonction du récepteur THE1 limite l'inhibition de croissance (Hématy et al., 2007). Il est cependant plus surprenant que les plantules *the1-4* et T1G ne soient pas plus inhibées par l'Isoxabène. A l'inverse, le mutant *fer4* est hypersensible à l'Isoxabène puisqu'il atteint 75,4% d'inhibition. Le récepteur HERK1 ne semble pas être impliqué dans la signalisation induite par l'Isoxabène.

Pour le traitement DCB à une concentration de 350 nM, une inhibition significative de la taille de l'hypocotyle est observée pour tous les génotypes (Figure 50B). Là encore, des différences sont observables uniquement pour des génotypes liés aux récepteurs THE1 et FER. En effet, le mutant *the1-1* est bien moins impacté avec seulement 17,5% d'inhibition de croissance comparé à 43,6% d'inhibition des plantules sauvages. Cette fois, le surexprimeur de THE1 (T1G) et le mutant *fer4* sont plus impactés avec respectivement 66,7% et 73,6% de réduction de la taille des hypocotyles. Comme pour l'Isoxabène, on peut en déduire que THE1 participe à la perception du stress lié au DCB tandis que FER a un rôle antagoniste et que HERK1 ne joue aucun rôle.

Pour le traitement au C17 à une concentration de 100 nM, il est clair que la taille des hypocotyles des mutants *the1-1* est moins réduite que celle des plantules sauvages avec seulement 10,2% d'inhibition contre 27,8% pour Col-0 (Figure 50C). De même, le mutant *fer4* est beaucoup plus impacté avec 73,3% de réduction de la taille. Les lignées *the1-4* et T1G THE1 sont légèrement plus impactées par le CBI avec perte de croissance de l'ordre de 40%. Encore une fois, THE1 participerait à la perception des effets du DCB alors que la perte de fonction de FER les aggrave et que HERK1 n'a pas d'effet visible.

Le traitement avec de l'Hypostuntine à une concentration de 10 µM quant à lui inhibe de façon significative la croissance de tous les génotypes (Figure 50D). Les différences avec Col-0 sont moins marquées que pour les CBI précédents. On observe que les lignées T1G et *the1-4* sont plus impactées par la drogue avec 67,4% et 68,4% d'inhibition de croissance contre 58,2% pour le sauvage. Aucune différence nette n'est observée pour *herk1*. Comme pour les CBI précédents, *fer4* est plus inhibée avec 68,9% de taille d'hypocotyle réduite. Cette fois, le double mutant *the1-1 x fer4* a été testé et les résultats sont similaires à *fer4* : les plantules sont plus inhibées par l'Hypostutine que le sauvage avec 72,6% de réduction de taille. C'est donc la perte de fonction de FER4 qui outrepassait l'effet de la perte de fonction de *the1-1* (même si le génotype *the1-1* semble peu différent de Col-0 pour la réponse à la drogue).

Enfin, en ce qui concerne le traitement Thaxtomine A à 100 nM, la drogue perturbe la croissance de tous les génotypes et le double mutant *the1-1 x fer4* a pu être testé (Figure 50E). On observe que le mutant *the1-1*, avec 29,8% de réduction de la taille des hypocotyles, est moins inhibé que le sauvage avec 41,7% de perte de croissance. Encore une fois, le mutant *herk1* ne présente pas de différence évidente avec le sauvage. Les lignées T1G et *the1-4* sont plus inhibées mais c'est surtout *fer4* et le double mutant *the1-1 x fer4* qui présentent la plus forte inhibition de croissance avec respectivement 76,8% et 82,3% de taille d'hypocotyle réduite. Ainsi, les observations sont similaires aux autres CBI et le double mutant montre que l'effet de la mutation *fer4* contrecarre la perte de fonction de THE1.

En conclusion, tous les CBI testés présentent les mêmes résultats. En présence de CBI et en absence de THE1, les plantules ont tendance à croître plus facilement. A l'inverse, dans la majorité des cas, en présence de THE1, la croissance des plantules est plus inhibée. On peut en déduire que THE1 pourrait percevoir la déficience en cellulose causée par les CBI tout comme il l'a été montré pour la déficience engendrée par *cesa6^{prc1-1}* (Hématy et al., 2007). THE1 est capable de percevoir le peptide RALF34 mais il n'a pas encore été montré qu'il pouvait se lier à des résidus de polysaccharides (Gonneau et al., 2018). On peut alors donc se demander si les perturbations engendrées par ces CBI peuvent modifier la sécrétion de RALF dans l'apoplaste. On ne peut cependant pas exclure que THE1 ait d'autres ligands potentiels plus en lien avec la déficience en cellulose. Les traitements utilisés sur le long terme ne permettent pas de mettre en évidence si l'activation de THE1 est une réponse primaire ou secondaire du traitement, lié à l'impact globale d'une

déficience en cellulose. Le récepteur HERK1, même s'il est exprimé dans l'hypocotyle et nécessaire pour réguler la croissance ne semble pas jouer de rôle dans la signalisation des CBI. Le récepteur FER quant à lui est au centre de nombreux processus (voir partie 1.5). Il a été montré qu'il joue un rôle notamment dans la tolérance aux perturbations pariétales induites par un stress salin (Feng et al., 2018). On peut se demander si la perte de fonction de *fer4* induit un stress constitutif de la paroi qui entraîne une efficacité plus forte des perturbations liées aux CBI. Enfin, les travaux de (Gonneau et al., 2018) montrent que FER et THE1 ont des signalisations communes avec un rôle de FER antagoniste à THE1. Il serait intéressant de voir ce qu'il en ait pour le traitement CGA qui n'a pu être réalisé et de tester d'autres génotypes dont certains doubles mutants. Un autre candidat est le récepteur de type LRR-RLK appelé MIK2. Il a effectivement été montré récemment que dans les mutants *the1-1*, *mik2-1* et le double mutant *mik2-1 the1-1*, l'expression de gènes normalement activée par des traitements à l'Isoxabène comme par exemple les gènes marqueurs de l'immunité *FRK1* et *At1g51890* est absente (Van der Does et al., 2017). Dans les mutants *mik2-1* et *mik2-1 the1-1*, un autre gène marqueur, *CYP81F2*, n'est plus exprimé suite au traitement Isoxabène par contre dans le mutant *the1-1*, son expression est toujours détectée. Quant à la réponse au DCB, ils ont montré qu'elle est compromise dans les mutants *mik2-1*, *the1-1* et le double mutant *mik2-1 the1-1*. Ils ont également observé que la réponse à un traitement à la Thaxtomine A est absente dans les fonds mutants *mik2-1* et *mik2-1 the1-1* mais encore présente dans le mutant *the1-1*. Ces résultats suggèrent que MIK2 est aussi important pour la perception de déficience en cellulose et que THE1 et MIK2 agissent différemment pour activer les réponses suite à ces déficiences en cellulose. Il serait donc intéressant de tester la résistance de *mik2-1* et du double mutant *mik2-1 the1-1* aux différents CBI.

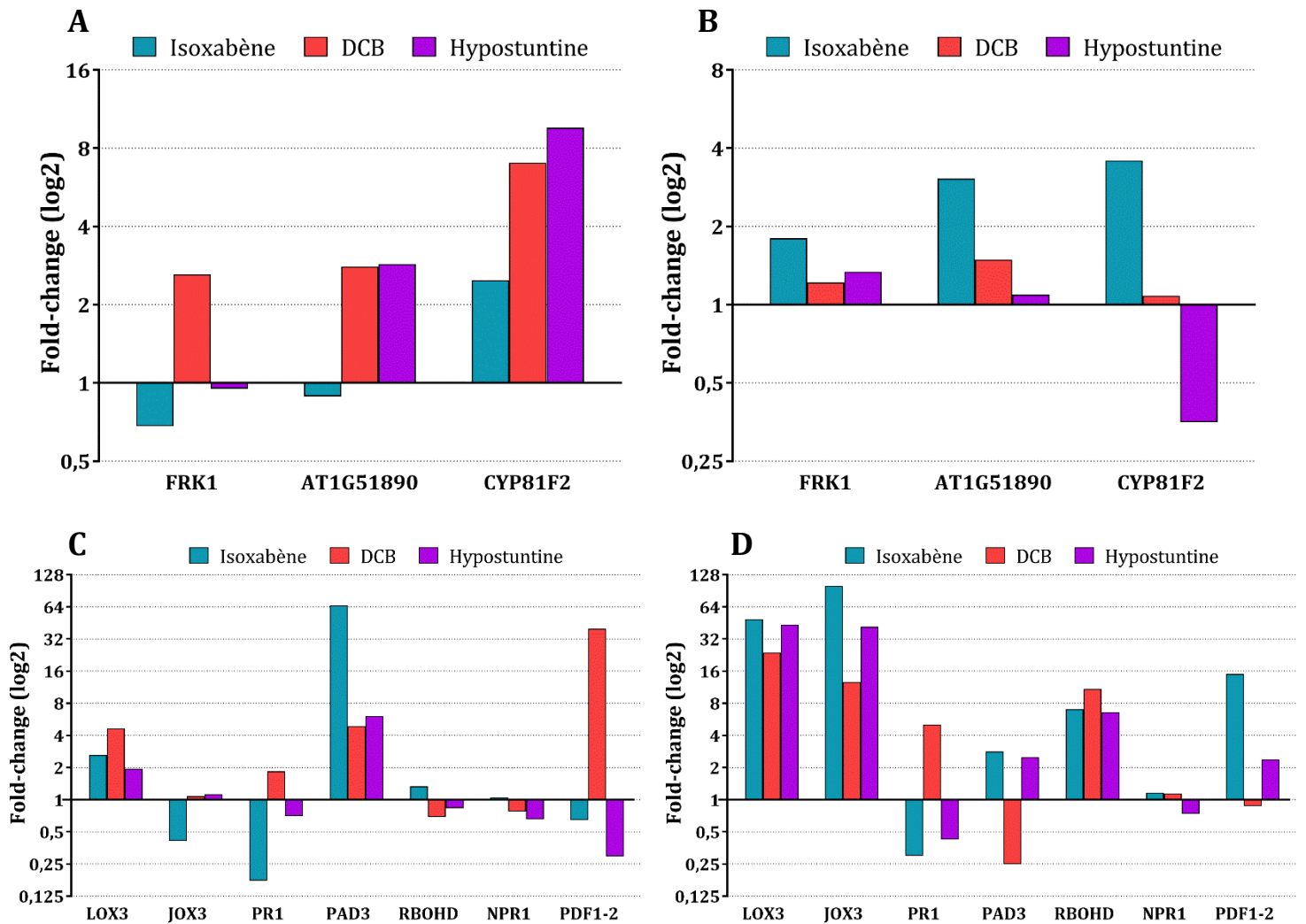


Figure 51. Voies de signalisation induites par les CBI

Les analyses de RT-qPCR ont été réalisées au laboratoire à partir d'ARN extraits de plantules de 3 jours qui ont été cultivées à l'obscurité et traitées à différents temps avec de l'Isoxabène à 600 nM, de l'Hypostuntine à 100 µM, du DCB à 20 µM ou du DMSO (contrôle) (A) 1h ou (B) 3h de traitement pour étudier l'expression des gènes de réponse aux déficiences en cellulose. (C) 6h ou (D) 24h de traitement pour étudier l'expression des gènes de voies de biosynthèse/signalisation de l'acide salicylique, de l'éthylène, de l'acide jasmonique, de la camalexine et des ROS. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression du gène *POLYUBIQUITINE 4* (*UBI4*). Le ratio du niveau d'expression (fold-change) entre les traitements par rapport au DMSO est représenté.

2.4.2. Détermination des voies de signalisation induites par les CBI

Afin de déterminer les voies de signalisation induites par les CBI, l'étude de l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans différentes voies de signalisation a été entreprise. L'étude de l'expression de gènes connus pour répondre aux réponses immunitaires et aux déficiences en cellulose tels que les gènes *FRK1*, *AT1G51890* et *CYP81F2* a tout d'abord été menée (He et al., 2006 ; Van der Does et al., 2017). Des plantules ont été traitées pendant une heure ou 3 heures en présence d'Isoxabène à 600 nM, de DCB à 20 µM, d'Hypostuntine à 100 µM ou de DMSO (contrôle) (Figure 51A et B). On observe alors qu'au bout d'une heure, les trois traitements entraînent une surexpression du gène *CYP81F2*. Les traitements DCB et Hypostuntine provoquent également une induction de l'expression du gène *AT1G51890* alors que le traitement à l'Isoxabène ne semble rien changer. La réponse du gène *FRK1* est moins marquée, avec l'Isoxabène et l'Hypostuntine, elle semble plutôt inchangée ou réprimée et elle est induite par le DCB (Figure 51A). En revanche, à 3h de traitement, c'est l'Isoxabène qui entraîne nettement la surexpression de ces trois gènes tandis que les traitements DCB et Hypostuntine montrent peu de différences avec le contrôle sauf pour l'expression du gène *CYP81F2* qui est réprimée par le traitement à l'Hypostuntine (Figure 51B). On peut donc en déduire que les trois CBI favorisent l'expression de *FRK1*, *AT1G51890* et *CYP81F2* de façon précoce et transitoire. Le délai pour observer ces changements est néanmoins plus long pour le traitement Isoxabène. Les cinétiques d'induction et de répression semblent spécifiques des CBI mais pour vraiment conclure, une expérience supplémentaire devra être effectuée. Il serait aussi intéressant d'observer leurs réponses toujours après traitement avec les CBI mais dans des fonds mutants tels que les récepteurs cités dans la partie précédente.

L'étude de l'expression de plusieurs gènes dont les produits sont impliqués dans des voies de biosynthèse et de signalisation a été menée dans un deuxième temps au laboratoire (Figure 51C et D). La voie de la biosynthèse et la régulation de l'acide jasmonique a été plus particulièrement analysée car Denness et al. (2011) ont montré qu'un traitement à l'Isoxabène de plantules d'*Arabidopsis thaliana* induit la production d'acide jasmonique au bout de 8 heures. Les gènes *LOX3* et *JOX3* qui codent respectivement pour une enzyme de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique et pour une enzyme qui est impliquée dans l'inactivation de l'acide jasmonique (Wasternack, Hause, 2013 ; Caarls et al., 2017) ont été choisis comme références. Tous les deux sont surexprimés au bout de 24 heures mais seul *LOX3* est induit à 6 heures de traitement. Il y a donc tout d'abord une mise en place de la biosynthèse de l'acide jasmonique quel que soit le traitement. La plante réagit alors en hydroxylant via *JOX3* la forme active de l'acide jasmonique. Cette hydroxylation inactive l'acide jasmonique et par la même occasion atténue l'ampleur de la réponse de la plante. Ainsi, il a été montré que dans le quadruple mutant *jax1jax2jax3jax4*, la réponse de gènes de défense est plus importante que dans le contrôle et ce mutant est résistant à l'infection de *Botrytis cinerea* (Caarls et al., 2017).

Le marqueur *PDF1-2* (Plant Defensin 1-2) codant pour une PR (pathogenesis-related protein) a ensuite été analysé car c'est un élément qui intègre les réponses de signalisation de l'acide jasmonique mais aussi de l'éthylène (Sels et al., 2008 ; Denoux et al., 2008). L'induction de l'expression du gène est plus précoce pour le DCB que pour l'Isoxabène et semble plutôt stable pour le traitement Hypostuntine. Il a été montré que des PAMP ou des DAMP sont capables d'activer des voies de signalisation de l'acide jasmonique et de l'éthylène mais peuvent aussi activer l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'acide salicylique. Récemment, il a aussi été montré qu'un traitement avec du cellobiose sur des plantules active la voie de l'acide salicylique (Souza et al., 2017). L'expression de *NPR1* qui est un régulateur positif de la voie de l'acide salicylique a donc été testée (Fan, 2002) mais peu de changements ont été observés lors des trois traitements. *PR1* (pathogenesis-related protein) est aussi un indicateur tardif de l'activation de la voie de l'acide salicylique (Rivas-San Vicente, Plasencia, 2011 ; Shah, 2003). Un profil particulier a été observé pour le traitement DCB avec une induction de l'expression de *PR1* tardive alors que les deux autres traitements ne provoquent pas d'induction. Il a été montré que des traitements avec de petits fragments de paroi pectiques tels que les OG, entraînent dans les plantules une accumulation de phytoalexines (Davis et al., 1986). Le marqueur de phytoalexines *PAD3* qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse de la camalexine (Schuhegger et al., 2006) a donc été analysé. Les résultats montrent que ce gène est induit par les trois traitements et que le traitement DCB réprime ensuite son expression. Enfin, l'expression de la NADPH-oxydase *RBOHD* impliquée dans la production ROS a été étudiée. Contrairement aux traitements de six heures, le gène *RBOHD* est surexprimé à 24 heures ce qui peut traduire une production de ROS à ce temps de traitement.

Les analyses biochimiques et immunohistochimiques ont montré que les plantules traitées aux CBI présentent des compositions pariétales altérées. J'ai donc voulu étudier l'expression de gènes impliqués dans le remodelage pariétal. Des plantules d'*Arabidopsis thaliana* cultivées trois jours à l'obscurité ont été traitées 14 heures avec de l'Isoxabène à 600 nM, du DCB à 20 μ M, du C17 à 50 μ M ou du DMSO afin de provoquer des changements conséquents au niveau de la paroi. J'ai contacté Laurent Gutierrez qui dirige la plateforme de biologie moléculaire à l'Université d'Amiens pour utiliser leurs automates de pipetage permettant de réaliser des RT-qPCR à haut débit et de façon reproductible. Ils ont également en stock des couples d'amorces permettant d'amplifier de nombreux gènes impliqués dans le remodelage pariétal et dans diverses voies de signalisation. J'ai donc décidé de tester sans a priori un certain nombre de ces gènes. Suite à des problèmes techniques résultant en une faible production d'ADNc, j'ai réduit le nombre de gènes à analyser (amorces Annexe 3). La normalisation des données a été réalisée avec l'expression du gène *TIP41* qui a un niveau d'expression équivalent pour tous les traitements.

J'ai montré que certains CBI pouvaient influencer le niveau de méthylestérisation et d'acétylation des pectines. On peut alors se demander si les traitements peuvent moduler l'expression des enzymes PME et PAE responsables de ces modifications.

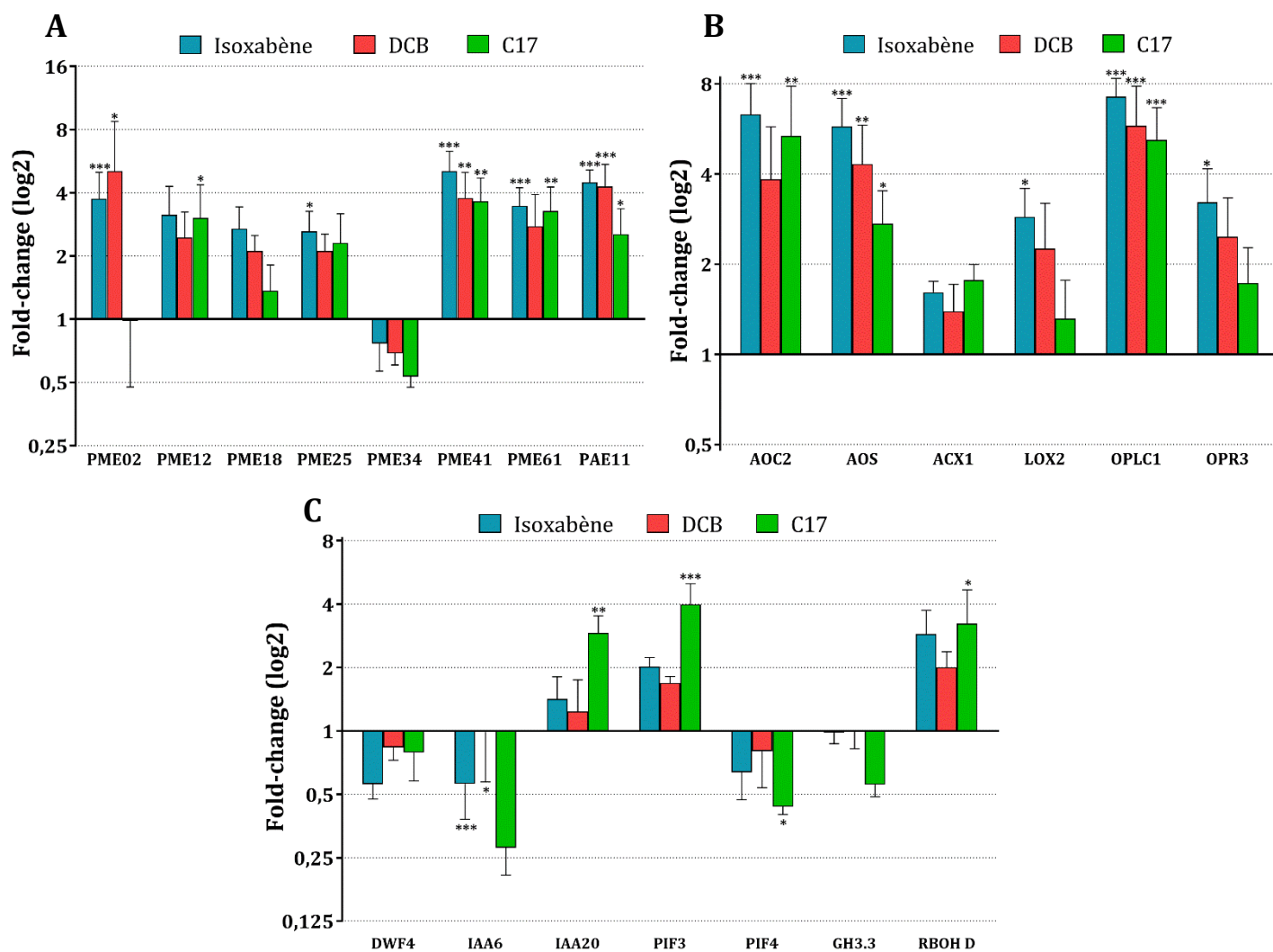


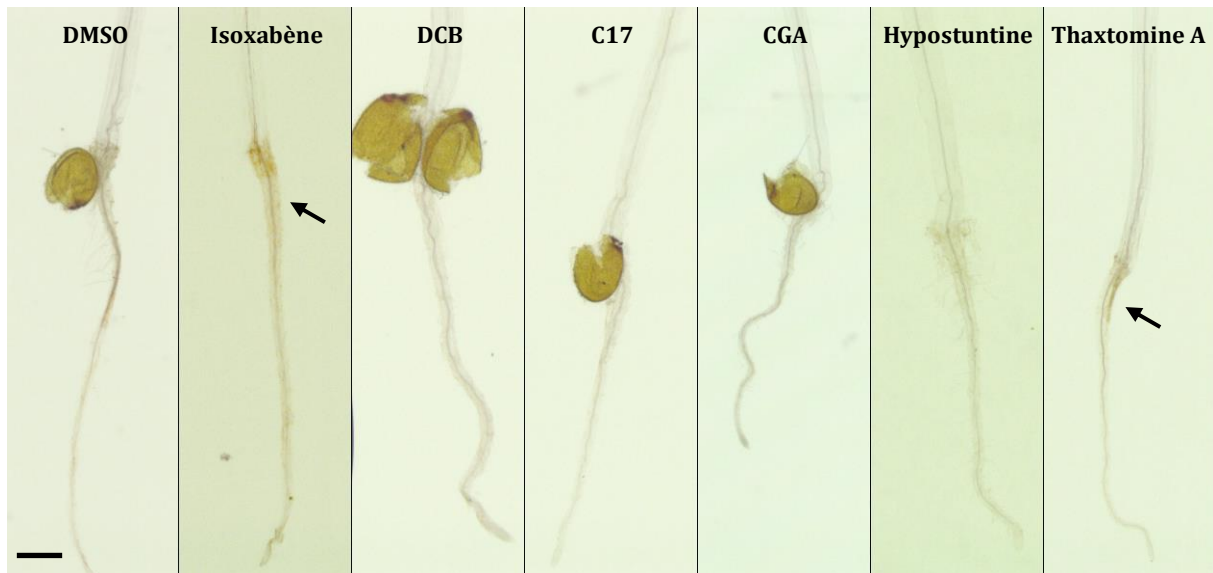
Figure 52. Les CBI induisent des changements d'expression de gènes liés aux modifications des pectines et à certaines voies de signalisation

Les analyses RT-qPCR ont été réalisées à la plateforme de biologie moléculaire d'Amiens à partir d'ARN extraits de plantules de 3 jours qui ont été cultivées à l'obscurité et traitées pendant 14 heures avec de l'Isoxabène à 600 nM, du DCB à 20 μ M, du C17 à 50 μ M ou du DMSO (contrôle). Expression de gènes impliqués dans (A) le remodelage des pectines, (B) la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique, (C) la voie de signalisation des brassinostéroïdes (*DWF4*), la régulation de la biosynthèse ou la réponse à l'auxine (*IAA6/IAA20/PIF3/PIF4/GH3.3*) et la biosynthèse des ROS (*RBOHD*). L'expression de tous les gènes est normalisée par rapport à l'expression de *TIP41*. Le ratio du niveau d'expression (fold-change) entre les traitements, par rapport au DMSO est représenté. Les résultats du test statistique Two-way ANOVA sont indiqués : p-value < 0,05 (*) 0,01 (**) 0,001

L'étude de l'expression de plusieurs *PME* (sur la soixantaine identifiée chez *Arabidopsis thaliana*) et du gène *PAE11* montre que des différences significatives existent entre les traitements aux CBI et le témoin DMSO (Figure 52A). On observe en effet que tous les traitements entraînent la surexpression de la plupart des gènes testés. Seule l'expression de *PME34* est inférieure avec les traitements. De plus, très peu de différences sont observables entre les CBI. Seule le gène *PME2* semble surexprimé avec les traitements Isoxabène et DCB mais pas avec le C17. Les *PME* et *PAE* appartiennent à des familles multigéniques, il y a donc sûrement de la redondance fonctionnelle entre ces différentes isoformes. Par conséquent il est difficile de dire si les différences de l'état de méthylestérification de certaines populations de pectines pour le traitement C17 (voir partie 2.2.4) peuvent s'expliquer par des différences d'expression des *PME*.

En ce qui concerne les gènes de biosynthèse de l'acide jasmonique, des différences d'expression sont mises en évidence pour tous les traitements aux CBI testés (Figure 52B). Là encore, les traitements ne se distinguent pas les uns des autres, tous ont une tendance à surexprimer les gènes étudiés. Cela confirme les résultats de RT-q-PCR que j'ai obtenus au laboratoire et ceux de Denness et al. (2011). La voie de l'acide jasmonique est bien activée par l'Isoxabène et elle semble être aussi activée après un traitement avec du DCB, du C17 et de l'Hypostuntine. L'expression de gènes liés à la biosynthèse ou à la régulation d'autres hormones a également été testée (Figure 52C). L'expression de *DWF4* qui est liée à la signalisation des brassinostéroïdes (Kim et al., 2006) est plutôt réprimée suite aux traitements. On ne peut donc pas en déduire que cette voie de signalisation est activée dans ces conditions. Par contre les gènes de réponse et de régulation de l'auxine ont des profils d'expression très variables. Le traitement C17 semble notamment changer plus fortement l'expression des gènes de cette voie de signalisation. Enfin, la surexpression de l'oxydase RBOHD est confirmée avec cette expérience surtout pour le traitement C17. Ainsi il serait important de vérifier par des quantifications ou des colorations, la présence des ROS après les traitements. Denness et al ont montré que le traitement Isoxabène entraînait l'accumulation de ROS potentiellement via l'expression de ces oxydases. Au final, les CBI étudiés entraînent après 14h des changements d'expression de nombreux gènes mais sans grande différence dans le profil d'expression entre les drogues.

En conclusion, les CBI analysés montrent tous des changements d'expression de gènes liés aux stress. Aucun CBI ne présente un profil d'expression de gènes très différent des autres. Le délai de réponse n'est pas forcément le même, le DCB inhibe l'expression de *PAD3* et inhibe *PR1* après 24 heures de traitement donc le DCB régulerait différemment les voies de signalisation de la camalexine et de l'acide salicylique. Enfin le C17 semble réprimer l'expression de *PME2*. Il faudrait vérifier après traitement au C17 l'activité globale des *PME*. Mais de façon générale, tous activent rapidement l'expression de gènes liés à la réponse immunitaire, avec au moins une signalisation de l'acide jasmonique, de l'auxine, de phytoalexines et une production de ROS. Ainsi les CBI testés engendrent le même type de réponses que celles détectées lors de stress biotiques. Enfin il faudrait réaliser ces mêmes analyses à partir de traitements réalisés par les autres CBI.

A**Figure 53. Accumulation de lignine ectopique suite aux traitements CBI**

Des plantules de 4 jours cultivées à l'obscurité et traitées pendant 14h avec 100 nM d'Isoxabène, 5 μ M de DCB, 50 μ M de C17, 10 nM de CGA, 100 μ M d'Hypostuntine, 20 μ M de Thaxtomine A ou du DMSO (contrôle) ont été incubées avec du phloroglucinol. Les lignines sont alors colorées en rouge au niveau des tissus. (A) Images représentatives des racines des différents traitements. L'Isoxabène et la Thaxtomine A entraînent une coloration diffuse à la base de la racine (flèches noires). Barre d'échelle = 500 μ m. (B) Image représentative du haut de l'hypocotyle d'une plante traitée à la Thaxtomine A. Là encore, une coloration rouge est visible (flèche noire). Barre d'échelle = 100 μ m

2.4.3. Effet secondaire des CBI sur la paroi : lignification ectopique et accumulation de callose

Afin d'observer les modifications pariétales tardives engendrés par les traitements CBI, une approche histochimique a été entreprise. Plusieurs composés peuvent être accumulés au niveau de la paroi en cas de stress. Il a notamment été montré qu'en cas de stress biotique, abiotique ou lors de perturbations de la biosynthèse de la cellulose, une accumulation de lignine peut être observée au niveau de la paroi (Caño-Delgado et al., 2003 ; Moura et al., 2010 ; Denness et al., 2011). De plus, un autre polymère est connu pour être produit de façon ectopique en cas de stress : la callose (Ellinger et al., 2013 ; Schneider et al., 2016). L'utilisation de deux colorants permet de détecter la production de ces composés au sein de plantules traitées avec les différents CBI ; le phloroglucinol est utilisé pour colorer les lignines et le bleu d'aniline, pour la callose. Des plantules de 4 jours cultivées à l'obscurité ont été traitées pendant 14h avec les CBI ou le traitement témoin DMSO (différents traitements simultanés). Elles ont été ensuite immergées dans les colorants puis observées en lumière blanche pour le phloroglucinol et à la loupe fluorescente pour le bleu d'aniline avec une excitation à 370 nm.

En ce qui concerne la coloration des lignines avec le phloroglucinol, les marquages ne sont pas très intenses mais permettent d'observer des différences selon les traitements (Figure 53). C'est au niveau de la racine que les colorations sont habituellement les plus visibles. On observe à ce niveau des légères colorations pour le traitement à l'Isoxabène et au Thaxtomine A (Figure 53A). Cela confirme les travaux de Denness et al., montrant qu'un traitement à l'Isoxabène entraîne une accumulation de lignine ectopique et cette réponse est liée à la signalisation via THE1 et la production de ROS (Denness et al., 2011). On peut déduire que c'est le cas également pour la Thaxtomine A. Certaines plantules traitées avec cet inhibiteur présentent d'ailleurs un marquage au phloroglucinol en haut de l'hypocotyle (Figure 53B). Il est toutefois difficile de conclure que pour les autres inhibiteurs, aucune lignification ectopique n'est engendrée. En effet la coloration étant peu intense, il est difficile de la détecter. Il serait intéressant de renouveler l'expérience avec des concentrations plus importantes en CBI ou sur un temps plus long.

Pour la coloration de la callose mise en évidence par le bleu de toluidine, certains traitements CBI entraînent des différences comparés au témoin DMSO (Figure 54). C'est en haut de l'hypocotyle au niveau de la zone d'élongation que le marquage diffère entre les traitements. On observe par exemple pour le traitement Isoxabène (Figure 54B), des dépôts de callose très éparses que l'on ne retrouve pas pour le traitement DMSO (Figure 54A). Cela est typique de zones de la paroi où la callose est accumulée de manière ectopique comme lors de stress biotiques, freinant par exemple la pénétration des pathogènes (Ellinger et al., 2013). On peut donc supposer que les mêmes éléments de signalisation que pour ces stress biotiques sont recrutés lors de la perception des perturbations engendrées par l'Isoxabène. La quantification du signal montre une augmentation significative de la quantité de

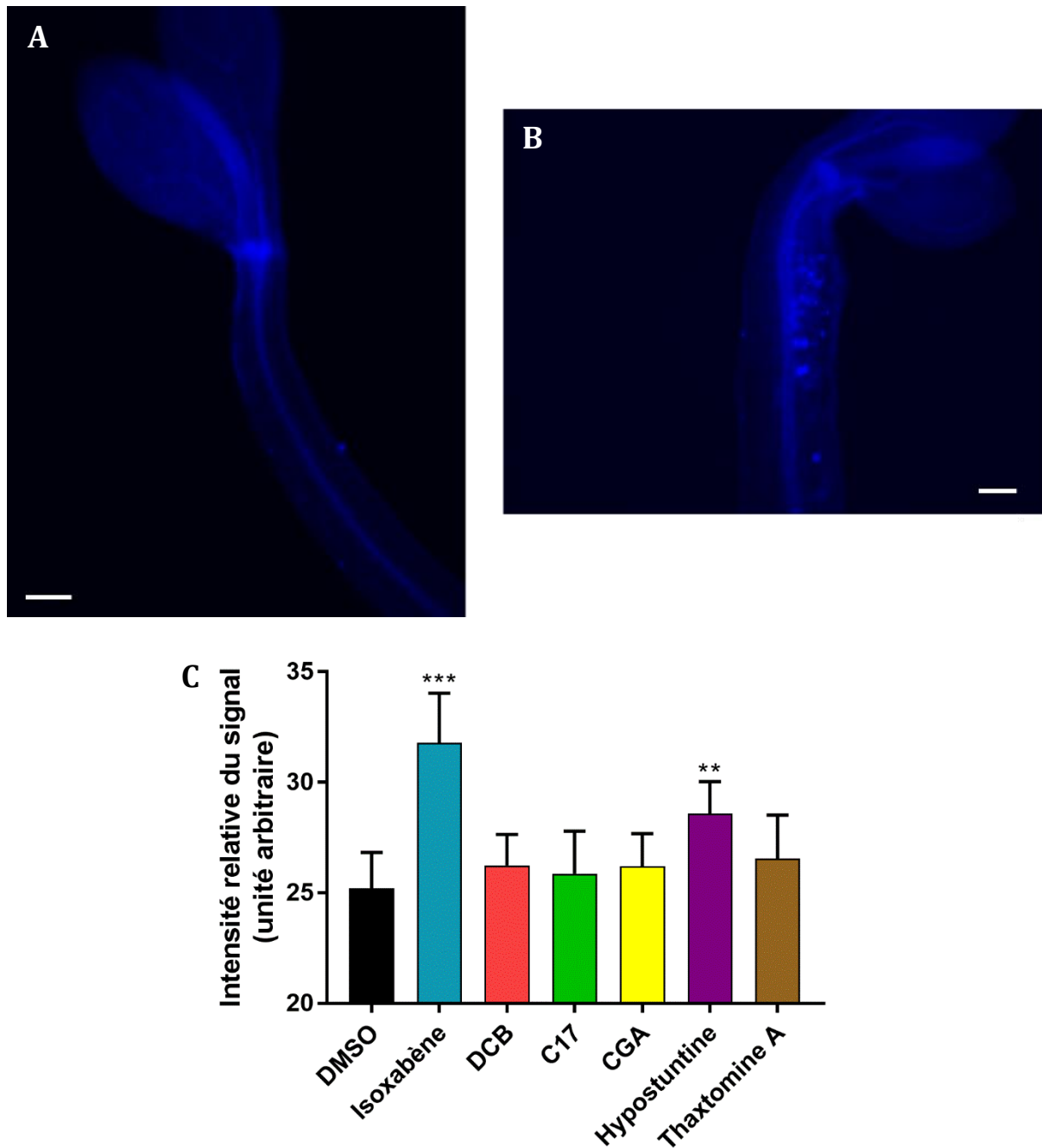


Figure 54. L'Isoxabène et l'Hypostuntine entraînent l'accumulation de callose

Des plantules de 4 jours cultivées à l'obscurité et traitées pendant 14h avec 100 nM d'Isoxabène, 5 µM de DCB, 50 µM de C17, 10 nM de CGA, 100 µM d'Hypostuntine, 20 µM de Thaxtomine A ou du DMSO (contrôle) ont été colorées au Bleu d'aniline (marquage de la callose). (A-B) Les images représentatives du haut de l'hypocotyle de plantules traitées au DMSO (A) et Isoxabène (B). Barre d'échelle = 100 µm. (C) Quantification moyenne du signal (avec les intervalles de confiance à 95%), relatif à la coloration de la callose pour les différents traitements. Les résultats des t-tests entre les traitements et le contrôle DMSO sont indiqués : p-value < 0,01 (**), 0,001 (***).

callose au niveau de l'hypocotyle, suite au traitement Isoxabène. En ce qui concerne les autres traitements, seul l'Hypostuntine semble entraîner également une différence significative avec le traitement DMSO. On peut supposer que l'Hypostuntine et l'Isoxabène induisent tous deux un dépôt de callose avec la même cinétique. Pour les autres CBI, il faudrait tester d'autres concentrations et d'autres temps de traitements.

En conclusion, après 14 heures de traitement, l'Isoxabène et la Thaxtomine A entraînent l'accumulation de lignine ectopique au niveau de la paroi alors qu'un dépôt de callose n'est provoqué que par les traitements avec de l'Isoxabène et de l'Hypostuntine. Il serait intéressant de voir si les mutants affectés pour les récepteurs THE1, FER ou MIK2 présentent une accumulation de composés ectopiques après traitements aux différents CBI. Il serait alors possible d'associer l'activation de ces récepteurs par les CBI à cette accumulation.

3. DISCUSSION GENERALE

La perturbation chimique de la biosynthèse de la cellulose par l'utilisation d'inhibiteurs (CBI) est utilisée depuis de nombreuses années pour étudier les mécanismes de contrôle de l'intégrité pariétale. Les traitements avec des CBI permettent de contrôler finement les perturbations induites et ces perturbations sont à mettre en parallèle avec celles engendrées par les stress biotiques et abiotiques que subissent les plantes au cours de leur vie. La diversité des molécules connues comme perturbant la synthèse des composants de la paroi constitue autant de pistes permettant d'identifier de nouvelles voies de perception, de signalisation et de réponses physiologiques associées à ces perturbations. J'ai donc au cours de ma thèse évalué l'impact des traitements CBI sur la paroi en mettant en évidence que la synthèse de cellulose pouvait être perturbée de différentes façons. Cette étude montre bien que la paroi cellulaire est au centre des étapes précoces lors de l'interaction des plantes avec leur environnement.

3.1. Un nouvel inhibiteur, l'Hypostuntine, n'agit pas comme les autres CBI identifiés

Une nouvelle molécule appelée l'Hypostuntine et perturbant l'assemblage de la paroi a été identifiée. Elle présente certaines caractéristiques qui la distinguent des CBI classiques. Cela fait donc de l'Hypostuntine un nouvel outil pour étudier la coordination de la synthèse des composés pariétaux.

3.1.1. Peut-on réellement identifier l'Hypostuntine comme un CBI ?

Selon la classification des CBI par l'équipe de Seth Debolt (Brabham 2013; Tateno 2016), une molécule peut être considérée comme CBI si elle répond à plusieurs critères (voir Figure 30, partie 1.4.2.1). L'Hypostuntine entraîne bien une altération de la croissance anisotrope des plantules traitées comme les autres CBI. Une diminution de la synthèse de cellulose a été mise en évidence au niveau de la paroi de plantules cultivées en présence d'Hypostuntine pendant 4 jours. Cependant, contrairement aux autres CBI, la molécule n'affecte pas la localisation du complexe de cellulose synthase (CSC) ou son interaction avec les microtubules corticaux (CMT) et ce malgré de fortes concentrations (Figure 38, partie 2.2.2). Il ne fait donc pas partie des trois groupes de CBI identifiés qui causent (1) l'internalisation des CSC dans les compartiments de types SmaCC/MASC, (2) l'immobilisation du CSC à la membrane plasmique ou (3) l'altération des trajectoires des CSC en impactant aussi leur vélocité. En revanche, l'Hypostuntine affecte la rotation des CMT et donc la rotation des GFP-CESA. En conclusion l'Hypostuntine peut être considéré comme un CBI mais il rejoint alors la liste des CBI inclassables suite à l'observation des FP-CESA par microscopie confocale. Son mode d'action est aussi différent des autres CBI inclassables.

3.1.2. Le mode d'action de l'Hypostuntine

Dans le cas de l'Hypostuntine, plusieurs éléments sont intrigants : comment la synthèse de cellulose peut-elle être impactée si le CSC migre toujours à la membrane plasmique ? Comment des mutations *cesa3* confèrent-elles une résistance à l'Hypostuntine ? La question de la cible directe potentielle du CBI peut également être posée.

3.1.2.1. Impact de l'Hypostuntine sur la biosynthèse de cellulose

Les parois des plantules traitées à l'Hypostuntine sont moins épaisses à 42 heures de croissance car l'Hypostuntine doit retarder le dépôt des polysaccharides. A 48 heures, les parois des plantules traitées se sont épaissies et ensuite l'amincissement des parois (causé par l'accélération de croissance entre 48 heures et 72 heures) n'est pas visible puisque la croissance est ralentie. Les parois sont aussi moins extensibles dans les

échantillons traités. Ces résultats concernant l'épaisseur des parois montrent que l'Hypostuntine a un premier effet rapide sur l'organisation pariétale entre 0 et 42 heures. Ensuite la paroi est capable de s'épaissir et reste épaisse au-delà de 72 heures car les cellules ne s'allongent plus. Les analyses biochimiques, les résultats de microspectroscopie FT-IR et les dosages biochimiques montrent que les traitements longs impactent la production de cellulose de la même manière que d'autres CBI dont l'Isoxabène. Or des traitements courts (5 heures de traitement de plantules âgées de trois jours) avec de l'Hypostuntine n'induisent aucune modification de la vitesse de déplacement ou de la localisation du CSC. Seules les rotations des CMT et donc les rotations des trajectoires de GFP-CESA sont changées ; ce changement de rotation va engendrer un remodelage pariétal avec sûrement des microfibrilles de cellulose incorporées différemment au sein des autres polymères de la paroi. Le défaut de coordination dans l'assemblage des polymères de la paroi induirait alors un changement de structure et / ou de composition pariétale. Pour vérifier cela, il serait utile de réaliser des dosages des trois polysaccharides majeurs de la paroi à partir de plantules traitées à différents temps, entre 0 et 72 heures. Il faudrait également vérifier la vélocité des complexes dans des plantules très jeunes c'est-à-dire âgées de moins de 42 heures même si le signal FP-CESA est assez faible à ce stade là. Il a effectivement été montré que la vélocité du CSC à la membrane plasmique est directement liée à la force induite par la polymérisation de la cellulose (Diotallevi, Mulder, 2007). Ainsi, il a été suggéré que la diminution de la vélocité des CSC induite par le traitement DCB soit liée à la réduction du taux de polymérisation de la cellulose.

Ce qui reste indéniable c'est que les perturbations engendrées par l'Hypostuntine sont perçues par les cellules végétales de la même manière que les perturbations causées par les autres CBI. Les spectres obtenus par microspectroscopie FT-IR sont regroupés avec ceux issus de plantules traitées avec de fortes concentrations en CBI. Les récepteurs THE1 et FER semblent intervenir dans la perception des perturbations engendrées par l'Hypostuntine comme lors de la perception de déficiences en cellulose de mutants (Hématy et al., 2007 ; Gonneau et al., 2018). Dans le cas de l'Hypostuntine, qui n'agit pas directement sur la localisation du CSC, est ce que la perception de la déficience en cellulose est plus tardive ? Les analyses de l'expression de certains gènes marqueurs montrent que les gènes *FRK1*, *AT1G51890* et *CYP81F2*, associés aux réponses immunitaires précoces (He et al., 2006) sont surexprimés quelques heures après un traitement Hypostuntine (Figure 51, partie 2.4.2). De la même manière, j'ai pu montrer en accord avec les résultats de Van der Does et al. (2017) que ces mêmes gènes sont activés quelques heures après des traitements Isoxabène et DCB. On peut donc en déduire que certains processus associés aux perturbations des CBI sont mis en place pour l'Hypostuntine assez rapidement. Là encore, des cinétiques détaillées de traitements à l'Hypostuntine pourraient permettre de détecter des changements d'expression de gènes associés aux voies de perception et de signalisation. On observe néanmoins après 24 heures de traitement que l'Hypostuntine active les mêmes voies de signalisation que les autres CBI comme la voie de l'acide jasmonique (Figure 52, partie

2.4.2) et on observe également une accumulation de callose au niveau de l'hypocotyle de façon similaire au traitement Isoxabène. Beaucoup de points communs transparaissent de ces résultats entre les effets des traitements à l'Hypostuntine, comparés aux autres CBI.

3.1.2.2. La cible directe de l'Hypostuntine est liée à CESA3 ?

Les mutations *cesa3^{hsr1}*, *cesa3^{ixr1-1}* et *cesa3^{ixr1-2}* confèrent une résistance aux perturbations engendrées par l'Hypostuntine. Le taux d'élongation du mutant *cesa3^{hsr1}* est impacté lors des premières heures après traitement mais revient similaire à celui des plantules sauvages par la suite. Cela pourrait signifier que le mutant est perturbé à un stade précoce du traitement et qu'ensuite la synthèse de cellulose est normale. Les dosages de sucres de la paroi montrent que le mutant *cesa3^{hsr1}* traité ou non avec de l'Hypostuntine n'est pas déficient en cellulose. Dans le mutant *cesa3^{hsr1}*, les rotations des CMT ne sont affectées en présence d'Hypostuntine que pendant les premières heures de traitement. Cela correspondant à la période où *cesa3^{hsr1}* présente une inhibition de croissance. Ensuite, les rotations redeviennent normales et la croissance du mutant avec traitement redevient similaire au contrôle DMSO. On peut donc supposer que l'Hypostuntine n'affecte pas directement les rotations de CMT et que la mutation *cesa* compense la mauvaise coordination de l'assemblage des composés pariétaux en diminuant par exemple le taux de synthèse de la cellulose à un temps particulier. Une autre hypothèse mentionnée dans la discussion du manuscrit, est qu'un autre acteur serait en lien avec CESA3 et dont le fonctionnement serait perturbé en présence de l'Hypostuntine. Dans le cas du sauvage, l'effet direct ou non de la drogue modifierait l'interaction entre cet acteur et CESA3 : la protéine inconnue déclencherait alors un processus aboutissant à l'activation de voies de perception et/ou de signalisation. Dans le cas de certaines mutations *cesa3*, l'interaction entre la protéine inconnue et la CESA ne pourrait plus être perturbée par l'Hypostuntine et les réponses associées ne seraient plus déclenchées. L'identité de la protéine impliquée peut être variée. Beaucoup de protéines sont associées au CSC pour réguler la synthèse de cellulose (Figure 49, partie 1.3). On peut supposer qu'une protéine s'associant à la fois aux microtubules et au CSC soit une cible de l'Hypostuntine comme par exemple les protéines CC. Cela pourrait alors expliquer l'impact de l'Hypostuntine sur la rotation des CMT. On ne peut pas non plus exclure la présence de récepteurs qui pourraient percevoir la présence des CSC à la membrane plasmique et qui interagiraient physiquement avec les CESA. Ils activeraient une signalisation en cas de problèmes de polymérisation de la cellulose ou lorsque le CSC n'est plus actif. L'Hypostuntine déstabiliserait l'interaction entre ce récepteur et le CSC ce qui déclencherait différentes réponses de stress.

3.1.3. Conclusions et perspectives

En conclusion, l'Hypostuntine est une molécule ouvrant de nouvelles perspectives pour étudier les mécanismes de coordination entre l'assemblage de la paroi et la synthèse de cellulose. Cet inhibiteur de croissance a beaucoup de points communs avec

les CBI mais se distingue par son impact sur le CSC à la membrane plasmique. Afin d'en apprendre plus sur la signalisation et les dérégulations de gènes induites par l'Hypostuntine, des analyses transcriptomiques seraient nécessaires pour les génotypes sauvage Col-0 et le mutant *cesa3^{hsr1}* avec un traitement Hypostuntine. De telles analyses pour les traitements Isoxabène a permis d'identifier l'expression de nombreux gènes en lien avec des perturbations pariétales (Duval, Beaudoin, 2009 ; Engelsdorf et al., 2018). La question du temps de traitement est critique pour pouvoir disséquer les réponses primaires et secondaires induites par le CBI et des analyses biochimiques sont préalablement nécessaires. Différents points de temps, notamment dans les premières heures après traitement permettraient de mieux comprendre l'impact de la drogue sur la paroi.

3.2. Les CBI perturbent différemment la paroi

L'analyse comparée des perturbations engendrées par les CBI montre que s'ils engendrent tous une déficience en cellulose avec une perte de croissance anisotrope, des différences apparaissent quant à leur impact sur la structure et la composition de la paroi. Dès lors la question de la perception et les voies de signalisations associées aux différents CBI se pose : ces différentes perturbations sont-elles perçues de la même façon ?

3.2.1. Différentes perturbations de la paroi par les CBI

3.2.1.1. Altération de la synthèse de cellulose

Les traitements CBI entraînent tous une perte de croissance anisotrope avec une taille réduite de l'hypocotyle. De plus, différentes études ont quantifié la réduction de la production de cellulose suite aux traitements Isoxabène, DCB, C17, CGA (Sabba, Vaughn, 1999 ; Hogetsu et al., 1974 ; Hu et al., 2016 ; Peng et al., 2001 ; Fry, Loria, 2002). Les travaux de microspectroscopie FT-IR montrent que les hypocotyles de plantules traitées 4 jours présentent une plus faible absorption pour les nombres d'ondes liés à la cellulose (Figure 41, partie 2.2.3) et confirment les résultats de Mouille et al. (2003) et Robert et al. (2004). De plus, l'étude de la dynamique des GFP-CESA3 montre qu'à part pour l'Hypostuntine, les autres CBI impactent la dynamique ou la localisation des CSC de paroi primaire quelques heures après traitement. On peut émettre l'hypothèse que dans ces derniers cas, le changement au niveau des FP-CESA entraîne un défaut de polymérisation des microfibrilles de cellulose. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents se distinguent selon les CBI : on observe une immobilité du complexe avec le DCB alors que pour les autres drogues (sauf l'Hypostuntine), le CSC est internalisé. On peut donc supposer des modes d'actions radicalement différents entre le DCB, l'Hypostuntine et les autres CBI étudiés.

3.2.1.2. Compensation de la déficience en cellulose via les pectines ?

Outre les déficiences en cellulose, la microspectroscopie FT-IR montre que d'autres polymères ou éléments de la paroi pourraient être touchés. Là encore un effet global

pour tous les CBI semble se dessiner avec une plus forte absorbance que le traitement contrôle entre 1250 et 1600 cm^{-1} (Figure 41, partie 2.2.3). Seuls les traitements DCB et le C17 ne présentent pas de tels profils. La déficience en cellulose est souvent compensée par la synthèse d'autres polymères. Par exemple, le silencing des gènes de cellulose synthase, entraînant une plus faible synthèse du polymère entraîne une augmentation de la production d'homogalacturonanes faiblement méthylestérifiés (Burton et al., 2000).

Concernant les CBI, il a été montré que l'Isoxabène peut entraîner la surexpression de gènes liés aux pectines (Manfield et al., 2004), que les cultures cellulaires traitées au DCB et au CGA sont enrichies en homogalacturonanes (Encina et al., 2002 ; García-Angulo et al., 2006, 2012) et que lors du traitement à la Thaxtomine A, l'incorporation du ^{14}C est favorisée vers les pectines et hémicelluloses (Scheible et al., 2003 ; Bischoff et al., 2009). Les expériences de biochimie ont montré que seul le C17 pour des traitements de 14 heures entraîne la surproduction de pectines déméthylestérifiées et déacétylées dans la fraction des pectines acides. L'absence de différences significatives pour les traitements Isoxabène et DCB pourrait s'expliquer par les temps de traitements utilisés, la population de pectines considérée ou du type d'organe étudié. Les dosages de sucres neutres pour le traitement Hypostuntine démontrent également une augmentation des résidus arabinoses et galactoses, ce qui peut là encore indiquer aussi une surproduction de pectines pour compenser la déficience en cellulose.

L'état de méthylestérification de ces pectines est indéniablement un facteur à prendre en compte vu son rôle majeur dans la croissance (voir partie 1.2). Les expériences préliminaires d'immunohistochimie montrent que le l'Isoxabène entraînerait l'accumulation de pectines déméthylestérifiées tout comme le mutant déficient en cellulose *cesa6^{prc1-1}*. Le C17 aussi présente un degré de méthylestérification réduit pour les pectines acides. De plus, les traitements Isoxabène, DCB et C17 activent l'expression de certaines PME. On peut donc en déduire au moins pour les traitements Isoxabène et C17 que leurs déficiences en cellulose entraîneraient une déméthylestérification des homogalacturonanes changeant ainsi les propriétés mécaniques de la paroi.

3.2.1.3. Remodelage des hémicelluloses par le C17

Les dosages biochimiques montrent que les xyloglucanes des parois de plantules traitées au C17 sont moins décorés probablement à cause d'une défucosylation et d'une dégalactosylation des xyloglucanes. La structure des xyloglucanes influencerait l'activité des XTH (Franková, Fry, 2011), capables de les hydrolyser. Cette structure modifiée des xyloglucanes pourrait également changer ses interactions avec les microfibrilles de cellulose ou d'autres composants de la paroi (Levy et al., 1997 ; Park, Cosgrove, 2015). Dès lors, on peut supposer que les changements de décoration induits par le C17 permettraient de compenser la perte de cellulose pour les propriétés mécaniques de la paroi. Il serait intéressant de voir si les autres CBI peuvent également impacter les hémicelluloses.

3.2.2. Comment l'impact des CBI sur la paroi est-il perçu ?

Les perturbations pariétales engendrées par les CBI sont donc multiples. La diversité des récepteurs permettant de percevoir les perturbations (voir partie 1.5.2) et la multitude de ligands potentiels suggèrent l'existence d'un contrôle très fin de l'intégrité de la paroi. Dans ce cas, on peut s'attendre à ce que les différentes perturbations associées aux CBI soient distinguées par le système de perception et entraînent l'activation de voies de signalisation spécifiques.

3.2.2.1. Les récepteurs CrRLK1, de bons candidats pour percevoir les perturbations des CBI

THESEUS 1 (THE1) a été mis en évidence pour son rôle dans la perception de la déficience en cellulose engendrée par *cesa6^{prc1-1}* (Hématy et al., 2007). Les tests de résistances des lignées liées à THE1 montrent que les perturbations de tous les CBI sont perçues par le récepteur (Figure 40, partie 2.4.1). Cependant, aucun ligand de nature saccharidique n'a été identifié pour THE1. Les travaux de Gonneau et al. (2018) (voir Annexe 2) montrent que le peptide RALF34 est un ligand direct de THE1 et peut alors moduler la croissance racinaire. On peut alors se demander si la perturbation de la synthèse de cellulose par les CBI entraîne la sécrétion de peptides RALF ou si les domaines malectine-like de THE1, au niveau sa partie extracellulaire, peuvent se lier directement aux polysaccharides comme c'est le cas chez les animaux (Schallus et al., 2008 ; Franck et al., 2018). L'identification des ligands de THE1 et des autres CrRLK1 apporterait de nombre de réponses sur leurs mécanismes d'activation.

Les tests de résistance ont aussi montré que lorsque le récepteur FERONIA est muté, tous les CBI semblent plus efficaces (Figure 40, partie 2.4.1). FER peut aussi percevoir les peptides RALF et l'activation de THE1 par RALF34 est partiellement dépendante de FER (Gonneau et al., 2018). On peut alors se demander si FER, qui est connu pour interagir avec d'autres récepteurs (voir partie 1.5.3.2), pourrait interagir avec THE1 et influencer son activation. Le double mutant *the1-1 fer4* est lui aussi plus impacté que le sauvage pour toutes les drogues. Ainsi, même si la signalisation de THE1 est moins performante, la mutation de *fer4* est toujours délétère.

3.2.2.2. Voies de signalisation communes pour les stress liés aux CBI ?

Les récepteurs étudiés perçoivent donc de la même façon les effets des CBI. On ne peut exclure l'activation d'autres récepteurs plus spécifiques à chaque traitement CBI. Différentes voies de signalisation pourraient alors être activées. Pour les traitements testés, de nombreux gènes de biosynthèse ou liés aux voies de signalisation de l'acide jasmonique, des ROS ou de l'auxine sont activés. Cela confirme ce qui a été mis en évidence par Denness et al. (2011) sur l'Isoxabène. Ils ont d'ailleurs pu montrer que THE1 était nécessaire pour l'accumulation de ROS lors d'un traitement à l'Isoxabène. L'accumulation de lignine ectopique avec l'Isoxabène est également dépendante de THE1. Il serait intéressant de tester l'accumulation de ce composé pour le mutant *the1-1* avec les autres CBI. De façon générale, de nouveaux cribles pourraient être mis en place pour identifier plus de récepteurs. La sensibilité de récepteurs de différentes familles

aux CBI pourrait être testée et leur capacité à induire la production de lignine ectopique, des ROS et de callose pourraient permettre de les classer.

3.3. Place des CESA de paroi primaire dans la réponse aux CBI

Les CBI impactent la biosynthèse de la cellulose et tous hormis l'Hypostuntine perturbent la dynamique et/ou la localisation du CSC quelques heures après traitement. Les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus et la question des CESA comme cible directe des CBI se pose, d'autant plus que certaines mutations *cesa* confèrent des résistances aux CBI.

3.3.1. Le CSC est-il la cible directe des CBI ?

Les CBI étudiés entraînent soit l'internalisation du CSC dans les MASC soit son immobilisation à la membrane plasmique (Figure 38, partie 2.2.2). Pour l'Isoxabène, le C17, le CGA et la Thaxtomine A, le CSC n'est plus à la membrane plasmique et plusieurs raisons sont possibles. Tout d'abord, le temps de demi-vie des CESA est court comparé au temps moyen des autres protéines pariétales (Jacob-Wilk et al., 2006). On peut alors imaginer que les traitements influenceraient la sécrétion et le recyclage des CSC. Dans l'hypothèse d'un recyclage accru, soit les CBI agissent directement au niveau des CESA pour déstabiliser le complexe ou bien ils agissent indirectement via une autre protéine associée aux CESA qui influence leur recyclage. Les mutations résistantes protégeraient de l'action de la drogue directement le CSC ou l'interaction entre le CSC et la protéine régulatrice. Des mécanismes de modifications post-traductionnelle des CESA influencent leur stabilité et leur activité (voir partie 1.3.2.3.2). On ne peut donc pas exclure que de telles modifications soient déclenchées par l'effet des drogues. Dans ce cas, les mutations conférant une résistance aux traitements éviteraient d'une façon ou d'une autre cette dérégulation post-traductionnelle. Il est intéressant de noter qu'aucun mutant *cesa* n'a été identifié comme résistant à la Thaxtomine A. On ne peut donc pas exclure que la cible directe de la drogue n'ait aucun rapport avec les CESA.

En ce qui concerne le DCB, l'immobilisation du CSC est donc à mettre en lien avec l'absence de polymérisation de la cellulose (Diotallevi, Mulder, 2007). On peut supposer que la polymérisation est bloquée car un des acteurs de la biosynthèse est inactivé ou inhibé. J'ai pu identifier pour la première fois des mutants *cesa* résistants au DCB. Cela peut signifier que la cible directe de la drogue est un lien avec le CSC. Des études *in vitro* ont montré que le DCB et certaines molécules analogues se liaient à la protéine MAP20 connue pour s'associer avec les microtubules dans les tissus secondaires (Rajangam et al., 2008). Une étude *in vitro* avait établi que plusieurs petites protéines de 12 à 18 kDa pouvaient être des cibles du DCB (Delmer et al., 1987). On peut donc supposer qu'un autre acteur de la biosynthèse, de petite taille, interagirait habituellement avec le CSC mais que le DCB bloquerait cette interaction, stoppant ainsi la polymérisation de la cellulose. Dans ce cas, les mutations *cesa* entraînant la résistance au CBI empêcherait la molécule de perturber l'interaction hypothétique.

3.3.2. Distinction entre les isoformes de CESA

L'étude des résistances de mutants *cesa* aux CBI démontre l'importance de l'isoforme de CESA impactée pour la réponse aux traitements. Afin de constituer des CSC fonctionnels, trois groupes de CESA sont requis dans des proportions équivalentes (Gonneau et al., 2014 ; Hill et al., 2014). Chaque isoforme a donc son importance et des rôles différents au sein du CSC. L'étude de CESA chimériques constituées d'échanges de régions protéiques d'une isoforme avec une autre démontre bien que chaque composant du CSC a une activité et une fonction distincte (Wang et al., 2006 ; Kumar et al., 2018). L'organisation des différentes isoformes dans un CSC n'est pas résolue mais il est envisageable que chaque CESA a une position relative bien définie. J'ai pu montrer pour l'Hypostuntine et le DCB que seules les mutations dans une isoforme confèrent une résistance aux traitements (Figure 48, partie 2.3). Pour l'Isxabène, aucun mutant *cesa1* n'a été identifié comme résistant alors que c'est le cas pour certaines mutations de CESA3 ou CESA6 (voir Annexe1). Dans ce cas, les CBI agiraient soit directement sur les CESA en question soit via l'interaction entre les isoformes et une tierce protéine accompagnant le CSC. La position des isoformes dans le CSC aurait alors toute son importance. Les nouvelles constructions génétiques permettront d'en apprendre plus sur le rôle des isoformes de CESA et le mode d'action des CBI. Si la mutation conférant la résistance est transférée dans une autre isoforme et que la position ou la fonction de la CESA est importante pour le mode d'action du CBI, aucune résistance ne devrait être observée. La recherche de supresseurs des résistances aux CBI induites par les mutations *cesa* permettrait de mieux comprendre le mode d'action des CBI.

3.4. Conclusion finale

En conclusion, la paroi végétale est une structure dynamique dont la composition est finement contrôlée et ajustée. Les CBI sont des outils clés pour disséquer les mécanismes de perception et de régulation de la mise en place de la paroi. Dans le cadre de ces trois années de thèse, j'ai pu étudier les perturbations engendrées par six de ces molécules. L'une d'entre elles, l'Hypostuntine, a été identifiée et caractérisée pour son mode d'action distinct des CBI déjà décrits. Elle est en effet capable de perturber la coordination de la synthèse de cellulose avec l'assemblage d'une paroi extensible. Les CBI étudiés altèrent la synthèse de cellulose mais semblent avoir des répercussions différentes sur les autres polymères. En outre, ces perturbations sont perçues partiellement par des récepteurs de la paroi dont THE1 et FER. Dès lors, pour les CBI étudiés, des signalisations communes ont pu être identifiées déclenchant des réponses comparables à ce qui est observé pour des stress de nature biotique ou abiotique mais les cinétiques de réponse ne sont pas forcément les mêmes. Par ailleurs certains CBI activent des voies de signalisation plus spécifiques. De nombreuses questions sur le mode d'action des CBI restent à élucider et il est indéniable qu'ils seront la source dans le futur de nouvelles découvertes sur les mécanismes de biosynthèse et de perception des composés pariétaux.

4. MATERIEL ET METHODES

4.1. Matériel vivant

4.1.1. Matériel végétal

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* utilisées comme témoins dans les diverses expériences de ma thèse proviennent de l'écotype Columbia (Col-0). Les mutants *theseus* (*the*) utilisés sont : *the1-1* (Hématy et al., 2007) qui correspond à une perte de fonction de la protéine et *the1-4* (Guo et al., 2009) qui présente un gain de fonction (fond génétique Col-0) (Merz et al. 2017). Une plante transgénique surexprimant de façon constitutive THE1 (*pro35S::THE-GFP/Col-0*) (noté T1G) a été produite au laboratoire (Hématy et al., 2007). Pour les récepteurs FER (Duan et al., 2010) et HERK1 (Guo et al., 2009), les mutants correspondent respectivement à des pertes de fonction *fer4* et *herk1* et le double mutant *the1-1 x fer4* a été réalisé dans mon équipe par M. Martin. Les mutants résistants à l'Isoxabène *cesa3^{ixr1-1}*, *cesa3^{ixr1-2}* et *cesa6^{ixr2-1}* ont été fournis par W. Scheible, le mutant *cesa3^{hsr1}* résistant à l'Hypostuntine a été fourni par Li Deqiang et les mutants *cesa1^{20C1}*, *cesa1^{3D}*, *cesa3^{8P}*, *cesa3^{2D}* résistants au C17 ont été fournis par Zhubing Hu. Les génotypes *cesa3^{je5}* et *cesa1^{rsw1-10}* utilisés pour les transformations et *cesa6^{prc1-1}* pour les expériences d'immunohistochimie étaient déjà présents au laboratoire (Fagard et al., 2000 ; Desprez et al., 2007). Les détails sur les mutants *cesa* sont indiqués en Annexe 1. Enfin, des plantes transgéniques *proCESA3::GFP-CESA3/cesa3^{je5}* ont été réalisées au laboratoire (Desprez, et al. 2007).

4.1.2. Conditions de culture et traitements des plantes

Les graines sont préalablement stérilisées par immersion pendant 5 min dans du désinfectant universel chloré (CHLOR'O MIC) à 3,5 % (m/v) puis par deux rinçages successifs dans de l'éthanol 96 %. Ces graines sont alors semées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu *Arabidopsis* sans saccharose (d'après Estelle et Somerville (1987)). Elles sont ensuite placées à l'obscurité en chambre froide pendant 48 h à 6°C (étape de vernalisation). Afin de déclencher la germination, les boîtes de Petri sont soumises à un flash lumineux (lumière blanche fluorescente à 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pendant 5 h puis placées à l'obscurité en chambre de culture pour un temps de croissance variable selon les expériences. Les conditions de culture sont ainsi contrôlées : une température de 20°C pour une hygrométrie de 70 %, tout en restant à l'obscurité. L'âge des plantes est défini à partir du début du flash lumineux.

Pour les traitements longs (quatre jours à l'obscurité), concernant les analyses phénotypiques (mesure de la longueur des hypocotyles) et de la composition pariétale (microspectroscopie FT-IR), les graines sont déposées sur des filtres de nylon stériles, posés sur les boîtes de Pétri. En fin de vernalisation et avant le flash lumineux, les graines sont transférées sous hotte à flux laminaire dans de nouvelles boîtes contenant du milieu *Arabidopsis* auquel a été ajoutée la drogue à étudier. Différentes gammes de

concentration ont été utilisées en fonction des drogues pour l'expérience de microspectroscopie FT-IR :

- Isoxabène : 0,5 nM, 1 nM et 5 nM
- DCB : 0,1 µM, 0,25 µM et 0,5 µM
- C17 : 20 nM, 100 nM et 200 nM
- CGA : 0,01 nM, 0,1 nM et 0,3 nM
- Hypostuntine : 2,5 µM, 5 µM et 25 µM
- Thaxtomine A : 50 nM, 100 nM et 200 nM.

Pour les analyses phénotypiques, les concentrations utilisées sont les suivantes : Isoxabène 2 ou 5 nM, DCB 350 nM, C17 100 ou 500 nM, Hypostuntine 10 ou 15 µM et Thaxtomine A 100 nM.

Des traitements de plus courte durée (entre 1 h 30 à 14 h à l'obscurité) ont été réalisés pour les analyses en microscopie confocale, les analyses pariétales, histochimiques et transcriptomiques par RT-qPCR. Après le flash lumineux de 5 h, les plantes sont cultivées pendant trois jours. Elles sont alors transférées en milieu *Arabidopsis* liquide (sans ajout d'agar) contenant la molécule étudiée. Les concentrations de drogue utilisées sont : 100 nM d'Isoxabène (Sigma-Aldrich), 5 µM de DCB (Sigma-Aldrich), 50 µM de C17 (fourni par Zhubing Hu), 10 nM de CGA (fourni par Syngenta), 100 µM d'Hypostuntine (fourni par Deqiang Li) ou 20 µM de Thaxtomine A (Sigma-Aldrich). En ce qui concerne les analyses transcriptomiques, les concentrations choisies sont plus fortes : 600 nM d'Isoxabène, 20 µM de DCB, 100 µM de C17, 100 µM d'Hypostuntine

4.1.3. Mesure des hypocotyles

Après quatre jours de croissance, les plantes sont fixées avec du formaldéhyde 4 % directement ajouté dans la boîte de Pétri. Une centaine d'individus sont alors étalés et alignés sur une nouvelle boîte pour être scannés (scanner Epson Perfection 4990). Le logiciel d'analyse d'images Image J (Schneider et al. 2012) permet de mesurer les longueurs des hypocotyles. L'échelle de chaque image est établie grâce à un double décimètre scanné simultanément. La moyenne des tailles des hypocotyles est alors calculée pour une cinquantaine de plantes par génotype.

4.1.4. Souches et cultures bactériennes

Afin d'amplifier les plasmides nécessaires pour l'élaboration de nouvelles constructions génétiques, la souche électrocompétente DH10B d'*Escherichia coli* est utilisée et se développe à 37°C.

Afin de transformer les plants d'*Arabidopsis thaliana*, la souche C58C1Rif d'*Agrobacterium tumefaciens* est utilisée. Elle est résistante à la gentamicine et la rifampicine et se cultive à 28°C.

Les bactéries sont cultivées avec un milieu LB (Lurai Bertani, composé de NaCl 10 g/L, d'extrait de levure 5 g/L et de bactotryptone 10 g/L) liquide ou solide (Agar 1,5% (m/v)). Après électroporation, un milieu S.O.C (Invitrogen) est utilisé. Des antibiotiques peuvent être ajoutés dans le milieu de culture (en général à 100 mg/L).

4.2. Analyses pariétales

4.2.1. Microspectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Les plantes âgées de quatre jours et ayant subi les traitements à différentes concentrations de CBI sont plongées dans l'éthanol absolu afin de préserver les plantes et notamment l'état de la paroi végétale. Ces plantes sont réhydratées la veille de l'analyse dans de l'eau stérile. Pour chaque condition, cinq plantes provenant de quatre répétitions indépendantes sont étalées sur des lames recouvertes d'or (Thermo Fisher Scientific). Les échantillons sont alors laissés à température ambiante pour évaporer l'eau résiduelle.

L'acquisition des spectres d'absorption infrarouge sur une surface de 50 μm x 50 μm , située au milieu de l'hypocotyle et en dehors du cylindre central, est effectuée avec un microscope infrarouge Nicolet iN10 MX (Thermo scientific). Les vingt spectres obtenus ont une résolution de 8 cm^{-1} et sont normalisés en divisant la valeur d'absorbance d'un échantillon à un nombre d'onde donné (inverse de la longueur d'onde) par la somme des valeurs d'absorbance de tous les échantillons, pour ce même nombre d'onde. Afin de dégager des différences entre les traitements, les spectres d'absorption d'une même condition sont moyennés et analysés par regroupement hiérarchique (HCL) avec la méthode du « complete linkage » via le logiciel de traitement de données MultiExperiment Viewer (MeV). Un seuil arbitraire est fixé sur le dendrogramme ainsi obtenu pour distinguer quatre clusters.

4.2.2. Analyses biochimiques de la paroi

4.2.2.1. Extraction pariétale

Le matériel frais est immergé dans de l'éthanol 70 % à 70°C afin d'inactiver les activités enzymatiques pariétales et enlever le contenu intracellulaire. La phase éthanolique est éliminée et le résidu alcool insoluble (AIR) ainsi obtenu est lyophilisé. Une partie des polymères pectiques est ensuite extraite par chauffage pendant 1h à 100°C sous agitation vigoureuse dans une solution d'oxalate d'ammonium 0,5 % (p/v). Le surnageant contenant les pectines est collecté. Enfin, les culots issus de l'extraction avec l'oxalate d'ammonium sont remis en suspension dans de l'acétate d'ammonium 50 mM pH 5 et cinq unités d'EPG d'*Aspergillus niger* (Megazyme). Les tubes sont placés sous agitation pendant 16 h à 37°C. L'utilisation de l'endo- $\alpha(1,4)$ polygalacturonase (EPG) permet d'extraire spécifiquement certaines populations pectiques en clivant les liaisons entre les acides galacturoniques non méthylestérifiés.

4.2.2.2. Dosage des acides galacturoniques

Les acides galacturoniques des pectines extraites à l'oxalate d'ammonium et issus de la digestion EPG sont dosés par spectrophotométrie après hydrolyse acide. Une gamme étalon d'acides galacturoniques de 0 à 0,1 mg/mL est réalisée. Le surnageant de chaque

échantillon est prélevé, dilué cinq fois et conservé dans la glace. Un volume de 200 μL de ces dilutions est ajouté à 1,5 mL d'acide sulfurique pur dans des tubes à essais en verre. Une incubation de 15 min au bain marie à 100°C (les tubes sont recouverts de papier d'aluminium) permet l'hydrolyse des homogalacturonanes. Après un retour au froid de 5 min, les acides galacturoniques des échantillons sont dosés en ajoutant 25 μL de m-hydroxydiphényle (MHDP) à 0,15% (m/v) (préalablement préparé dans 2 mL de NaOH 0,125M). Après avoir vortexé et 15 min d'attente, les échantillons sont dosés à 520 nm dans des microplaques grâce au spectrophotomètre SPECTROstar Nano (BMG Labtech). La gamme étalon permet de calculer la quantité d'acides galacturoniques en $\mu\text{g}/\text{mg}$ AIR.

4.2.2.3. Dosage du méthanol

Les pectines extraites à l'oxalate d'ammonium et issues de la digestion EPG sont immergées dans du NaOH 0,05 M pendant 16 h dans la glace. Les surnageants dilués cinq fois et conservés dans la glace sont utilisés. Une gamme de méthanol de 0,01 mM à 0,4 mM est réalisée. A 50 μL de surnageant et de standard, un volume de tampon phosphate 100 mM pH 7,5 est ajouté puis 0.025 U d'alcool oxidase. Le tout est incubé 20 min à 30°C. Un volume de solution de révélation (20 μL d'acétylacétone, 28 μL d'acide acétique, 1,54 g d'acétate d'ammonium, le tout complété avec de l'eau jusqu'à 10 mL) et le mélange sont incubés 10 min à 67°C. La densité optique de la gamme et de chaque échantillon est lue à 420 nm. La gamme étalon permet de calculer la quantité de méthanol extrait. Le degré de méthylation en pourcentage de chaque échantillon correspond à la quantité de méthanol extrait divisé par la quantité d'acides galacturoniques.

4.2.2.4. Dosage des acétates

Le contenu en acétates des pectines a été déterminé grâce au kit appelé « Acetic Acid Kit » (K-ACET version 02/11; <http://www.megazyme.com/>) d'après Bensussan et al., (2015). Après lecture des échantillons à 340 nm, la gamme étalon d'acétates de 0 à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ permet de déterminer la quantité d'acétates extraite. Le degré d'acétylation des échantillons correspond à la quantité d'acétates extraite divisée par la quantité d'acides galacturoniques.

4.2.3. Empreinte des xyloglucanes par OLigo Mass Profiling (OLIMP)

Après traitement des plantules d'*Arabidopsis thaliana*, le matériel frais est immergé dans de l'éthanol 70 % à 70°C afin d'inactiver les activités enzymatiques pariétales et enlever le contenu intracellulaire. Le profil des xyloglucanes est obtenu par spectrométrie de masse (MALDI-TOF, Bruker), après digestion par d'une endoglucanase comme décrit dans Günl et al. (2010). L'abondance relative de différents rapports m/z correspondant à certains oligosaccharides avec des décorations précises est calculée en divisant l'intensité du signal pour un rapport m/z (un type d'oligosaccharide) par l'intensité totale correspondant à tous les rapports m/z (tous les types d'oligosaccharides).

4.3. Histochimie

4.3.1. Immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les pectines

4.3.1.1. Coupes d'hypocotyles en bloc de résine

Le protocole pour réaliser des coupes d'hypocotyles de plantules traitées ayant beaucoup évolué durant la thèse, seule la version finale est développée ci-après. Les plantules sont cultivées et traitées comme décrit en partie 4.1.2. Une dizaine de plantules par conditions sont utilisées. Dès lors et jusqu'à l'inclusion en blocs de résine, les plantules sont transférées dans des paniers imprimés en 3D et compatibles avec des plaques de cultures cellulaire de 12 puits. Ainsi, les plantes ne sont pas écrasées par d'éventuels coups de pinces qui serviraient à les transférer dans de nouvelles solutions, pour les différents bains qu'elles vont subir : les paniers sont transférés de plaque en plaque contenant les différentes solutions.

Les plantules sont tout d'abord immergées dans 2 mL de solution fixatrice commerciale RCL2 (Alphelys) et conservées à 4°C pendant une nuit. Deux bains de 30 min d'éthanol 70% (v/v) dans du tampon phosphate PBS 1X (préparé à partir de PBS 10X, ThermoFisher) permettent d'évacuer la solution fixatrice (contenant elle aussi 60 à 70 % d'éthanol). Ces bains se font sous une agitation légère dans de la glace. Pour une déshydratation totale des échantillons, des bains successifs d'une heure avec 90 % (v/v) d'éthanol/PBS 1X puis 96 % d'éthanol sont réalisés toujours sous agitation légère dans la glace. Un dernier bain d'une heure d'éthanol 96% à température ambiante sous agitation permet de s'assurer que les échantillons sont complètement déshydratés.

Les plantules sont alors transférées dans des fioles en verre pour l'inclusion en résine LR white Medium grade (Sigma-aldrich). Plusieurs bains successifs de 40 min dans un mélange de résine et d'éthanol absolu sous agitation sont réalisés : 1/3 résine 2/3 éthanol puis 1/2 résine 1/2 éthanol et enfin 2/3 résine 1/3 éthanol. Trois bains de 2 h dans de la résine pure se succèdent alors (le second ou le troisième pouvant se faire sur une nuit). Sous sorbonne, les plantules sont découpées au scalpel pour garder uniquement le haut des hypocotyles (avec leurs cotylédons). Les hypocotyles sont alors insérés dans des gélules remplies le plus possible de résine pure (les hypocotyles en longueur sont positionnés parallèlement à l'axe de la gélule). Nous ne possédons pas d'accélérateur de polymérisation au laboratoire à l'époque des expériences d'immunohistochimie. La polymérisation de la résine a donc lieu dans une étuve à 60°C pendant 2 jours. Une fois que les blocs sont polymérisés, ils sont retirés des gélules et peuvent être conservés plusieurs années.

Pour réaliser les coupes, les blocs sont fixés dans des supports adaptés à la forme des gélules. Un microtome Leica RM2165 permet de couper avec des lames de verre (usinées au laboratoire) les blocs de résine avec une orientation de 5°C et une épaisseur de 4 µm. Après avoir entamé le bloc et retiré ainsi les cotylédons, les coupes correspondant au haut de l'hypocotyle sont récupérées au pinceau et déposées dans un

bac d'eau pour les défroisser. Des lames adhésives de type Polysine (Thermo Scientific) permettent de recueillir les coupes. Celles-ci sont alors laissées à température ambiante pour éliminer le plus d'eau possible (et faciliter leur adhérence au support).

4.3.1.2. Marquage des coupes d'hypocotyle

Un feutre hydrophobe permet de délimiter les coupes sur les lames et éviter qu'elles soient éliminées avec les liquides si elles se décollent du support. Les anticorps primaires dirigés contre les pectines plus ou moins méthylestérifiées JIM5, JIM7, LM19, LM20 proviennent du laboratoire de Paul Knox (<http://www.plantprobes.net>). La solution stock d'anticorps est diluée au dixième avec de la solution de dilution Emerald (Cell Marque) ou de la protéine de lait 5 % (m/v) dans du PBS 1X (moins onéreux). Sur chaque lame, 500 µL de solution sont distribués entre les différentes coupes (délimitées grâce au feutre hydrophobe). Elles sont alors mises à 4°C à l'obscurité pendant une nuit. Le lendemain, les solutions d'anticorps sont délicatement retirées par pipetage et avec du papier absorbant. Deux bains de 15 min de PBS 1X à température ambiante permettent de s'assurer que l'anticorps primaire est bien évacué. L'anticorps secondaire Alexa 488 (ThermoFisher) est dilué 500 fois dans de la protéine de lait 5 % (m/v) et 500 µL par lame sont ajoutés. Pendant 3 à 5 h, les coupes sont alors incubées en chambre humide à 37°C. Comme pour l'anticorps primaire, deux bains de 15 min de PBS 1X à température ambiante permettent de nettoyer les coupes.

Afin de pouvoir comparer le marquage des anticorps avec celui de toute la paroi, une coloration au Calcofluor (marque en particulier la cellulose) est entreprise. Une solution de 0,5 % (m/v) de Calcofluor White (Sigma aldrich) est préparée dans de l'eau stérile. Comme précédemment, 500 µL sont ajoutés sur chaque lame et incubés 10 min à l'obscurité et à température ambiante. Trois lavages successifs de 10 min dans du PBS 1X à l'obscurité permet d'évacuer le colorant. Les lames sont alors montées en utilisant le milieu de montage Citifluor AF1 (Electron microscopy sciences).

4.3.2. Colorations histochimiques

4.3.2.1. Lignine ectopique

Les plantules préalablement traitées avec les CBI (voir détails partie 4.1.2) sont plongées dans l'éthanol absolu pour être fixées. Une solution de phloroglucinol-HCl (VWR) remplace alors l'éthanol pendant 5 min. Les plantules ainsi colorées sont photographiées avec une loupe Axio Zoom (ZEISS) en lumière blanche transmise.

4.3.2.2. Callose

Les plantules préalablement traitées avec les CBI (voir détails partie 4.1.2) sont plongées dans une solution de Bleu d'aniline 0,01% (m/v) préparée avec une solution de K₂HPO₄ 0,07 M pendant 10 min à température ambiante. Les échantillons sont ensuite montés entre lame et lamelles dans la solution de coloration et observés à l'Axio Zoom (ZEISS) à l'aide d'une excitation à 370 nm.

4.4. Imagerie confocale

4.4.1. Visualisation et analyse des GFPCESA par microscopie spinning disk

Les plantes *proCESA3::GFP-CESA3/cesa3^{je5}* âgées de 72 h sont incubées en milieu liquide avec la drogue à étudier pendant un temps variable de 45 min à 4 h puis elles sont placées entre lame et lamelle dans de l'eau. Le mouvement des complexes de cellulose synthase (CSC) *in vivo* est observable grâce à un microscope confocal rapide Cell Observer Z1 (ZEISS) équipé de la technologie spinning disk. Une diode à 488 nm permet d'exciter la GFP associée au CSC, émettant alors de la fluorescence qui est recueillie par une caméra QuantEM 512 (Photometrics) avec un filtre de 500-550 nm. La zone étudiée est située en haut de l'hypocotyle, où les cellules s'allongent.

La localisation des CSC est observée pour une dizaine de cellules provenant de dix plantules différentes par condition (temps d'incubation et type de drogue), avec des films de 7 min à 10 min et 5 ou 10 s d'intervalle entre chaque acquisition d'image. La projection temporelle de toutes les acquisitions d'un même film est réalisée grâce au logiciel Image J.

La vitesse des CSC est ensuite déterminée pour les temps d'incubation où l'effet du traitement est le plus prononcé. Pour cela, une vingtaine de films permettent de calculer la vitesse de plus de 600 CSC pour chaque drogue. Des kymographes sont réalisés avec le logiciel Image J : le déplacement des CSC en fonction du temps peut alors être mis en évidence.

4.4.2. Visualisation des coupes immunohistochimiques

Les coupes d'hypocotyles de plantules traitées avec les CBI ont été montées entre lame et lamelle comme décrit précédemment (voir partie 4.3.1). Elles sont alors observées au microscope confocale ZEISS 710 avec une excitation à 488 nm grâce à un laser Argon et une gamme d'émission acquise entre 500 et 550 nm. Les coupes n'étant pas toujours alignées dans un même plan focal, des Z-stacks (pile d'images de différents plans focaux réalisée par Image J) permettent de reconstituer la coupe entière.

4.5. Génotypage

De nombreuses lignées correspondantes à différents génotypes (voir partie 4.1.1) ont été amplifiées en serre et ont été génotypées. Les parties suivantes ont donc été utilisées pour les différents axes de la thèse.

4.5.1. Extraction d'ADN génomique

L'ADN a été extrait à partir de plantes cultivées *in vitro* ou à partir de portions de feuilles prélevées à partir de plantes cultivées en serre (pour le génotypage de plantes transgéniques notamment), en suivant un protocole adapté de celui de la méthode Quick Dellaporta (Edwards et al., 1991). Le matériel biologique a été broyé à l'aide de grains de sable dans 50 μL de tampon d'extraction. 350 μL de tampon d'extraction ont ensuite été ajoutés, puis les microtubes ont été vortexés cinq secondes. Une centrifugation d'une minute à 15 000 tours/minute a été réalisée. Le surnageant a été transféré dans un autre tube et 350 μL d'isopropanol sont ajoutés. La solution a été homogénéisée par retournement doux, afin de favoriser la précipitation de l'ADN. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 15 000 tours/minute pendant cinq minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot lavé par une solution d'éthanol à 70%, puis une nouvelle centrifugation de cinq minutes à 15 000 tours/minute a été réalisée. Le surnageant à nouveau a été rejeté puis le culot a été séché sous hotte. Une fois sec le culot est resuspendu dans 50 μL de tampon TE (Tris-HCl pH 7,5 (10mM), EDTA (1mM), RNase (0,1 mg/ml)) et est conservé à une température de - 20°C.

4.5.2. Quantification de l'ADN extrait

Les quantités d'ADN génomique ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). 1 μL d'échantillon a été déposé sur la surface de mesure. Les informations obtenues, notamment la valeur d'absorbance à 260 nm permet de calculer la concentration en acides nucléiques (ng/ μL). Les rapports d'absorbance 260/280 et 260/230 renseignent de la qualité de l'échantillon, notamment sur la présence éventuelle de contaminants phénoliques ou protéiques. En théorie, le rapport 260/280 pour de l'ADN pur est aux alentours de 1,8.

4.5.3. Amplification de l'ADN par PCR (polymerase chain reaction)

L'ADN extrait est dilué au 1/100 (10 ng/ μL), et 1 μL de cette solution diluée est déposé dans chacun des puits des tubes PCR. En parallèle un mélange PCR est préparé qui contient un tampon DreamTaq Polymerase (Thermo Fisher), des amorces spécifiques de la région dont l'amplification est recherchée, de désoxyribonucléotides triphosphatés (dNTP), de l'enzyme de polymérisation DreamTaq polymérase (Thermo Fisher), et d'eau pure pour compléter le volume. 100 μL de mélange sont ainsi préparés : 10 μL tampon Taq 10X, 2 μL dNTP 10 mM, 2 μL amorce sens F 10 μM , 2 μL amorce anti-sens R 10 μM , 4 μL Dream Taq, complété avec de l'eau stérile jusqu'à 100 μL .

24 μL du mélange PCR est ajouté au 1 μL d'ADN. L'ADN est ensuite amplifié grâce à un thermocycleur programmable par une PCR de 35 cycles comprenant une dénaturation initiale à 95°C (dés hybridation du double brin d'ADN). Ensuite s'en suit une phase d'hybridation permettant l'appariement des amorces, la température de cette phase dépend de la température de fusion (T_m) des amorces. Puis vient ensuite une phase d'élongation à 72°C au cours de laquelle la Taq polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN matrice, en utilisant les dNTP comme substrat. La durée de cette étape dépend de la longueur de la région à amplifier. Enfin une phase d'élongation finale permet l'élongation complète de tous les brins amplifiés (15 min à 72°C).

4.5.4. Visualisation des produits PCR sur gel d'agarose

Les acides nucléiques mis en présence de bleu de charge (BlueJuice Gel Loading Buffer, Invitrogen) (1 μL pour 10 μL d'ADN) sont séparés à l'aide d'un gel d'agarose (Sigma aldrich), de 0,8 à 2,5 % (m/v). Ce dernier a été préparé dans une solution TAE 0,5 X (Tris-Acétate 20 mM et EDTA 0,5 mM) contenant 0,1 mg/ μL de bromure d'éthidium (VWR). Cet élément est dit intercalant de l'ADN et permet la visualisation des acides nucléiques sous une lumière ultra-violette. Un marqueur de poids moléculaire (1 Kb ou 1 Kb Plus, invitrogen) permet d'estimer la taille des fragments d'ADN. L'électrophorèse est effectuée pendant 15 à 45 min à 100 V.

4.5.5. Séquençage de l'ADN

Certains fragments d'ADN amplifiés par PCR sont séquencés pour vérifier par la présence de mutations. Pour cela, l'ADN est envoyé à la société GATC (Eurofin) selon les recommandations de l'entreprise.

4.6. Analyse de l'expression de gènes par RT-qPCR

Après une croissance de 72 h, les plantes sont incubées dans un milieu liquide contenant les drogues pendant 1 h, 3 h, 6 h et 24 h. Le témoin correspond à des plantes incubées en présence de DMSO. Suite à ces différents traitements, les plantules sont plongées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C. Les ARN sont extraits des plantules avec le kit RNeasy Plant Mini (Qiagen) et repris dans un volume final de 30 µL d'eau RNase-Free. Afin d'éliminer l'ADN résiduel pouvant perturber la suite de l'expérience, les ARN sont traités par une enzyme DNase avec le kit « DNase I, Amplification Grade » (Invitrogen). Une fois la réaction stoppée, les ARN sont dosés par spectrométrie grâce à un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Son intégrité est également vérifiée en analysant quelques µL avec un bioanalyseur Agilent 2100 (Nano Chip Kit).

La conversion de 1 µg d'ARN en ADN complémentaire (ADNc) est effectuée avec un kit de synthèse d'ADNc « RevertAid H Minus » (Thermo Scientific). En fin de réaction, l'ADNc obtenu est dosé avec le Nanodrop 1000. Tous les échantillons sont alors stockés à -20°C. L'ADNc est dilué à une concentration de 250 ng/µL pour tous les échantillons. La PCR quantitative en temps réel est réalisée avec un appareil de détection CFX Connect (Bio-Rad) et à l'aide du Supermix SYBR Green SsoAdvanced Universal (Bio-Rad). La réaction suit le protocole suivant : 3 min à 98°C pour dénaturer les brins d'ADN, une succession de 39 cycles avec 10 s à 98°C pour la dénaturation suivie de 20 s à 56°C pour hybrider les amorces et 20 s à 72°C pour l'élongation. Après ces cycles, une dernière étape de montée progressive en température de 65°C à 95°C permet de réaliser des courbes de fusion afin de visualiser la bonne amplification de l'ADN.

Les amorces utilisées correspondent à des gènes marqueurs associés à différentes voies de signalisation (Annexe 3). Ces amorces ont été déterminées grâce à la littérature et à divers outils de bioinformatique : TAIR pour la base de données génétiques, BLAST pour déterminer les séquences homologues du génome et Primer3web pour le design des amorces (disponibles en ligne). Les amorces sont dans un premier temps validées par PCR afin de vérifier qu'elles permettent une bonne amplification de l'ADN.

Pour chaque échantillon, trois réplicats techniques permettent de déterminer un cycle quantitatif (Cq) moyen qui permet de mesurer le niveau d'expression du gène testé. Pour cela, l'expression est relativisée par rapport au Cq du traitement témoin (DMSO) et ensuite normalisée par celui d'un gène de référence (dont l'expression reste inchangée selon les traitements) : *POLYUBIQUITINE 4* (UBI4) ou le gène *TIP41*. Chaque expérience est alors répétée trois fois avec des ARN provenant de différents lots de plantes.

4.7. Constructions génétiques par recombinaison *in vitro*

4.7.1. Mutagenèse de *CESA1* et de *CESA3*

Afin de créer les nouvelles constructions génétiques, le clonage par recombinaison *in vitro* Gateway™ est utilisé. Ce système repose sur l'utilisation des mécanismes d'intégration d'ADN du phage I dans le génome d'*Escherichia coli*. Cette technologie repose sur trois étapes : (1) amplification de l'ADNc de *CESA1* ou *CESA3* (2) insertion de la séquence dans un vecteur d'entrée pDONR207 (3) recombinaison de la séquence vers un vecteur d'expression *pGWB2* modifié en remplaçant le promoteur 35S par le promoteur du gène *CESA1* ou *CESA3*. Les vecteurs *pDONR207* et *pGWB2* avec les séquences de *CESA1* ou *CESA3* sont disponibles au laboratoire (Desprez et al., 2007).

Pour intégrer les mutations « cesa-like » désirées, des amorces spécifiques sont désignées avec au milieu de la séquence des changements de nucléotides (Annexe 3). Une mutagenèse dirigée en utilisant le kit Phusion Site-Directed Mutagenesis (Thermo Fisher) permet d'intégrer ces mutations avec les amorces, dans le vecteur *pDONR207* contenant l'ADNc de *CESA1* ou *CESA3*. Les recommandations du kit sont respectées et le résultat de la mutagenèse est vérifié par séquençage (avec les amorces décrites en Annexe 3).

La réaction LR de la technique Gateway™ permet de transférer la séquence d'ADNc mutée « cesa-like » vers le vecteur d'expression *pGWB2* grâce aux recommandations du kit LR Clonase (Invitrogen). Une dernière vérification par séquençage permet de s'assurer que le vecteur final est correct. Après extraction de l'ADN plasmidique, les *Agrobacterium tumefaciens* électrocompétentes peuvent être transformées avec le plasmide final.

4.7.2. Transformation des bactéries par électroporation

Pour intégrer les plasmides dans les bactéries électrocompétentes, une cuve à électroporation de 1 mL est utilisée dans la glace. 1 µL de plasmide (50 ng/µL) est mélangé avec 40 µL de bactéries. L'électroporation a lieu avec une tension de 1,25 kV. 700 µL de milieu S.O.C sont alors ajoutés. Après 1 h de culture sous agitation à 37°C pour *Escherichia coli* et 28°C pour *Agrobacterium tumefaciens*, les bactéries transformées sont étalées sur milieu LB solide contenant l'antibiotique permettant la sélection du plasmide. 24 h de culture à 37°C sont nécessaires pour *Escherichia coli* et deux jours à 28°C pour *Agrobacterium tumefaciens*.

4.7.3. Extraction d'ADN plasmidique

Après culture en milieu solide, les colonies sont visibles sur la boîte de Pétri. Chaque colonie peut être reprise dans un milieu LB liquide pour une nuit de culture supplémentaire. L'ADN plasmidique peut alors être extrait. Pour cela, le kit NucleoSpin Plasmid (Macherey–nagel Düren) a été utilisé et appliqué selon les directives du fournisseur. L'ADN est élué avec 30 µL d'eau stérile.

4.7.4. Transformation des plantes par *Agrobacterium tumefaciens*

Les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* portant le vecteur final sont sélectionnées sur un milieu LB avec de la rifampicine 50 mg/L, gentamicine 25 mg/L et l'antibiotique permettant de sélectionner le plasmide c'est-à-dire kanamycine à 50 mg/L. Les clones obtenus sont alors cultivés dans 3 mL de milieu liquide pendant une nuit. La pré-culture est alors ajoutée à 500 mL de milieu liquide avec les antibiotiques précédents. Une fois que la DO de la culture mesurée par spectrophotométrie est aux alentours de 0,8 les bactéries sont récupérées. Pour cela, elles sont centrifugées pendant 15 min à 6000g et à 4°C puis resuspendues avec une solution de saccharose 5% (m/v). Du Silwet (Witco) est ajouté à 0,05% (v/v) dans la suspension de bactéries juste avant transformation. Pour cela, les jeunes fleurs d'*Arabidopsis thaliana* de génotypes *cesa1^{rsw1-10}* ou *cesa3^{je5}* sont trempées pendant 2 min dans la solution de transformation.

Après maturation des plantes transformées, les graines sont récoltées rapidement. Pour retrouver les plantes contenant la construction « *cesa-like* », les graines sont semées sur milieu *Arabidopsis* avec les antibiotiques : kanamycine et hygromycine. Seules les plantules survivantes sont alors transférées en serre. Chaque plante est alors unique puisque la nouvelle construction est insérée aléatoirement dans le génome.

4.8. Analyses statistiques

La majorité des tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 7. Dans le cadre des tests de résistance aux CBI et le marquage de la callose, la normalité des données est présumée car la taille d'échantillonnage est conséquente et permet alors de réaliser des t-test non appariés (avec correction Welch, pour des égalités de variance non présumées) entre la condition de traitement et le témoin DMSO. Les t-tests des expériences de microspectroscopie FT-IR ont été effectués selon le protocole mis en place par Mouille et al. (2003). En ce qui concerne les données de biochimie, des tests ANOVA suivis d'un test LSD de Fisher a permis de déterminer les différences significatives entre les profils des conditions de traitement, par rapport au contrôle DMSO. Enfin, en ce qui concerne l'étude de l'expression de gènes sur le long terme, un test ANOVA suivi d'un test Kruskal-Wallis permet de déterminer quel traitement au CBI présente des différences d'expression significatives avec le traitement DMSO.

5. BIBLIOGRAPHIE

AMOR, Y, HAIGLER, C H, JOHNSON, S, WAINSCOTT, M et DELMER, D P, 1995. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 26 septembre 1995. Vol. 92, n° 20, p. 9353-9357. DOI 10.1073/pnas.92.20.9353.

ANDERSON, C T, CARROLL, A, AKHMETOVA, L et SOMERVILLE, C, 2009. Real-time imaging of cellulose reorientation during cell wall expansion in Arabidopsis roots. In : *Plant Physiol* [en ligne]. 2009/12/08. 2009. Vol. 152, n° 2, p. 787-796. DOI pp.109.150128 [pii]10.1104/pp.109.150128.

ARIOLI, Tony, PENG, Liangcai, BETZNER, Andreas S, BURN, Joanne, WITTKE, Werner, HERTH, Werner, CAMILLERI, Christine, HÖFTE, Herman, PLAZINSKI, Jacek, BIRCH, Rosemary, CORK, Ann, GLOVER, Julie, REDMOND, John et WILLIAMSON, Richard E, 1998. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis. In : *Science* [en ligne]. 30 janvier 1998. Vol. 279, n° 5351, p. 717-720. DOI 10.1126/science.279.5351.717.

ATANASSOV, Ivan I, PITTMAN, Jon K et TURNER, Simon R, 2009. Elucidating the mechanisms of assembly and subunit interaction of the cellulose synthase complex of Arabidopsis secondary cell walls. In : *The Journal of biological chemistry* [en ligne]. 6 février 2009. Vol. 284, n° 6, p. 3833-41. DOI 10.1074/jbc.M807456200.

AYERS, A R, VALENT, B, EBEL, J et ALBERSHEIM, P, 1976. Host-Pathogen Interactions: XI. Composition and Structure of Wall-released Elicitor Fractions. In : *Plant physiology* [en ligne]. 1 mai 1976. Vol. 57, n° 5, p. 766-74. DOI 10.1104/pp.57.5.766.

BACETE, Laura, MÉLIDA, Hugo, MIEDES, Eva et MOLINA, Antonio, 2018. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. In : *Plant Journal* [en ligne]. 1 février 2018. Vol. 93, n° 4, p. 614-636. DOI 10.1111/tpj.13807.

BALESTRIERI, Ciro, CASTALDO, Domenico, GIOVANE, Alfonso, QUAGLIUOLO, Lucio et SERVILLO, Luigi, 1990. A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). In : *European Journal of Biochemistry* [en ligne]. 1 octobre 1990. Vol. 193, n° 1, p. 183-187. DOI 10.1111/j.1432-1033.1990.tb19321.x.

BARBEZ, Elke, DÜNSER, Kai, GAIDORA, Angelika, LENDL, Thomas et BUSCH, Wolfgang, 2017. Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in Arabidopsis thaliana. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2017. Vol. 114, n° 24, p. E4884-E4893. DOI 10.1073/pnas.1613499114.

BARNESLEY, G. E. et ROSHER, P. H., 1961. The relationship between the herbicidal effect of 2,6-Dichlorobenzonitrile and its persistence in the soil. In : *Weed Research* [en ligne]. 1 juin 1961. Vol. 1, n° 2, p. 147-158. DOI 10.1111/j.1365-3180.1961.tb00016.x.

BAROJA-FERNANDEZ, E., MUNOZ, F. J., BAHAJI, A., ALMAGRO, G. et POZUETA-ROMERO, J., 2012. Reply to Smith et al.: No evidence to challenge the current paradigm on starch and cellulose biosynthesis involving sucrose synthase activity. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 3 avril 2012. Vol. 109, n° 14, p. E777-E777.

DOI 10.1073/pnas.1201538109.

BARROS, Jaime, SERK, Henrik, GRANLUND, Irene et PESQUET, Edouard, 2015. The cell biology of lignification in higher plants. In : *Annals of Botany*. 2015. Vol. 115, n° 7, p. 1053-1074. DOI 10.1093/aob/mcv046.

BARTELS, Sebastian et BOLLER, Thomas, 2015. Quo vadis, Pep? Plant elicitor peptides at the crossroads of immunity, stress, and development. In : *Journal of Experimental Botany* [en ligne]. 1 août 2015. Vol. 66, n° 17, p. 5183-5193. DOI 10.1093/jxb/erv180.

BASAK, Rajib et BANDYOPADHYAY, Ranjini, 2014. Formation and rupture of Ca²⁺ induced pectin biopolymer gels. In : *Soft Matter* [en ligne]. 2014. Vol. 10, n° 37, p. 7225-7233. DOI 10.1039/c4sm00748d.

BASHLINE, L, LI, S, ANDERSON, C T, LEI, L et GU, Y, 2013. The Endocytosis of Cellulose Synthase in Arabidopsis Is Dependent on mu2, a Clathrin-Mediated Endocytosis Adaptin. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2013/07/12. 2013. Vol. 163, n° 1, p. 150-160. DOI 10.1104/pp.113.221234.

BASHLINE, Logan, LI, Shundai et GU, Ying, 2014. The trafficking of the cellulose synthase complex in higher plants. In : *Annals of Botany* [en ligne]. 1 octobre 2014. Vol. 114, n° 6, p. 1059-1067. DOI 10.1093/aob/mcu040.

BASHLINE, Logan, LI, Shundai, ZHU, Xiaoyu et GU, Ying, 2015. The TWD40-2 protein and the AP2 complex cooperate in the clathrin-mediated endocytosis of cellulose synthase to regulate cellulose biosynthesis. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2015. Vol. 112, n° 41, p. 12870-12875. DOI 10.1073/pnas.1509292112.

BASKIN, T I, BETZNER, A S, HOGGART, R, CORK, A et WILLIAMSON, R E, 1992. Root morphology mutants in Arabidopsis thaliana. In : *Aust. J. Plant Physiol.* 1992. Vol. 19, p. 427-437.

BASKIN, Tobias I, 2001. On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. In : *Protoplasma* [en ligne]. 2001. Vol. 215, p. 150-171.

BELKHADIR, Y, YANG, L, HETZEL, J, DANGL, J L et CHORY, J, 2014. The growth-defense pivot: crisis management in plants mediated by LRR-RK surface receptors. In : *Trends Biochem Sci* [en ligne]. 2014. DOI 10.1016/j.tibs.2014.06.006.

BELLINCAMPI, D, CARDARELLI, M, ZAGHI, D, SERINO, G, SALVI, G, GATZ, C, CERVONE, F, ALTAMURA, M M, COSTANTINO, P et LORENZO, G D, 1996. Oligogalacturonides Prevent Rhizogenesis in rolB-Transformed Tobacco Explants by Inhibiting Auxin-Induced Expression of the rolB Gene. In : *The Plant Cell* [en ligne]. 1996/03/01. 1996. Vol. 8, n° 3, p. 477-487. DOI 10.1105/tpc.8.3.477.

BENDER, Kyle W., WANG, Xuejun, CHENG, George B., KIM, Hyoungh Seok, ZIELINSKI, Raymond E. et HUBER, Steven C., 2015. Glutaredoxin AtGRXC2 catalyses inhibitory glutathionylation of Arabidopsis BRI1-associated receptor-like kinase 1 (BAK1) in vitro. In : *Biochemical Journal* [en ligne]. 1 mai 2015. Vol. 467, n° 3, p. 399-413.

DOI 10.1042/BJ20141403.

BENFEY, Philip N., LINSTEAD, Paul J., ROBERTS, Keith, SCHIEFELBEIN, John W., HAUSER, Marie-Theres et AESCHBACHER, Roger A., 1993. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. In : *Development* [en ligne]. 1993. Vol. 119, n° 1, p. 57-70.

BIBIKOVA, Tatiana N, JACOB, Tobias, DAHSE, Ingo et GILROY, Simon, 1998. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. In : *Development (Cambridge, England)* [en ligne]. 1998. Vol. 125, n° 15, p. 2925-2934.

BISCHOFF, V, COOKSON, S J, WU, S et SCHEIBLE, W R, 2009. Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. In : *J Exp Bot* [en ligne]. 2009/03/10. 2009. Vol. 60, n° 3, p. 955-965. DOI 10.1093/jxb/ern344 [pii] 10.1093/jxb/ern344.

BISCHOFF, Volker, COOKSON, Sarah Jane, WU, Shuang et SCHEIBLE, Wolf Rüdiger, 2009. Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. In : *Journal of Experimental Botany*. 2009. Vol. 60, n° 3, p. 955-965. DOI 10.1093/jxb/ern344.

BISCHOFF, Volker, DESPREZ, Thierry, MOUILLE, Gregory, VERNHETTES, Samantha, GONNEAU, Martine et HÖFTE, Herman, 2011. Phytochrome regulation of cellulose synthesis in *Arabidopsis*. In : *Current Biology*. 2011. Vol. 21, n° 21, p. 1822-1827. DOI 10.1016/j.cub.2011.09.026.

BISGROVE, Sherryl R. et KROPF, Darryl L., 2001. Cell wall deposition during morphogenesis in fucoid algae. In : *Planta* [en ligne]. 2001. Vol. 212, n° 5-6, p. 648-658. DOI 10.1007/s004250000434.

BLACKWELL, Helen E et ZHAO, Yunde, 2003. Chemical Genetic Approaches to Plant Biology. In : *Plant Physiol.* [en ligne]. 2003. Vol. 133, n° 2, p. 448-455. DOI 10.1104/pp.103.031138.

BLANCO-ULATE, Barbara, MORALES-CRUZ, Abraham, AMRINE, Katherine C. H., LABAVITCH, John M, POWELL, Ann L. T. et CANTU, Dario, 2014. Genome-wide transcriptional profiling of *Botrytis cinerea* genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 2014. Vol. 5. DOI 10.3389/fpls.2014.00435.

BOEX-FONTVIEILLE, Edouard, DAVANTURE, Marlène, JOSSIER, Mathieu, ZIVY, Michel, HODGES, Michael et TCHERKEZ, Guillaume, 2014. Photosynthetic activity influences cellulose biosynthesis and phosphorylation of proteins involved therein in *Arabidopsis* leaves. In : *Journal of Experimental Botany* [en ligne]. 1 septembre 2014. Vol. 65, n° 17, p. 4997-5010. DOI 10.1093/jxb/eru268.

BOISSON-DERNIER, A, ROY, S, KRITSAS, K, GROBEI, M A, JACIUBEK, M, SCHROEDER, J I et GROSSNIKLAUS, U, 2009. Disruption of the pollen-expressed FERONIA homologs ANXUR1 and ANXUR2 triggers pollen tube discharge. In : *Development* [en ligne]. 2009/09/09. 2009. Vol. 136, n° 19, p. 3279-3288. DOI 10.1093/dev.040071 [pii]10.1242/dev.040071.

BOISSON-DERNIER, Aurélien, KESSLER, Sharon A. et GROSSNIKLAUS, Ueli, 2011. The walls have ears: The role of plant CrRLK1Ls in sensing and transducing extracellular signals. In : *Journal of Experimental Botany*. 2011. Vol. 62, n° 5, p. 1581-1591. DOI 10.1093/jxb/erq445.

BOISSON-DERNIER, Aurélien, LITUIEV, Dmytro S., NESTOROVA, Anna, FRANCK, Christina Maria, THIRUGNANARAJAH, Sharme et GROSSNIKLAUS, Ueli, 2013. ANXUR Receptor-Like Kinases Coordinate Cell Wall Integrity with Growth at the Pollen Tube Tip Via NADPH Oxidases. In : NASRALLAH, June B. (éd.), *PLoS Biology* [en ligne]. 26 novembre 2013. Vol. 11, n° 11, p. e1001719. DOI 10.1371/journal.pbio.1001719.

BOSCA, S, BARTON, C J, TAYLOR, N G, RYDEN, P, NEUMETZLER, L, PAULY, M, ROBERTS, K et SEIFERT, G J, 2006. Interactions between MUR10/CesA7-dependent secondary cellulose biosynthesis and primary cell wall structure. In : *Plant Physiol* [en ligne]. 2006/10/17. 2006. Vol. 142, n° 4, p. 1353-1363. DOI pp.106.087700 [pii] 10.1104/pp.106.087700.

BOUDAUD, Arezki, 2010. An introduction to the mechanics of morphogenesis for plant biologists. In : *Trends in Plant Science* [en ligne]. 1 juin 2010. Vol. 15, n° 6, p. 353-360. DOI 10.1016/J.TPLANTS.2010.04.002.

BOUTROT, Freddy et ZIPFEL, Cyril, 2017. Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. In : *Annual Review of Phytopathology* [en ligne]. 2017. Vol. 55, n° 1, p. 257-286. DOI 10.1146/annurev-phyto-080614-120106.

BOWLING, A J et BROWN JR., R M, 2008. The cytoplasmic domain of the cellulose-synthesizing complex in vascular plants. In : *Protoplasma* [en ligne]. 2008. Vol. 233, n° 1-2, p. 115-127. DOI 10.1007/s00709-008-0302-2.

BOYCE, C K, ZWIENIECKI, M A, CODY, G D, JACOBSEN, C, WIRICK, S, KNOLL, A H et HOLBROOK, N M, 2004. Evolution of xylem lignification and hydrogel transport regulation. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* [en ligne]. 2004/12/03. 2004. Vol. 101, n° 50, p. 17555-17558. DOI 0408024101 [pii]10.1073/pnas.0408024101.

BOYER, J S, 2009. Cell wall biosynthesis and the molecular mechanism of plant enlargement. In : *Functional Plant Biology*. 2009. Vol. 36, p. 383-394.

BRABHAM, Chad et DEBOLT, Seth, 2013. Chemical genetics to examine cellulose biosynthesis. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 29 janvier 2013. Vol. 3, p. 309. DOI 10.3389/fpls.2012.00309.

BRABHAM, Chad, LEI, Lei, GU, Ying, STORK, Jozsef, BARRETT, Michael et DEBOLT, S., 2014. Indaziflam Herbicidal Action: A Potent Cellulose Biosynthesis Inhibitor. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2014. Vol. 166, n° 3, p. 1177-1185. DOI 10.1104/pp.114.241950.

BRADLEY, Desmond J, KJELLBOM, Per et LAMB, Christopher J, 1992. *Elicitor-and Wound-Induced Oxidative Cross-Linking of a Proline-Rich Plant Cell Wall Protein: A Novel, Rapid Defense Response* [en ligne]. S.l. [Consulté le 8 août 2018]. Disponible à l'adresse : https://ac.els-cdn.com/009286749290530P/1-s2.0-009286749290530P-main.pdf?_tid=11dcd0bd-83e5-4cc4-9bc4-9b1bb90c8abf&acdnat=1533728068_a591ab4d8b091ce250d8d590ef5c4f65.

BRADY, S. M., SONG, S., DHUGGA, K. S., RAFALSKI, J. A. et BENFEY, P. N., 2006. Combining Expression and Comparative Evolutionary Analysis. The COBRA Gene Family. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2006. Vol. 143, n° 1, p. 172-187. DOI 10.1104/pp.106.087262.

BRANCA, C., LORENZO, G. De et CERVONE, F., 1988. Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by α -D-oligogalacturonides in pea stem segments. In : *Physiologia Plantarum* [en ligne]. 1 mars 1988. Vol. 72, n° 3, p. 499-504. DOI 10.1111/j.1399-3054.1988.tb09157.x.

BRAYBROOK, S A, HOFTE, H et PEAUCELLE, A, 2012. Probing the mechanical contributions of the pectin matrix: Insights for cell growth. In : *Plant Signaling and Behavior*. 2012. Vol. 7, n° 8. DOI 10.4161/psb.20768.

BRINGMANN, M., LI, E., SAMPATHKUMAR, A., KOCABEK, T., HAUSER, M.-T. et PERSSON, S., 2012. POM-POM2/CELLULOSE SYNTHASE INTERACTING1 Is Essential for the Functional Association of Cellulose Synthase and Microtubules in Arabidopsis. In : *The Plant Cell* [en ligne]. 2012. Vol. 24, n° 1, p. 163-177. DOI 10.1105/tpc.111.093575.

BRINGMANN, Martin, LANDREIN, Benoit, SCHUDOMA, Christian, HAMANT, Olivier, HAUSER, Marie Theres et PERSSON, Staffan, 2012. *Cracking the elusive alignment hypothesis: The microtubule-cellulose synthase nexus unraveled* [en ligne]. 1 novembre 2012. S.l.: Elsevier Current Trends. [Consulté le 27 juillet 2018]. ISBN 1360-1385. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136013851200129X?via%3Dihub>.

BROCARD-GIFFORD, Inè, 2004. The Arabidopsis thaliana ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 Locus Encodes a Novel Protein Mediating Abscisic Acid and Sugar Responses Essential for Growth. In : *THE PLANT CELL ONLINE* [en ligne]. 2004. Vol. 16, n° 2, p. 406-421. DOI 10.1105/tpc.018077.

BROSNAN, J. T., MCCULLOUGH, P. E. et BREEDEN, G. K., 2011. Smooth Crabgrass Control with Indaziflam at Various Spring Timings. In : *Weed Technology* [en ligne]. 20 septembre 2011. Vol. 25, n° 03, p. 363-366. DOI 10.1614/WT-D-11-00005.1.

BROWN, D M, ZEEF, L A, ELLIS, J, GOODACRE, R et TURNER, S R, 2005. Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. In : *Plant Cell* [en ligne]. 2005. Vol. 17, n° 8, p. 2281-2295. DOI tpc.105.031542 [pii] 10.1105/tpc.105.031542.

BRUMMER, Benno, FELLE, Hubert et PARISH, Roger W., 1984. Evidence that acid solutions induce plant cell elongation by acidifying the cytosol and stimulating the proton pump. In : *FEBS Letters* [en ligne]. 3 septembre 1984. Vol. 174, n° 2, p. 223-227. DOI 10.1016/0014-5793(84)81162-X.

BRUTUS, Alexandre, SICILIA, Francesca, MACONE, Alberto, CERVONE, Felice et DE LORENZO, Giulia, 2010. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 18 mai 2010. Vol. 107, n° 20, p. 9452-9457. DOI 10.1073/pnas.1000675107.

BÜCHERL, Christoph A, JARSCH, Iris K, SCHUDOMA, Christian, SEGONZAC, Cécile,

MBENGUE, Malick, ROBATZE, Silke, MACLEAN, Daniel, OTT, Thomas et ZIPFE, Cyril, 2017. Plant immune and growth receptors share common signalling components but localise to distinct plasma membrane nanodomains. In : *eLife*. 2017. Vol. 6, p. 1-28. DOI 10.7554/eLife.25114.

BURK, D H, LIU, B, ZHONG, R, MORRISON, W H et YE, Z H, 2001. A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. In : *Plant Cell* [en ligne]. 2001. Vol. 13, n° 4, p. 807--28.

BURTON, R A, GIBB, D M, BACIC, A, FINDLAY, K, ROBERTS, K, HAMILTON, A, BAULCOMBE, D et FINCHER, G B, 2000. Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. In : *The Plant Cell*. 2000. Vol. 12, p. 691-705.

BURTON, Rachel A. et FINCHER, Geoffrey B., 2014. Plant cell wall engineering: Applications in biofuel production and improved human health. In : *Current Opinion in Biotechnology* [en ligne]. 2014. Vol. 26, p. 79-84. DOI 10.1016/j.copbio.2013.10.007.

CAARLS, Lotte, ELBERSE, Joyce, AWWANAH, Mo, LUDWIG, Nora R, DE VRIES, Michel, ZEILMAKER, Tieme, VAN WEES, Saskia C M, SCHUURINK, Robert C et VAN DEN ACKERVEKEN, Guido, 2017. Arabidopsis JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 13 mai 2017. Vol. 114, n° 24, p. 6388-6393. DOI 10.1073/pnas.1701101114.

CABANNE, F., LEFEBVRE, A. et SCALLA, R., 1987. Behaviour of the herbicide EL-107 in wheat and rape grown under controlled conditions. In : *Weed Research* [en ligne]. 1 avril 1987. Vol. 27, n° 2, p. 135-142. DOI 10.1111/j.1365-3180.1987.tb00746.x.

CAESAR, Katharina, THAMM, Antje M.K., WITTHÖFT, Janika, ELGASS, Kirstin, HUPPENBERGER, Peter, GREFEN, Christopher, HORAK, Jakub et HARTER, Klaus, 2011. Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. In : *Journal of Experimental Botany* [en ligne]. novembre 2011. Vol. 62, n° 15, p. 5571-5580. DOI 10.1093/jxb/err238.

CAMERON, Randall G., LUZIO, Gary A., GOODNER, Kevin et WILLIAMS, Martin A.K., 2008. Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methylesterase from citrus: I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. In : *Carbohydrate Polymers* [en ligne]. 24 janvier 2008. Vol. 71, n° 2, p. 287-299. DOI 10.1016/j.carbpol.2007.07.007.

CANNON, M C, TERNEUS, K, HALL, Q, TAN, L, WANG, Y, WEGENHART, B L, CHEN, L, LAMPORT, D T, CHEN, Y et KIELISZEWSKI, M J, 2008. Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* [en ligne]. 2008. Vol. 105, n° 6, p. 2226-2231.

CAÑO-DELGADO, Ana, PENFIELD, Steven, SMITH, Caroline, CATLEY, Merryn et BEVAN, Michael, 2003. Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in Arabidopsis thaliana. In : *Plant Journal*. 2003. Vol. 34, n° 3, p. 351-362. DOI 10.1046/j.1365-313X.2003.01729.x.

CARPITA, N C, 1985. Tensile strength of cell walls of living cells. In : *Plant physiology* [en ligne]. octobre 1985. Vol. 79, n° 2, p. 485-488. DOI 10.1104/pp.79.2.485.

CARROLL, A, MANSOORI, N, LI, S, LEI, L, VERNHETTES, S, VISSER, R G, SOMERVILLE, C, GU, Y et TRINDADE, L M, 2012. Complexes with mixed primary and secondary cellulose synthases are functional in *Arabidopsis thaliana* plants. In : *Plant Physiol* [en ligne]. 2012/08/29. 2012. DOI pp.112.199208 [pii]10.1104/pp.112.199208.

CARROLL, Andrew et SPECHT, Chelsea D., 2011. Understanding Plant Cellulose Synthases through a Comprehensive Investigation of the Cellulose Synthase Family Sequences. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 2011. Vol. 2. DOI 10.3389/fpls.2011.00005.

CHADWICK, Arthur V et BURG, Stanley P, 1967. An explanation of the inhibition of root growth caused by indole-3-acetic Acid. In : *Plant physiology* [en ligne]. 1967. Vol. 42, n° 3, p. 415-420. DOI 10.1104/pp.42.3.415.

CHAN, J., 2012. *Microtubule and cellulose microfibril orientation during plant cell and organ growth* [en ligne]. 2012. S.l. : s.n. [Consulté le 4 juillet 2018]. ISBN 4416034504. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2818.2011.03585.x>.

CHAN, J., CROWELL, E., EDER, M., CALDER, G., BUNNEWELL, S., FINDLAY, K., VERNHETTES, S., HOFTE, H. et LLOYD, C., 2010. The rotation of cellulose synthase trajectories is microtubule dependent and influences the texture of epidermal cell walls in *Arabidopsis hypocotyls*. In : *Journal of Cell Science* [en ligne]. 2010. Vol. 123, n° 20, p. 3490-3495. DOI 10.1242/jcs.074641.

CHAN, Jordi, CALDER, Grant, FOX, Samantha et LLOYD, Clive, 2007. Cortical microtubule arrays undergo rotary movements in *Arabidopsis hypocotyl epidermal cells*. In : *NATURE CELL BIOLOGY* [en ligne]. 2007. Vol. 9, n° 2. DOI 10.1038/ncb1533.

CHANZY, H, IMADA, K., MOLLARD, A, VUONG, R. et BARNOUD, F, 1979. Crystallographic aspects of sub-elementary cellulose fibrils occurring in the wall of rose cells cultured in vitro. In : *Protoplasma* [en ligne]. 1979. Vol. 100, n° 3-4, p. 303-316. DOI 10.1007/BF01279318.

CHEN, Ji, LV, Fengjuan, LIU, Jingran, MA, Yina, WANG, Youhua, CHEN, Binglin, MENG, Yali, ZHOU, Zhiguo et OOSTERHUIS, Derrick M., 2014. Effect of late planting and shading on cellulose synthesis during cotton fiber secondary wall development. In : ZHANG, Xianlong (éd.), *PLoS ONE* [en ligne]. 18 août 2014. Vol. 9, n° 8, p. e105088. DOI 10.1371/journal.pone.0105088.

CHEN, Jia, YU, Feng, LIU, Ying, DU, Changqing, LI, Xiushan, ZHU, Sirui, WANG, Xianchun, LAN, Wenzhi, RODRIGUEZ, Pedro L, LIU, Xuanming, LI, Dongping, CHEN, Liangbi et LUAN, Sheng, 2016. FERONIA interacts with ABI2-type phosphatases to facilitate signaling cross-talk between abscisic acid and RALF peptide in *Arabidopsis*. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2016. Vol. 113, n° 37, p. E5519-E5527. DOI 10.1073/pnas.1608449113.

CHEN, Shaolin, EHRHARDT, David W et SOMERVILLE, Chris R, 2010. Mutations of cellulose synthase (CESA1) phosphorylation sites modulate anisotropic cell expansion and bidirectional mobility of cellulose synthase. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en ligne]. 5 octobre 2010. Vol. 107, n° 40, p. 17188-93. DOI 10.1073/pnas.1012348107.

CHEN, Xiong-Yan et KIM, Jae-Yean, 2009. Callose synthesis in higher plants. In : *Plant signaling & behavior* [en ligne]. juin 2009. Vol. 4, n° 6, p. 489-92. DOI 10.4161/PSB.4.6.8359.

CHEN, Xu, IRANI, Niloufer G et FRIML, Jiří, 2011. Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. In : *Current Opinion in Plant Biology* [en ligne]. 1 décembre 2011. Vol. 14, n° 6, p. 674-682. DOI 10.1016/J.PBI.2011.08.006.

CHEN, Zhizhong, HONG, Xuhui, ZHANG, Hairong, WANG, Youqun, LI, Xia, ZHU, Jian Kang et GONG, Zhizhong, 2005b. Disruption of the cellulose synthase gene, *AtCesA8/IRX1*, enhances drought and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. In : *Plant Journal* [en ligne]. 2005. Vol. 43, n° 2, p. 273-283. DOI 10.1111/j.1365-313X.2005.02452.x.

CHEUNG, A Y et WU, H M, 2011. THESEUS 1, FERONIA and relatives: a family of cell wall-sensing receptor kinases? In : *Curr Opin Plant Biol* [en ligne]. 2011/10/04. 2011. DOI S1369-5266(11)00130-0 [pii]10.1016/j.pbi.2011.09.001.

CHO, Daeshik, VILLIERS, Florent, KRONIEWICZ, Laetitia, LEE, Sangmee, SEO, Y. J., HIRSCHI, Kendal D, LEONHARDT, Nathalie et KWAK, June M, 2012. Vacuolar CAX1 and CAX3 Influence Auxin Transport in Guard Cells via Regulation of Apoplastic pH. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2012. Vol. 160, n° 3, p. 1293-1302. DOI 10.1104/pp.112.201442.

CHORMOVA, D et FRY, S C, 2016. Boron bridging of rhamnogalacturonan-II is promoted in vitro by cationic chaperones, including polyhistidine and wall glycoproteins. In : *New Phytol* [en ligne]. 2016. Vol. 209, n° 1, p. 241-251. DOI 10.1111/nph.13596.

CLELAND, Robert E., 1975. Auxin-induced hydrogen ion excretion: correlation with growth, and control by external pH and water stress. In : *Planta* [en ligne]. 1975. Vol. 127, n° 3, p. 233-242. DOI 10.1007/BF00380720.

CLOUSE, Steven D., 2016. Brassinosteroid/Abscisic Acid Antagonism in Balancing Growth and Stress. In : *Developmental Cell* [en ligne]. 25 juillet 2016. Vol. 38, n° 2, p. 118-120. DOI 10.1016/j.devcel.2016.07.005.

CORIO-COSTET, Marie-France, DALL'AGNESE, Muriel et SCALLA, Reni, 1991. Effects of Isoxaben on Sensitive and Tolerant Plant Cell Cultures I. Metabolic fate of isoxaben. In : *PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY* [en ligne]. 1991. Vol. 4, p. 246-254.

CORNUAULT, V, BUFFETTO, F, RYDAHL, M G, MARCUS, S E, TORODE, T A, XUE, J, CREPEAU, M J, FARIA-BLANC, N, WILLATS, W G, DUPREE, P, RALET, M C et KNOX, J P, 2015. Monoclonal antibodies indicate low-abundance links between heteroxylan and other glycans of plant cell walls. In : *Planta* [en ligne]. 2015. Vol. 242, n° 6, p. 1321-1334. DOI 10.1007/s00425-015-2375-4.

COSGROVE, Daniel J., 2005. *Growth of the plant cell wall* [en ligne]. 1 novembre 2005. S.l. : Nature Publishing Group. [Consulté le 7 août 2018]. ISBN 1471-0072. Disponible à l'adresse : <http://www.nature.com/articles/nrm1746>.

COSGROVE, Daniel J., 2016. Plant cell wall extensibility: Connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. In :

Journal of Experimental Botany. 2016. Vol. 67, n° 2, p. 463-476. DOI 10.1093/jxb/erv511.

COSGROVE, Daniel J. et JARVIS, Michael C., 2012. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 22 août 2012. Vol. 3, p. 204. DOI 10.3389/fpls.2012.00204.

COSGROVE, Daniel J, 2016. Catalysts of plant cell wall loosening. In : *F1000Research* [en ligne]. 2016. Vol. 5. DOI 10.12688/f1000research.7180.1.

COSGROVE, Daniel J, 2018. Diffuse Growth of Plant Cell Walls. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2018. Vol. 176, p. 16-27. DOI 10.1104/pp.17.01541.

CROWELL, E. F., BISCHOFF, V., DESPREZ, T., ROLLAND, A., STIERHOF, Y.-D., SCHUMACHER, K., GONNEAU, M., HOFTE, H. et VERNHETTES, S., 2009. Pausing of Golgi Bodies on Microtubules Regulates Secretion of Cellulose Synthase Complexes in Arabidopsis. In : *the Plant Cell Online* [en ligne]. 2009. Vol. 21, n° 4, p. 1141-1154. DOI 10.1105/tpc.108.065334.

CROWELL, E F, GONNEAU, M, STIERHOF, Y.-D., HÖFTE, H et VERNHETTES, S, 2010. Regulated trafficking of cellulose synthases. In : *Current Opinion in Plant Biology*. 2010. Vol. 13, n° 6. DOI 10.1016/j.pbi.2010.07.005.

CROWELL, Elizabeth Faris, TIMPANO, H., DESPREZ, Thierry, FRANSSEN-VERHEIJEN, Tiny, EMONS, A.-M., HOFTE, H. et VERNHETTES, Samantha, 2011. Differential Regulation of Cellulose Orientation at the Inner and Outer Face of Epidermal Cells in the Arabidopsis Hypocotyl. In : *The Plant Cell* [en ligne]. 2011. Vol. 23, n° 7, p. 2592-2605. DOI 10.1105/tpc.111.087338.

CZOLPINSKA, Magdalena et RUREK, Michal, 2018. Plant Glycine-Rich Proteins in Stress Response: An Emerging, Still Prospective Story. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 8 mars 2018. Vol. 9, p. 302. DOI 10.3389/fpls.2018.00302.

DARAS, Gerasimos, RIGAS, Stamatis, PENNING, Bryan, MILIONI, Dimitra, MCCANN, Maureen C., CARPITA, Nicholas C., FASSEAS, Constantinos et HATZOPOULOS, Polydefkis, 2009. The thanatos mutation in Arabidopsis thaliana cellulose synthase 3 (AtCesA3) has a dominant-negative effect on cellulose synthesis and plant growth. In : *New Phytologist* [en ligne]. 1 octobre 2009. Vol. 184, n° 1, p. 114-126. DOI 10.1111/j.1469-8137.2009.02960.x.

DAVIS, Keith R., DARVILL, Alan G. et ALBERSHEIM, Peter, 1986. Several biotic and abiotic elicitors act synergistically in the induction of phytoalexin accumulation in soybean. In : *Plant Molecular Biology* [en ligne]. janvier 1986. Vol. 6, n° 1, p. 23-32. DOI 10.1007/BF00021303.

DE STORME, Nico et GEELLEN, Danny, 2014. Callose homeostasis at plasmodesmata: molecular regulators and developmental relevance. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 2014. Vol. 5. DOI 10.3389/fpls.2014.00138.

DEBOLT, S, GUTIERREZ, R, EHRHARDT, D W, MELO, C V, ROSS, L, CUTLER, S R, SOMERVILLE, C et BONETTA, D, 2007. Morlin, an inhibitor of cortical microtubule dynamics and cellulose synthase movement. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* [en ligne]. 2007. Vol. 104, n° 14, p. 5854-5859. DOI 0700789104 [pii] 10.1073/pnas.0700789104.

DEBOLT, Seth, GUTIERREZ, Ryan, EHRHARDT, David W et SOMERVILLE, Christopher R, 2007. Nonmotile cellulose synthase subunits repeatedly accumulate within localized regions at the plasma membrane in *Arabidopsis* hypocotyl cells following 2,6-dichlorobenzonitrile treatment. In : *Plant physiology*. 2007. Vol. 145, n° 2, p. 334-338. DOI 10.1104/pp.107.104703.

DECREUX, Annabelle et MESSIAEN, Johan, 2005. Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. In : *Plant and Cell Physiology* [en ligne]. 2005. Vol. 46, n° 2, p. 268-278. DOI 10.1093/pcp/pci026.

DECREUX, Annabelle, THOMAS, Annick, SPIES, Benoît, BRASSEUR, Robert, CUTSEM, Pierre Van et MESSIAEN, Johan, 2006. In vitro characterization of the homogalacturonan-binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis. In : *Phytochemistry* [en ligne]. 2006. Vol. 67, n° 11, p. 1068-1079. DOI 10.1016/j.phytochem.2006.03.009.

DEJONGHE, Wim et RUSSINOVA, Eugenia, 2017. Plant Chemical Genetics: From Phenotype-Based Screens to Synthetic Biology. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2017. Vol. 174, n° 1, p. 5-20. DOI 10.1104/pp.16.01805.

DELMER, D P, READ, Stephen M et COOPER, G, 1987. Identification of a receptor protein in cotton fibers for the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile. In : *Plant physiology* [en ligne]. 1987. Vol. 84, n° 2, p. 415-20.

DENÈS, Jean Marc, BARON, Alain, RENARD, Catherine M.G.C., PÉAN, Christophe et DRILLEAU, Jean François, 2000. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. In : *Carbohydrate Research* [en ligne]. 7 août 2000. Vol. 327, n° 4, p. 385-393. DOI 10.1016/S0008-6215(00)00070-7.

DENNESS, L., MCKENNA, J. F., SEGONZAC, C., WORMIT, A., MADHOU, P., BENNETT, M., MANSFIELD, J., ZIPFEL, C. et HAMANN, T., 2011. Cell Wall Damage-Induced Lignin Biosynthesis Is Regulated by a Reactive Oxygen Species- and Jasmonic Acid-Dependent Process in *Arabidopsis*. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2011. Vol. 156, n° 3, p. 1364-1374. DOI 10.1104/pp.111.175737.

DENOUX, Carine, GALLETTI, Roberta, MAMMARELLA, Nicole, GOPALAN, Suresh, WERCK, Danièle, DE LORENZO, Giulia, FERRARI, Simone, AUSUBEL, Frederick M et DEWDNEY, Julia, 2008. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. In : *Molecular Plant* [en ligne]. mai 2008. Vol. 1, n° 3, p. 423-445. DOI 10.1093/mp/ssn019.

DESLAURIERS, Stephen D. et LARSEN, Paul B., 2010. FERONIA is a key modulator of brassinosteroid and ethylene responsiveness in *Arabidopsis* hypocotyls. In : *Molecular Plant* [en ligne]. 1 mai 2010. Vol. 3, n° 3, p. 626-640. DOI 10.1093/mp/ssq015.

DESNOS, T, ORBOVIĆ, V, BELLINI, C, KRONENBERGER, J, CABOCHE, M, TRAAS, J et HÖFTE, H, 1996a. Procuste1 mutants identify two distinct genetic pathways controlling hypocotyl cell elongation, respectively in dark- and light-grown *Arabidopsis* seedlings. In : *Development (Cambridge, England)* [en ligne]. 1996. Vol. 122, n° 2, p. 683-93.

DESPREZ, T., JURANIEC, M., CROWELL, E. F., JOUY, H., POCHYLOVA, Z., PARCY, F., HOFTE, H., GONNEAU, M. et VERNHETTES, S., 2007. Organization of cellulose synthase

complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2007. Vol. 104, n° 39, p. 15572-15577. DOI 10.1073/pnas.0706569104.

DESPREZ, T., VERNHETTES, S., FAGARD, M., REFREGIER, G., DESNOS, T., ALETTI, E., PY, N., PELLETIER, S. et HOFTE, H., 2002. Resistance against Herbicide Isoxaben and Cellulose Deficiency Caused by Distinct Mutations in Same Cellulose Synthase Isoform CESA6. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2002. Vol. 128, n° 2, p. 482-490. DOI 10.1104/pp.010822.

DETTMER, J, HONG-HERMESDORF, A, STIERHOF, Y D et SCHUMACHER, K, 2006. Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis*. In : *Plant Cell* [en ligne]. 2006/02/08. 2006. Vol. 18, n° 3, p. 715-730. DOI tpc.105.037978 [pii] 10.1105/tpc.105.037978.

DHONUKSHE, Pankaj, ANIENTO, Fernando, HWANG, Inhwon, ROBINSON, David G., MRAVEC, Jozef, STIERHOF, York Dieter et FRIML, Jiří, 2007. Clathrin-Mediated Constitutive Endocytosis of PIN Auxin Efflux Carriers in *Arabidopsis*. In : *Current Biology* [en ligne]. 20 mars 2007. Vol. 17, n° 6, p. 520-527. DOI 10.1016/j.cub.2007.01.052.

DIETRICH, Hansjörg et LABER, Bernd, 2012. Inhibitors of Cellulose Biosynthesis. In : *Modern Crop Protection Compounds: Second Edition* [en ligne]. Weinheim, Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 339-369. [Consulté le 7 septembre 2018]. ISBN 9783527329656. Disponible à l'adresse : <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527644179.ch7>.

DIOTALLEVI, Fabiana et MULDER, Bela, 2007. The cellulose synthase complex: A polymerization driven supramolecular motor. In : *Biophysical Journal* [en ligne]. 2007. Vol. 92, n° 8, p. 2666-2673. DOI 10.1529/biophysj.106.099473.

DOBLIN, Monika S, KUREK, Isaac, JACOB-WILK, Deborah et DELMER, Deborah P, 2002. *Cellulose biosynthesis in plants: From genes to rosettes* [en ligne]. décembre 2002. S.l. : s.n. [Consulté le 23 juillet 2018]. ISBN 0032-0781 (Print)n0032-0781 (Linking). Disponible à l'adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514238>.

DOBLIN, Monika S, PETTOLINO, Filomena et BACIC, Antony, 2010. *Plant cell walls: The skeleton of the plant world* [en ligne]. 2010. S.l. : s.n. [Consulté le 6 août 2018]. ISBN 1445-4416. Disponible à l'adresse : www.publish.csiro.au/journals/fpb.

DRAKAKAKI, Georgia, VAN DE VEN, Wilhelmina, PAN, Songqin, MIAO, Yansong, WANG, Junqi, KEINATH, Nana F, WEATHERLY, Brent, JIANG, Liwen, SCHUMACHER, Karin, HICKS, Glenn et RAIKHEL, Natasha, 2012. Isolation and proteomic analysis of the SYP61 compartment reveal its role in exocytic trafficking in *Arabidopsis*. In : *Cell Research* [en ligne]. 9 février 2012. Vol. 22, n° 2, p. 413-424. DOI 10.1038/cr.2011.129.

DU, Changqing, LI, Xiushan, CHEN, Jia, CHEN, Weijun, LI, Bin, LI, Chiyu, WANG, Long, LI, Jianglin, ZHAO, Xiaoying, LIN, Jianzhong, LIU, Xuanming, LUAN, Sheng et YU, Feng, 2016. Receptor kinase complex transmits RALF peptide signal to inhibit root growth in *Arabidopsis*. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2016. Vol. 113, n° 51, p. E8326-E8334. DOI 10.1073/pnas.1609626113.

DU, Shuo, QU, Li Jia et XIAO, Junyu, 2018. Crystal structures of the extracellular

domains of the CrRLK1L receptor-like kinases ANXUR1 and ANXUR2. In : *Protein Science* [en ligne]. 1 avril 2018. Vol. 27, n° 4, p. 886-892. DOI 10.1002/pro.3381.

DUAN, Qiaohong, KITA, Daniel, LI, Chao, CHEUNG, Alice Y et WU, Hen-Ming, 2010. FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 12 octobre 2010. Vol. 107, n° 41, p. 17821-17826. DOI 10.1073/pnas.1005366107.

DÜNSER, Kai et KLEINE-VEHN, Jürgen, 2015. Differential growth regulation in plants-the acid growth balloon theory. In : *Current Opinion in Plant Biology* [en ligne]. 2015. Vol. 28, p. 55-59. DOI 10.1016/j.pbi.2015.08.009.

DUVAL, Isabelle et BEAUDOIN, Nathalie, 2009. Transcriptional profiling in response to inhibition of cellulose synthesis by thaxtomin A and isoxaben in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. In : *Plant Cell Reports* [en ligne]. 2009. Vol. 28, n° 5, p. 811-830. DOI 10.1007/s00299-009-0670-x.

ELLINGER, Dorothea, NAUMANN, Marcel, FALTER, Christian, ZWIKOWICS, Claudia, JAMROW, Torsten, MANISSERI, Chithra, SOMERVILLE, Shauna C et VOIGT, Christian A, 2013. Elevated Early Callose Deposition Results in Complete Penetration Resistance to Powdery Mildew in *Arabidopsis*. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. mars 2013. Vol. 161, n° 3, p. 1433-1444. DOI 10.1104/pp.112.211011.

ELLIS, Christine, KARAFYLLIDIS, Ioannis, WASTERNAK, Claus et TURNER, John G, 2002. The *Arabidopsis* Mutant *cev1* Links Cell Wall Signaling to Jasmonate and Ethylene Responses. In : *The Plant Cell*. 2002. Vol. 14, n° July, p. 1557-1566. DOI 10.1105/tpc.002022.1558.

ENCINA, Antonio, SEVILLANO, José Manuel, ACEBES, José Luis et ALVAREZ, Jesús, 2002. Cell wall modifications of bean (*Phaseolus vulgaris*) cell suspensions during habituation and dehabituation to dichlobenil. In : *Physiologia Plantarum* [en ligne]. 1 février 2002. Vol. 114, n° 2, p. 182-191. DOI 10.1034/j.1399-3054.2002.1140204.x.

ENDLER, Anne, KESTEN, Christopher, SCHNEIDER, René, ZHANG, Yi, IVAKOV, Alexander, FROEHLICH, Anja, FUNKE, Norma et PERSSON, Staffan, 2015. A Mechanism for Sustained Cellulose Synthesis during Salt Stress. In : *Cell*. 2015. Vol. 162, n° 6, p. 1353-1364. DOI 10.1016/j.cell.2015.08.028.

ENGELSDORF, Timo, GIGLI-BISCEGLIA, Nora, VEERABAGU, Manikandan, MCKENNA, Joseph F, AUGSTEIN, Frauke, VAN DER DOES, Dieuwertje, ZIPFEL, Cyril et HAMANN, Thorsten, 2017. Pattern-Triggered Immunity And Cell Wall Integrity Maintenance Jointly Modulate Plant Stress Responses. In : *bioRxiv* [en ligne]. 2017. p. 130013. DOI 10.1101/130013.

ENGELSDORF, Timo, GIGLI-BISCEGLIA, Nora, VEERABAGU, Manikandan, MCKENNA, Joseph F, VAAHTERA, Lauri, AUGSTEIN, Frauke, VAN DER DOES, Dieuwertje, ZIPFEL, Cyril et HAMANN, Thorsten, 2018. The plant cell wall integrity maintenance and immune signaling systems cooperate to control stress responses in *Arabidopsis thaliana*. In : *Science Signaling* [en ligne]. 26 juin 2018. Vol. 11, n° 536, p. eaao3070. DOI 10.1126/scisignal.aao3070.

ENGELSDORF, Timo et HAMANN, Thorsten, 2014. *An update on receptor-like kinase*

involvement in the maintenance of plant cell wall integrity [en ligne]. octobre 2014. S.l. : Oxford University Press. [Consulté le 25 août 2018]. ISBN 1095-8290 (Electronic)r0305-7364 (Linking). Disponible à l'adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24723447>.

EPSTEIN, Lynn et LAMPORT, Derek T A, 1984. An intramolecular linkage involving isodityrosine in extensin. In : *Phytochemistry* [en ligne]. 1984. Vol. 23, n° 6, p. 1241-1246. DOI 10.1016/S0031-9422(00)80433-1.

ESCOBAR-RESTREPO, Juan Miguel, HUCK, Norbert, KESSLER, Sharon, GAGLIARDINI, Valeria, GHEYSELINCK, Jacqueline, YANG, Wei Cai et GROSSNIKLAUS, Ueli, 2007. The Feronia receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. In : *Science* [en ligne]. 3 août 2007. Vol. 317, n° 5838, p. 656-660. DOI 10.1126/science.1143562.

ESPINO, J J, BRITO, N, NODA, J et GONZÁLEZ, C, 2005. Botrytis cinerea endo- β -1,4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis. In : *Physiological and Molecular Plant Pathology* [en ligne]. 2005. Vol. 66, n° 6, p. 213-221. DOI 10.1016/j.pmpp.2005.06.005.

FAGARD, M, DESNOS, T, DESPREZ, T, GOUBET, F, REFREGIER, G, MOUILLE, G, MCCANN, M, RAYON, C, VERNHETTES, S et HÖFTE, H, 2000. Procuste1 encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of arabidopsis. In : *Plant Cell*. 2000. Vol. 12, n° 12. DOI 10.1105/tpc.12.12.2409.

FAN, Weihua, 2002. In Vivo Interaction between NPR1 and Transcription Factor TGA2 Leads to Salicylic Acid-Mediated Gene Activation in Arabidopsis. In : *THE PLANT CELL ONLINE* [en ligne]. juin 2002. Vol. 14, n° 6, p. 1377-1389. DOI 10.1105/tpc.001628.

FANGEL, Jonatan U, ULVSKOV, Peter, KNOX, J P, MIKKELSEN, Maria D, HARHOLT, Jesper, POPPER, Zoë A et WILLATS, William G T, 2012. Cell wall evolution and diversity. In : *Frontiers in plant science* [en ligne]. 2012. Vol. 3, p. 152. DOI 10.3389/fpls.2012.00152.

FANKHAUSER, Christian et CHRISTIE, John M, 2015. *Plant phototropic growth* [en ligne]. 2015. S.l. : s.n. [Consulté le 16 août 2018]. ISBN 1879-0445 (Electronic)r0960-9822 (Linking). Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.020>.

FELLE, Hubert H, WALLER, Frank, MOLITOR, Alexandra et KOGEL, Karl-Heinz, 2009. The mycorrhiza fungus Piriformospora indica induces fast root-surface pH signaling and primes systemic alkalization of the leaf apoplast upon powdery mildew infection. In : *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* [en ligne]. 2009. Vol. 22, n° 9, p. 1179-85. DOI 10.1094/MPMI-22-9-1179.

FENDRYCH, Matyáš, LEUNG, Jeffrey et FRIML, Jiří, 2016. Tir1/AFB-Aux/IAA auxin perception mediates rapid cell wall acidification and growth of Arabidopsis hypocotyls. In : *eLife* [en ligne]. 2016. Vol. 5, n° September2016. DOI 10.7554/eLife.19048.

FENG, Wei, KITA, Daniel, PEAUCELLE, Alexis, CARTWRIGHT, Heather N, DOAN, Vinh, DUAN, Qiaohong, LIU, Ming Che, MAMAN, Jacob, STEINHORST, Leonie, SCHMITZ-THOM, Ina, YVON, Robert, KUDLA, Jörg, WU, Hen Ming, CHEUNG, Alice Y et DINNENY, José R,

2018. The FERONIA Receptor Kinase Maintains Cell-Wall Integrity during Salt Stress through Ca²⁺ Signaling. In : *Current Biology*. 2018. Vol. 28, n° 5, p. 666--675.e5. DOI 10.1016/j.cub.2018.01.023.

FERNANDES, A N, THOMAS, L H, ALTANER, C M, CALLOW, P, FORSYTH, V T, APPERLEY, D C, KENNEDY, C J et JARVIS, M C, 2011. Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* [en ligne]. 2011/11/09. 2011. DOI 1108942108 [pii]10.1073/pnas.1108942108.

FERRARI, Simone, SAVATIN, Daniel Valentin, SICILIA, Francesca, GRAMEGNA, Giovanna, CERVONE, Felice et DE LORENZO, Giulia, 2013. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 2013. Vol. 4. DOI 10.3389/fpls.2013.00049.

FISHER, Deborah D. et CYR, Richard J., 1998. Extending the Microtubule/Microfibril Paradigm . Cellulose Synthesis Is Required for Normal Cortical Microtubule Alignment in Elongating Cells. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 1 mars 1998. Vol. 116, n° 3, p. 1043-1051. DOI 10.1104/pp.116.3.1043.

FLORS, Víctor, LEYVA, María de la O., VICEDO, Begonya, FINITI, Ivan, REAL, María Dolores, GARCÍA-AGUSTÍN, Pilar, BENNETT, Alan B. et GONZÁLEZ-BOSCH, Carmen, 2007. Absence of the endo- β -1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. In : *Plant Journal* [en ligne]. 1 décembre 2007. Vol. 52, n° 6, p. 1027-1040. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03299.x.

FRANCK, Christina Maria, WESTERMANN, Jens et BOISSON-DERNIER, Aurélien, 2018b. Plant Malectin-Like Receptor Kinases: From Cell Wall Integrity to Immunity and Beyond. In : *Annual Review of Plant Biology* [en ligne]. 2018. Vol. 69, n° 1, p. annurev--arplant--042817--040557. DOI 10.1146/annurev-arplant-042817-040557.

FRANKOVÁ, Lenka et FRY, Stephen C., 2011. Phylogenetic variation in glycosidases and glycanases acting on plant cell wall polysaccharides, and the detection of transglycosidase and trans- β -xylanase activities. In : *The Plant Journal* [en ligne]. 1 août 2011. Vol. 67, n° 4, p. 662-681. DOI 10.1111/j.1365-313X.2011.04625.x.

FROMM, Jörg, ROCKEL, Beate, LAUTNER, Silke, WINDEISEN, Elisabeth et WANNER, Gerhard, 2003. Lignin distribution in wood cell walls determined by TEM and backscattered SEM techniques. In : *Journal of Structural Biology* [en ligne]. 1 juillet 2003. Vol. 143, n° 1, p. 77-84. DOI 10.1016/S1047-8477(03)00119-9.

FRY, Barbara A et LORIA, Rosemary, 2002. Thaxtomin A: Evidence for a plant cell wall target. In : *Physiological and Molecular Plant Pathology* [en ligne]. 2002. Vol. 60, n° 1, p. 1-8. DOI 10.1006/pmpp.2001.0371.

FUJIMOTO, Masaru, SUDA, Yasuyuki, VERNHETTES, Samantha, NAKANO, Akihiko et UEDA, Takashi, 2015. Phosphatidylinositol 3-kinase and 4-kinase have distinct roles in intracellular trafficking of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis thaliana*. In : *Plant and Cell Physiology*. 2015. Vol. 56, n° 2, p. 287-298. DOI 10.1093/pcp/pcu195.

FUJITA, M, HIMMELSPACH, R, HOCART, C H, WILLIAMSON, R E, MANSFIELD, S D et WASTENEYS, G O, 2011. Cortical microtubules optimize cell-wall crystallinity to drive unidirectional growth in *Arabidopsis*. In : *Plant J* [en ligne]. 2011/05/04. 2011.

DOI 10.1111/j.1365-313X.2011.04552.x.

GACHOMO, Emma W, JNO BAPTISTE, Lyla, KEFELA, Timnit, SAIDEL, William M et KOTCHONI, Simeon O, 2014. The Arabidopsis CURVY1 (CVY1) gene encoding a novel receptor-like protein kinase regulates cell morphogenesis, flowering time and seed production. In : *BMC Plant Biology* [en ligne]. 2014. Vol. 14, n° 1. DOI 10.1186/s12870-014-0221-7.

GALATIS, Basil et APOSTOLAKOS, Panagiotis, 2010. A new callose function: involvement in differentiation and function of fern stomatal complexes. In : *Plant signaling & behavior* [en ligne]. novembre 2010. Vol. 5, n° November, p. 1359-1364. DOI 10.4161/psb.5.11.12959.

GALINDO-TRIGO, Sergio, GRAY, Julie E. et SMITH, Lisa M., 2016. Conserved Roles of CrRLK1L Receptor-Like Kinases in Cell Expansion and Reproduction from Algae to Angiosperms. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 29 août 2016. Vol. 07, p. 1269. DOI 10.3389/fpls.2016.01269.

GAO, M, WANG, X, WANG, D, XU, F, DING, X, ZHANG, Z, BI, D, CHENG, Y T, CHEN, S, LI, X et ZHANG, Y, 2009. Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in Arabidopsis. In : *Cell Host Microbe* [en ligne]. 2009/07/21. 2009. Vol. 6, n° 1, p. 34-44. DOI S1931-3128(09)00190-5 [pii]10.1016/j.chom.2009.05.019.

GARCÍA-ANGULO, Penélope, ALONSO-SIMÓN, Ana, ENCINA, Antonio, ÁLVAREZ, Jesús M et ACEBES, José L, 2012. Cellulose biosynthesis inhibitors: Comparative effect on bean cell cultures. In : *International Journal of Molecular Sciences* [en ligne]. 2012. Vol. 13, n° 3, p. 3685-3702. DOI 10.3390/ijms13033685.

GARCÍA-ANGULO, Penélope, WILLATS, William G.T., ENCINA, Antonio E., ALONSO-SIMÓN, Ana, ÁLVAREZ, Jesús M. et ACEBES, José L., 2006. Immunocytochemical characterization of the cell walls of bean cell suspensions during habituation and dehabituation to dichlobenil. In : *Physiologia Plantarum* [en ligne]. 1 mai 2006. Vol. 127, n° 1, p. 87-99. DOI 10.1111/j.1399-3054.2006.00648.x.

GE, Zengxiang, BERGONCI, Tabata, ZHAO, Yuling, ZOU, Yanjiao, DU, Shuo, LIU, Ming Che, LUO, Xingju, RUAN, Hao, GARCÍA-VALENCIA, Liliana E, ZHONG, Sheng, HOU, Saiying, HUANG, Qingpei, LAI, Luhua, MOURA, Daniel S, GU, Hongya, DONG, Juan, WU, Hen Ming, DRESSELHAUS, Thomas, XIAO, Junyu, CHEUNG, Alice Y et QU, Li Jia, 2017. Arabidopsis pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling. In : *Science* [en ligne]. 22 décembre 2017. Vol. 358, n° 6370, p. 1596-1600. DOI 10.1126/science.aao3642.

GENDRE, D, MCFARLANE, H E, JOHNSON, E, MOUILLE, G, SJODIN, A, OH, J, LEVESQUE-TREMBLAY, G, WATANABE, Y, SAMUELS, L et BHALERAO, R P, 2013. Trans-Golgi Network Localized ECHIDNA/Ypt Interacting Protein Complex Is Required for the Secretion of Cell Wall Polysaccharides in Arabidopsis. In : *The Plant Cell* [en ligne]. 2013/07/09. 2013. Vol. 25, n° 7, p. 2633-2646. DOI 10.1105/tpc.113.112482.

GENDRE, D, OH, J, BOUTTE, Y, BEST, J G, SAMUELS, L, NILSSON, R, UEMURA, T, MARCHANT, A, BENNETT, M J, GREBE, M et BHALERAO, R P, 2011. Conserved Arabidopsis ECHIDNA protein mediates trans-Golgi-network trafficking and cell elongation. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* [en ligne]. 2011/04/23. 2011. Vol. 108, n° 19,

p. 8048-8053. DOI 10.18371108 [pii]10.1073/pnas.1018371108.

GEORGELIS, N, YENNAWAR, N H et COSGROVE, D J, 2012. Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* [en ligne]. 2012/08/29. 2012. DOI 1213200109 [pii]10.1073/pnas.1213200109.

GIDDINGS, T H et STAEHELIN, L A, 1991. Microtubule-mediated control of microfibril deposition: a re-examination of the hypothesis. In : LLOYD, C W (éd.), *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. S.l. : Academic Press. p. 85-99.

GJETTING, Kisten Sisse Krag, YTTING, Cecilie Karkov, SCHULZ, Alexander et FUGLSANG, Anja Thoe, 2012. Live imaging of intra-and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor. In : *Journal of Experimental Botany*. 2012. Vol. 63, n° 8, p. 3207-3218. DOI 10.1093/jxb/ers040.

GOLDBERG, R, PIERRON, M, BORDENAVE, M, BRETON, C, MORVAN, C et DU PENHOAT, C H, 2001. Control of Mung bean pectinmethylesterase isoform activities. Influence of pH and carboxyl group distribution along the pectic chains. In : *J Biol Chem* [en ligne]. 2000/12/30. 2001. Vol. 276, n° 12, p. 8841-8847. DOI 10.1074/jbc.M001791200M001791200 [pii].

GONNEAU, M., DESPREZ, T., GUILLOT, A., VERNHETTES, S. et HOFTE, H., 2014. Catalytic Subunit Stoichiometry within the Cellulose Synthase Complex. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2014. Vol. 166, n° 4, p. 1709-1712. DOI 10.1104/pp.114.250159.

GONNEAU, Martine, DESPREZ, Thierry, MARTIN, Marjolaine, DOBLAS, Verónica G., BACETE, Laura, MIART, Fabien, SORMANI, Rodnay, HÉMATY, Kian, RENO, Julien, LANDREIN, Benoit, MURPHY, Evan, VAN DE COTTE, Brigitte, VERNHETTES, Samantha, DE SMET, Ive et HÖFTE, Herman, 2018a. Receptor Kinase THESEUS1 Is a Rapid Alkalinization Factor 34 Receptor in Arabidopsis. In : *Current Biology* [en ligne]. 6 août 2018. Vol. 28, n° 15, p. 2452-2458.e4. DOI 10.1016/j.cub.2018.05.075.

GRAHAM, Douglas et PATTERSON, Brian D, 1982. Responses of Plants to Low, Nonfreezing Temperatures: Proteins, Metabolism, and Acclimation. In : *Annual Review of Plant Physiology* [en ligne]. 1982. Vol. 33, n° 1, p. 347-372. DOI 10.1146/annurev.pp.33.060182.002023.

GRAMEGNA, Giovanna, MODESTI, Vanessa, SAVATIN, Daniel V., SICILIA, Francesca, CERVONE, Felice et DE LORENZO, Giulia, 2016. GRP-3 and KAPP, encoding interactors of WAK1, negatively affect defense responses induced by oligogalacturonides and local response to wounding. In : *Journal of Experimental Botany* [en ligne]. 1 mars 2016. Vol. 67, n° 6, p. 1715-1729. DOI 10.1093/jxb/erv563.

GRANT, G T, MORRIS, E R, REES, D, SMITH, P J C et THOM, D, 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the « egg-box » model. In : *FEBS Letters*. 1973. Vol. 32, p. 195-198.

GRAVINO, Matteo, LOCCI, Federica, TUNDO, Silvio, CERVONE, Felice, SAVATIN, Daniel Valentin et DE LORENZO, Giulia, 2017. Immune responses induced by oligogalacturonides are differentially affected by AvrPto and loss of BAK1/BKK1 and PEPR1/PEPR2. In : *Molecular Plant Pathology* [en ligne]. 1 mai 2017. Vol. 18, n° 4,

p. 582-595. DOI 10.1111/mpp.12419.

GREEN, P B, 1962. Mechanism for Plant Cellular Morphogenesis. In : *Science (New York, N.Y.)* [en ligne]. 28 décembre 1962. Vol. 138, n° 3548, p. 1404-5. DOI 10.1126/science.138.3548.1404.

GREEN, Paul B, 1965. PATHWAYS OF CELLULAR A Diversity in NiteUa MORPHOGENESIS. In : *The Journal of Cell Biology* [en ligne]. 1965. Vol. 27, p. 343-363.

GRIFFITHS, J S, TSAI, A Y, XUE, H, VOINICIUC, C, SOLA, K, SEIFERT, G J, MANSFIELD, S D et HAUGHN, G W, 2014. SALT-OVERLY SENSITIVE5 Mediates Arabidopsis Seed Coat Mucilage Adherence and Organization through Pectins. In : *Plant Physiol* [en ligne]. 2014. Vol. 165, n° 3, p. 991-1004. DOI 10.1104/pp.114.239400.

GRIFFITHS, Jonathan S., ŠOLA, Krešimir, KUSHWAHA, Rekha, LAM, Patricia, TATENO, Mizuki, YOUNG, Robin, VOINICIUC, Cătălin, DEAN, Gillian, MANSFIELD, Shawn D., DEBOLT, Seth et HAUGHN, George W., 2015. Unidirectional Movement of Cellulose Synthase Complexes in Arabidopsis Seed Coat Epidermal Cells Deposit Cellulose Involved in Mucilage Extrusion, Adherence, and Ray Formation. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2015. Vol. 168, n° 2, p. 502-520. DOI 10.1104/pp.15.00478.

GRINON, C et SENTENAC, H, 1991. pH and ionic conditions in the apoplast. In : *Annu. Rev. Plant Phvsiol. Plant Mol. Bioi* [en ligne]. 1991. Vol. 42, p. 103-128.

GRONNIER, Julien, CROWET, Jean-Marc, HABENSTEIN, Birgit, NASIR, Mehmet Nail, BAYLE, Vincent, HOSY, Eric, PLATRE, Matthieu Pierre, GOUGUET, Paul, RAFFAELE, Sylvain, MARTINEZ, Denis, GRELARD, Axelle, LOQUET, Antoine, SIMON-PLAS, Françoise, GERBEAU-PISSOT, Patricia, DER, Christophe, BAYER, Emmanuelle M, JAILLAIS, Yvon, DELEU, Magali, GERMAIN, Véronique, LINS, Laurence et MONGRAND, Sébastien, 2017. Structural basis for plant plasma membrane protein dynamics and organization into functional nanodomains. In : *eLife* [en ligne]. 31 juillet 2017. Vol. 6. DOI 10.7554/eLife.26404.

GRUBB, C. Douglas et ABEL, Steffen, 2006. *Glucosinolate metabolism and its control* [en ligne]. 1 février 2006. S.l. : Elsevier Current Trends. [Consulté le 7 septembre 2018]. ISBN 1360-1385 (Print)n1360-1385 (Linking). Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138505003043?via%3Dihub>.

GU, Ying, KAPLINSKY, Nick, BRINGMANN, Martin, COBB, Alex, CARROLL, Andrew, SAMPATHKUMAR, Arun, BASKIN, Tobias I, PERSSON, Staffan et SOMERVILLE, Chris R, 2010. Identification of a cellulose synthase-associated protein required for cellulose biosynthesis. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 20 juillet 2010. Vol. 107, n° 29, p. 12866-12871. DOI 10.1073/pnas.1007092107.

GU, Ying et SOMERVILLE, Chris, 2010. Cellulose synthase interacting protein: a new factor in cellulose synthesis. In : *Plant signaling & behavior* [en ligne]. décembre 2010. Vol. 5, n° 12, p. 1571-4. DOI 10.4161/psb.5.12.13621.

GUERRIERO, G, FUGELSTAD, J et BULONE, V, 2010. What do we really know about cellulose biosynthesis in higher plants? In : *J Integr Plant Biol* [en ligne]. 2010/04/10. 2010. Vol. 52, n° 2, p. 161-175. DOI JIPB935 [pii]10.1111/j.1744-7909.2010.00935.x.

GUERRIERO, Gea, LEGAY, Sylvain et HAUSMAN, Jean Francois, 2014. Alfalfa cellulose synthase gene expression under abiotic stress: A hitchhiker's guide to RT-qPCR normalization. In : *PLoS ONE* [en ligne]. 2014. Vol. 9, n° 8. DOI 10.1371/journal.pone.0103808.

GÜNL, Markus, KRAEMER, Florian et PAULY, Markus, 2011. Oligosaccharide mass profiling (OLIMP) of cell wall polysaccharides by MALDI-TOF/MS. In : *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [en ligne]. 2011. Vol. 715, p. 43-54. DOI 10.1007/978-1-61779-008-9_3.

GUO, H., LI, L., YE, H., YU, X., ALGREEN, A. et YIN, Y., 2009. *Three related receptor-like kinases are required for optimal cell elongation in Arabidopsis thaliana* [en ligne]. S.l. : s.n. ISBN 0812346106. Disponible à l'adresse : <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0812346106>.

GUO, Ming, KIM, Panya, LI, Guangyong, ELOWSKY, Christian G. et ALFANO, James R., 2016. A Bacterial Effector Co-opts Calmodulin to Target the Plant Microtubule Network. In : *Cell Host and Microbe* [en ligne]. 13 janvier 2016. Vol. 19, n° 1, p. 67-78. DOI 10.1016/j.chom.2015.12.007.

GUTIERREZ, Ryan, LINDEBOOM, Jelmer J., PAREDEZ, Alex R., EMONS, A. M C et EHRHARDT, David W., 2009. Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. In : *Nature Cell Biology*. 2009. Vol. 11, n° 7, p. 797-806. DOI 10.1038/ncb1886.

HAGER, Achim, MENZEL, Helga et KRAUSS, Annelore, 1971. Experiments and hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth. In : *Planta* [en ligne]. 1971. Vol. 100, n° 1, p. 47-75. DOI 10.1007/BF00386886.

HAIGLER, C H et BROWN, R M, 1986. Transport of rosettes from the golgi apparatus to the plasma membrane in isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans* during differentiation to tracheary elements in suspension culture. In : *Protoplasma* [en ligne]. 1986. Vol. 134, n° 2-3, p. 111-120. DOI 10.1007/BF01275709.

HAIGLER, Candace H., DAVIS, Jonathan K., ERIN, Slabaugh et KUBICKI, James D., 2017. Biosynthesis and Assembly of Cellulose. In : ROSE, Ray J. (éd.), *Molecular cell biology of the growth and differentiation of plant cells* [en ligne]. 3. S.l. : CRC press. p. 120-138. [Consulté le 18 juillet 2018]. ISBN 1315353393. Disponible à l'adresse : <https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=1gdEDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA16&dq=cellulose+synthase+structure+transmembrane+domain&ots=8xdEbyfXBI&sig=ttTE7Snfrl6GD0bvXYTs00goqy8#v=onepage&q&f=false>.

HALTER, Thierry, IMKAMPE, Julia, MAZZOTTA, Sara, WIERZBA, Michael, POSTEL, Sandra, BÜCHERL, Christoph, KIEFER, Christian, STAHL, Mark, CHINCHILLA, Delphine, WANG, Xiaofeng, NÜRNBERGER, Thorsten, ZIPFEL, Cyril, CLOUSE, Steven, BORST, Jan Willem, BOEREN, Sjef, DE VRIES, Sacco C., TAX, Frans et KEMMERLING, Birgit, 2014. The leucine-rich repeat receptor kinase BIR2 is a negative regulator of BAK1 in plant immunity. In : *Current Biology* [en ligne]. 20 janvier 2014. Vol. 24, n° 2, p. 134-143. DOI 10.1016/j.cub.2013.11.047.

HAMANN, T, 2015. The Plant Cell Wall Integrity Maintenance Mechanism-Concepts

for Organization and Mode of Action. In : *Plant Cell Physiol* [en ligne]. 2015. Vol. 56, n° 2, p. 215-223. DOI 10.1093/pcp/pcu164.

HAMANN, Thorsten, 2015. The plant cell wall integrity maintenance mechanism - A case study of a cell wall plasma membrane signaling network. In : *Phytochemistry* [en ligne]. 2015. Vol. 112, n° 1, p. 100-109. DOI 10.1016/j.phytochem.2014.09.019.

HAMANN, Thorsten, BENNETT, Mark, MANSFIELD, John et SOMERVILLE, Christopher, 2009. Identification of cell-wall stress as a hexose-dependent and osmosensitive regulator of plant responses. In : *Plant Journal*. 2009. Vol. 57, n° 6, p. 1015-1026. DOI 10.1111/j.1365-313X.2008.03744.x.

HAMANN, Thorsten, OSBORNE, Erin, YOUNGS, Heather L, MISSON, Julie, NUSSAUME, Laurent et SOMERVILLE, Chris, 2004. Global expression analysis of CESA and CSL genes in *Arabidopsis*. In : *Cellulose*. 2004. Vol. 11, n° 3-4, p. 279-286. DOI 10.1023/B:CELL.0000046340.99925.57.

HAMANT, O, HEISLER, M G, JONSSON, H, KRUPINSKI, P, UYTTEWAAL, M, BOKOV, P, CORSON, F, SAHLIN, P, BOUDAUD, A, MEYEROWITZ, E M, COUDER, Y et TRAAS, J, 2008. Developmental patterning by mechanical signals in *Arabidopsis*. In : *Science* [en ligne]. 2008. Vol. 322, n° 5908, p. 1650-1655. DOI 322/5908/1650 [pii]10.1126/science.1165594.

HAMANT, Olivier et HASWELL, Elizabeth S, 2017. Life behind the wall: sensing mechanical cues in plants. In : *BMC Biology* [en ligne]. 2017. Vol. 15, n° 59. DOI 10.1186/s12915-017-0403-5.

HAMILTON, Eric S, JENSEN, Gregory S, MAKSAEV, Grigory, KATIMS, Andrew, SHERP, Ashley M et HASWELL, Elizabeth S, 2015. Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. In : *Science* [en ligne]. 23 octobre 2015. Vol. 350, n° 6259, p. 438-441. DOI 10.1126/science.aac6014.

HARPAZ-SAAD, Smadar, MCFARLANE, Heather E., XU, Shouling, DIVI, Uday K., FORWARD, Bronwen, WESTERN, Tamara L. et KIEBER, Joseph J., 2011. Cellulose synthesis via the FEI2 RLK/SOS5 pathway and CELLULOSE SYNTHASE 5 is required for the structure of seed coat mucilage in *Arabidopsis*. In : *Plant Journal* [en ligne]. 1 décembre 2011. Vol. 68, n° 6, p. 941-953. DOI 10.1111/j.1365-313X.2011.04760.x.

HARPAZ-SAAD, Smadar, WESTERN, Tamara L et KIEBER, Joseph J, 2012. The FEI2-SOS5 pathway and CELLULOSE SYNTHASE 5 are required for cellulose biosynthesis in the *Arabidopsis* seed coat and affect pectin mucilage structure. In : *Plant signaling & behavior* [en ligne]. février 2012. Vol. 7, n° 2, p. 285-288. DOI 10.4161/psb.18819.

HARRIS, Darby M, CORBIN, Kendall, WANG, Tuo, GUTIERREZ, Ryan, BERTOLO, Ana L, PETTI, Carloalberto, SMILGIES, D.-M., ESTEVEZ, J. M., BONETTA, Dario, URBANOWICZ, Breeanna R, EHRHARDT, David W, SOMERVILLE, Chris R, ROSE, Jocelyn K C, HONG, Mei et DEBOLT, S., 2012. Cellulose microfibril crystallinity is reduced by mutating C-terminal transmembrane region residues CESA1A903V and CESA3T942I of cellulose synthase. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2012. Vol. 109, n° 11, p. 4098-4103. DOI 10.1073/pnas.1200352109.

HARUTA, Miyoshi, GRAY, William M et SUSSMAN, Michael R, 2015. *Regulation of the*

plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) by phosphorylation [en ligne]. 1 décembre 2015. S.l.: Elsevier Current Trends. [Consulté le 13 août 2018]. ISBN 1878-4372. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526615001454#fig0005>.

HARUTA, Miyoshi, SABAT, Grzegorz, STECKER, Kelly, MINKOFF, Benjamin B et SUSSMAN, Michael R, 2014. A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. In : *Science* [en ligne]. 24 janvier 2014. Vol. 343, n° 6169, p. 408-411. DOI 10.1126/science.1244454.

HASWELL, Elizabeth S et VERSLUES, Paul E, 2015. The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing. In : *The Journal of general physiology* [en ligne]. 1 mai 2015. Vol. 145, n° 5, p. 389-94. DOI 10.1085/jgp.201411295.

HAUSER, M T, MORIKAMI, A et BENFEY, P N, 1995. Conditional root expansion mutants of Arabidopsis. In : *Development* [en ligne]. 1995. Vol. 121, n° 4, p. 1237-1252.

HE, J.-X., GENDRON, Joshua M, YANG, Yanli, LI, Jianming et WANG, Z.-Y., 2002. The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2002. Vol. 99, n° 15, p. 10185-10190. DOI 10.1073/pnas.152342599.

HE, Jun Xian, 2016. Yin-yang hormonal crosstalk. In : *Nature Plants* [en ligne]. 2 mars 2016. Vol. 2, n° 3, p. 16023. DOI 10.1038/NPLANTS.2016.23.

HE, Ping, SHAN, Libo, LIN, Nai Chun, MARTIN, Gregory B., KEMMERLING, Birgit, NÜRNBERGER, Thorsten et SHEEN, Jen, 2006. Specific Bacterial Suppressors of MAMP Signaling Upstream of MAPKKK in Arabidopsis Innate Immunity. In : *Cell* [en ligne]. 5 mai 2006. Vol. 125, n° 3, p. 563-575. DOI 10.1016/j.cell.2006.02.047.

HE, Zheng-Hui, FUJIKI, Masaaki et KOHORN, Bruce D, 1996. A Cell Wall-associated, Receptor-like Protein Kinase. In : *The Journal of biological chemistry* [en ligne]. 1996. Vol. 271, n° 33, p. 19789-19793. DOI 10.1074/jbc.271.33.19789.

HEATH, I Brent, 1974. A unified hypothesis for the role of membrane bound enzyme complexes and microtubules in plant cell wall synthesis. In : *Journal of Theoretical Biology* [en ligne]. 1974. Vol. 48, n° 2, p. 445-449. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5193\(74\)80011-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5193(74)80011-1).

HEIM, D R, LARRINUA, I M, MURDOCH, M G et ROBERTS, J L, 1998. Triazofenamide is a cellulose biosynthesis inhibitor. In : *Pesticide Biochemistry and Physiology* [en ligne]. 1998. Vol. 59, n° 3, p. 163-168. DOI 10.1006/pest.1998.2317.

HEIM, D R, ROBERTS, J L, PIKE, P D et LARRINUA, I M, 1989. Mutation of a locus of Arabidopsis thaliana confers resistance to the herbicide isoxaben. In : *Plant Physiol.* 1989. Vol. 90, p. 146-150.

HEIM, D R, SKOMP, J R, WALDRON, C et LARRINUA, I M, 1991. Differential response to isoxaben of cellulose biosynthesis by wild-type and resistance strains of Arabidopsis thaliana. In : *Pestic. Biochem. Physiol.* 1991. Vol. 39, p. 93-99.

HÉMATY, Kian et HÖFTE, Herman, 2008. Novel receptor kinases involved in growth

regulation. In : *Current Opinion in Plant Biology*. 2008. Vol. 11, n° 3, p. 321-328. DOI 10.1016/j.pbi.2008.02.008.

HÉMATY, Kian, SADO, Pierre Etienne, VAN TUINEN, Ageeth, ROCHANGE, Soizic, DESNOS, Thierry, BALZERGUE, Sandrine, PELLETIER, Sandra, RENO, Jean Pierre, HÖFTE, Herman, 2007. A Receptor-like Kinase Mediates the Response of Arabidopsis Cells to the Inhibition of Cellulose Synthesis. In : *Current Biology*. 2007. Vol. 17, n° 11, p. 922-931. DOI 10.1016/j.cub.2007.05.018.

HEPLER, P K et NEWCOMB, E H, 1964. Microtubules and fibrils in the cytoplasm of coleus cells undergoing secondary wall deposition. In : *The Journal of cell biology* [en ligne]. mars 1964. Vol. 20, n° 3, p. 529-532. DOI 10.1083/jcb.20.3.529.

HERNANDEZ-BLANCO, C., FENG, Dong Xin, HU, Jian, SANCHEZ-VALLET, A., DESLANDES, Laurent, LLORENTE, Francisco, BERROCAL-LOBO, Marta, KELLER, Harald, BARLET, Xavier, SANCHEZ-RODRIGUEZ, C., ANDERSON, Lisa K, SOMERVILLE, Shauna, MARCO, Yves et MOLINA, Antonio, 2007. Impairment of Cellulose Synthases Required for Arabidopsis Secondary Cell Wall Formation Enhances Disease Resistance. In : *THE PLANT CELL ONLINE* [en ligne]. 2007. Vol. 19, n° 3, p. 890-903. DOI 10.1105/tpc.106.048058.

HERTH, W., 1987. Effects of 2,6-DCB on plasma membrane rosettes of wheat root cells. In : *Naturwissenschaften* [en ligne]. novembre 1987. Vol. 74, n° 11, p. 556-557. DOI 10.1007/BF00367081.

HEYNDRICKX, Ken S et VANDEPOELE, Klaas, 2012. Systematic Identification of Functional Plant Modules through the Integration of Complementary Data Sources. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. juillet 2012. Vol. 159, n° 3, p. 884-901. DOI 10.1104/pp.112.196725.

HIJAZI, May, VELASQUEZ, Silvia M., JAMET, Elisabeth, ESTEVEZ, JosÃ© M. et ALBENNE, Cécile, 2014. An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 14 août 2014. Vol. 5, p. 395. DOI 10.3389/fpls.2014.00395.

HILL, Joseph L, HAMMUDI, Mustafa B et TIEN, Ming, 2014. The Arabidopsis Cellulose Synthase Complex: A Proposed Hexamer of CESA Trimers in an Equimolar Stoichiometry. In : *The Plant Cell* [en ligne]. 2014. Vol. 26, p. 4834-4842. DOI 10.1105/tpc.114.131193.

HIMMELSPACH, Regina, WILLIAMSON, Richard E. et WASTENEYS, Geoffrey O., 2003. Cellulose microfibril alignment recovers from DCB-induced disruption despite microtubule disorganization. In : *Plant Journal* [en ligne]. 1 novembre 2003. Vol. 36, n° 4, p. 565-575. DOI 10.1046/j.1365-313X.2003.01906.x.

HIRST, Jennifer, EDGAR, James R., BORNER, Georg H. H., LI, Sam, SAHLENDER, Daniela A., ANTROBUS, Robin et ROBINSON, Margaret S., 2015. Contributions of epsinR and gadkin to clathrin-mediated intracellular trafficking. In : LEMMON, Sandra (éd.), *Molecular Biology of the Cell* [en ligne]. septembre 2015. Vol. 26, n° 17, p. 3085-3103. DOI 10.1091/mbc.E15-04-0245.

HIS, Isabelle, DRIOUICH, Azeddine, NICOL, Frédéric, JAUNEAU, Alain et HÖFTE,

Herman, 2001. Altered pectin composition in primary cell walls of korrigan, a dwarf mutant of *Arabidopsis* deficient in a membrane-bound endo-1,4- β -glucanase. In : *Planta* [en ligne]. 2001. Vol. 212, n° 3, p. 348-358. DOI 10.1007/s004250000437.

HOCQ, Ludivine, PELLOUX, Jérôme et LEFEBVRE, Valérie, 2017. *Connecting Homogalacturonan-Type Pectin Remodeling to Acid Growth* [en ligne]. 1 janvier 2017. S.l. : Elsevier Current Trends. [Consulté le 29 mai 2018]. ISBN 1878-4372 (Electronic)r1360-1385 (Linking). Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138516301698?via%3Dihub>.

HOFFMAN et VAUGHN, 1996. Flupoxam Induces Classic Club Root Morphology but Is Not a Mitotic Disrupter Herbicide. In : *Pesticide biochemistry and physiology* [en ligne]. mai 1996. Vol. 55, n° 1, p. 49-53.

HÖFTE, H, GONNEAU, M et VERNHETTES, S, 2007. *Biosynthesis of Cellulose*. S.l. : s.n. ISBN 9780444519672.

HOGETSU, Taizo, SHIBAOKA, Hiroh et SHIMOKORIYAMA, Masami, 1974. Involvement of cellulose synthesis in actions of gibberellin and kinetin on cell expansion. 2,6-Dichlorobenzonitrile as a new cellulose-synthesis inhibitor. In : *Plant Cell Physiol.* [en ligne]. 1 avril 1974. Vol. 15, n° 2, p. 389-393. DOI 10.1093/oxfordjournals.pcp.a075017.

HOLLAND, Neta, HOLLAND, Doron, HELENTJARIS, Tim, DHUGGA, Kanwarpal S, XOCONOSTLE-CAZARES, Beatriz et DELMER, Deborah P, 2000. A Comparative Analysis of the Plant Cellulose Synthase (Cesa) Gene Family. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2000. Vol. 123, n° 4, p. 1313-1324. DOI 10.1104/pp.123.4.1313.

HOLSTEIN, Susanne E.H., 2002. Clathrin and plant endocytosis. In : *Traffic* [en ligne]. 1 septembre 2002. Vol. 3, n° 9, p. 614-620. DOI 10.1034/j.1600-0854.2002.30903.x.

HOOKE, Robert, 1665. *Micrographia, or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses :with observations and inquiries thereupon /by R. Hooke ...* [en ligne]. S.l. : The British Library. ISBN 1602066639. Disponible à l'adresse : <https://www.bl.uk/collection-items/micrographia-by-robert-hooke-1665#>.

HOSON, Takayuki et MASUDA, Yoshio, 1992. Relationship between polysaccharide synthesis and cell wall loosening in auxin-induced elongation of rice coleoptile segments. In : *Plant Science* [en ligne]. 1 janvier 1992. Vol. 83, n° 2, p. 149-154. DOI 10.1016/0168-9452(92)90073-U.

HOWELL, Stephen H., 2013. Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Plants. In : *Annual Review of Plant Biology* [en ligne]. 29 avril 2013. Vol. 64, n° 1, p. 477-499. DOI 10.1146/annurev-arplant-050312-120053.

HU, Zhubing, VANDERHAEGHEN, Rudy, COOLS, Toon, WANG, Yan, DE CLERCQ, Inge, LEROUX, Olivier, NGUYEN, Long, BELT, Katharina, MILLAR, A. Harvey, AUDENAERT, Dominique, HILSON, Pierre, SMALL, Ian, MOUILLE, Grégory, VERNHETTES, Samantha, VAN BREUSEGEM, Frank, WHELAN, James, HÖFTE, Herman et DE VEYLDER, Lieven, 2016. Mitochondrial Defects Confer Tolerance against Cellulose Deficiency. In : *The Plant Cell* [en ligne]. 2016. Vol. 28, n° 9, p. 2276-2290. DOI 10.1105/tpc.16.00540.

HUCK, Norbert, 2003. The Arabidopsis mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. In : *Development* [en ligne]. 15 mai 2003. Vol. 130, n° 10, p. 2149-2159. DOI 10.1242/dev.00458.

HUFFAKER, Alisa, PEARCE, Gregory et RYAN, Clarence A, 2006. An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2006. Vol. 103, n° 26, p. 10098-10103. DOI 10.1073/pnas.0603727103.

HUGGENBERGER, F, JENNINGS, E A, RYAN, P J et BUROW, K W, 1982. Isoxaben, a new selective herbicide for use in cereals. In : *Weeds*. 1982. Vol. 1, p. 47.

ICHIMURA, Kazuya, SHINOZAKI, Kazuo, TENA, Guillaume, SHEEN, Jen, HENRY, Yves, CHAMPION, Anthony, KREIS, Martin, ZHANG, Shuqun, HIRT, Heribert, WILSON, Cathal, HEBERLE-BORS, Erwin, ELLIS, Brian E, MORRIS, Peter C, INNES, Roger W, ECKER, Joseph R, SCHEEL, Dierk, KLESSIG, Daniel F, MACHIDA, Yasunori, MUNDY, John, OHASHI, Yuko et WALKER, John C, 2002. *Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature* [en ligne]. 1 juillet 2002. S.l. : Elsevier Current Trends. [Consulté le 25 août 2018]. ISBN 1360-1385. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138502023026?via%3Dihub>.

IRANI, Niloufer G, DI RUBBO, Simone, MYLLE, Evelien, VAN DEN BEGIN, Jos, SCHNEIDER-PIZOŃ, Joanna, HNILIKOVÁ, Jaroslava, ŠÍŠA, Miroslav, BUYST, Dieter, VILARRASA-BLASI, Josep, SZATMÁRI, Anna Mária, VAN DAMME, Daniël, MISHEV, Kiril, CODREANU, Mirela Corina, KOHOUT, Ladislav, STRNAD, Miroslav, CAÑO-DELGADO, Ana I, FRIML, Jiří, MADDER, Annemieke et RUSSINOVA, Eugenia, 2012. Fluorescent castasterone reveals BRI1 signaling from the plasma membrane. In : *Nature Chemical Biology* [en ligne]. 6 juin 2012. Vol. 8, n° 6, p. 583-589. DOI 10.1038/nchembio.958.

IVAKOV, Alexander A, FLIS, Anna, APELT, Federico, FUENFGELD, Maximilian, SCHERER, Ulrike, STITT, Mark, KRAGLER, Friedrich, VISSENBERG, Kris, PERSSON, Staffan et SUSLOV, Dmitry, 2017. Cellulose synthesis and cell expansion are regulated by different mechanisms in growing Arabidopsis hypocotyls. In : *The Plant Cell*. 2017. DOI 10.1105/tpc.16.00782.

JACOB-WILK, Debora, KUREK, Isaac, HOGAN, Patrick et DELMER, Deborah P, 2006. The cotton fiber zinc-binding domain of cellulose synthase A1 from *Gossypium hirsutum* displays rapid turnover in vitro and in vivo. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2006. Vol. 103, n° 32, p. 12191-12196. DOI 10.1073/pnas.0605098103.

JAILLAIS, Yvon, BELKHADIR, Youssef, BALSEMAO-PIRES, E., DANGL, Jeffery L et CHORY, Joanne, 2011. Extracellular leucine-rich repeats as a platform for receptor/coreceptor complex formation. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 17 mai 2011. Vol. 108, n° 20, p. 8503-8507. DOI 10.1073/pnas.1103556108.

JEANDROZ, Sylvain, LAMOTTE, Olivier, ASTIER, Jérémy, RASUL, Sumaira, TRAPET, Pauline, BESSON-BARD, Angélique, BOURQUE, Stéphane, NICOLAS-FRANCES, V., MA, Wei, BERKOWITZ, Gerald A et WENDEHENNE, David, 2013. There's More to the Picture Than Meets the Eye: Nitric Oxide Cross Talk with Ca²⁺ Signaling. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 1 octobre 2013. Vol. 163, n° 2, p. 459-470.

DOI 10.1104/pp.113.220624.

JOGLEKAR, Shachi, SULIMAN, Mohamed, BARTSCH, Michael, HALDER, Vivek, MAINTZ, Jens, BAUTOR, Jaqueline, ZEIER, Jürgen, PARKER, Jane E et KOMBRINK, Erich, 2018. Chemical Activation of EDS1/PAD4 Signaling Leading to Pathogen Resistance in Arabidopsis. In : *Plant and Cell Physiology* [en ligne]. 1 août 2018. Vol. 59, n° 8, p. 1592-1607. DOI 10.1093/pcp/pcy106.

JOHANSSON, K, EL-AHMAD, M, FRIEMANN, R, JORNVALL, H, MARKOVIC, O et EKLUND, H, 2002. Crystal structure of plant pectin methylesterase. In : *FEBS Lett* [en ligne]. 2002. Vol. 514, n° 2-3, p. 243-249.

JOLIE, Ruben P., DUVETTER, Thomas, HOUBEN, Ken, VANDEVENNE, Evelien, VAN LOEY, Ann M., DECLERCK, Paul J., HENDRICKX, Marc E. et GILS, Ann, 2010. Plant pectin methylesterase and its inhibitor from kiwi fruit: Interaction analysis by surface plasmon resonance. In : *Food Chemistry* [en ligne]. 1 juillet 2010. Vol. 121, n° 1, p. 207-214. DOI 10.1016/j.foodchem.2009.11.073.

JONES, Danielle M., MURRAY, Christian M., KETELAAR, KassaDee J., THOMAS, Joseph J., VILLALOBOS, Jose A. et WALLACE, Ian S., 2016. The Emerging Role of Protein Phosphorylation as a Critical Regulatory Mechanism Controlling Cellulose Biosynthesis. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 24 mai 2016. Vol. 7, p. 684. DOI 10.3389/fpls.2016.00684.

KALLURI, Udaya C., PAYYAVULA, Raja S., LABBÉ, Jessy L., ENGLE, Nancy, BALI, Garima, JAWDY, Sara S., SYKES, Robert W., DAVIS, Mark, RAGAUSKAS, Arthur, TUSKAN, Gerald A. et TSCHAPLINSKI, Timothy J., 2016. Down-Regulation of KORRIGAN-Like Endo- β -1,4-Glucanase Genes Impacts Carbon Partitioning, Mycorrhizal Colonization and Biomass Production in Populus. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 4 octobre 2016. Vol. 7, p. 1455. DOI 10.3389/fpls.2016.01455.

KAMKIN, A. G. (Andreï Glebovich) et KISELEVA, Irina (Irina S.), 2011. *Mechanosensitivity and Mechanotransduction* [en ligne]. S.l. : Springer Science+Business Media B.V. ISBN 978-90-481-9880-1. Disponible à l'adresse : [https://books.google.fr/books?id=zUmyYgLvNuMC&pg=PA214&lpg=PA214&dq=paluch+mechanotransduction&source=bl&ots=9jrMJDk9m4&sig=FEdlVXL9HzdrVuonvGmAcuArbfY&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwIU0f2L3oXdAhUKy4UKHaRhBrMQ6AEwBH0ECAUQAQ#v=onepage&q=paluch mechanotransduction&](https://books.google.fr/books?id=zUmyYgLvNuMC&pg=PA214&lpg=PA214&dq=paluch+mechanotransduction&source=bl&ots=9jrMJDk9m4&sig=FEdlVXL9HzdrVuonvGmAcuArbfY&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwIU0f2L3oXdAhUKy4UKHaRhBrMQ6AEwBH0ECAUQAQ#v=onepage&q=paluch%20mechanotransduction&)

KANG, J S, FRANK, J, KANG, C H, KAJIURA, H, VIKRAM, M, UEDA, A, KIM, S, BAHK, J D, TRIPLETT, B, FUJIYAMA, K, LEE, S Y, VON SCHAEWEN, A et KOIWA, H, 2008. Salt tolerance of Arabidopsis thaliana requires maturation of N-glycosylated proteins in the Golgi apparatus. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* [en ligne]. 2008. Vol. 105, n° 15, p. 5933-5938. DOI 10.1073/pnas.0800237105 [pii]10.1073/pnas.0800237105.

KAWASUMI, Masaoki et NGHIEM, Paul, 2007. *Chemical genetics: Elucidating biological systems with small-molecule compounds* [en ligne]. 2007. S.l. : s.n. [Consulté le 21 août 2018]. ISBN 1523-1747 (Electronic)n0022-202X (Linking). Disponible à l'adresse : www.jidonline.org.

KEEGSTRA, Kenneth, 2010. Plant Cell Walls. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2010. Vol. 154, n° 2, p. 483-486. DOI 10.1104/pp.110.161240.

KERSTENS, S, DECRAEMER, W F et VERBELEN, J P, 2001. Cell walls at the plant surface behave mechanically like fiber-reinforced composite materials. In : *Plant Physiol* [en ligne]. 2001/10/13. 2001. Vol. 127, n° 2, p. 381-385.

KESSLER, Sharon A, LINDNER, Heike, JONES, Daniel S et GROSSNIKLAUS, Ueli, 2014. Functional analysis of related CrRLK1L receptor-like kinases in pollen tube reception. In : *EMBO reports* [en ligne]. 2014. Vol. 16, n° 1, p. 107-15. DOI 10.15252/embr.201438801.

KESTEN, Christopher, MENNA, Alexandra et SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Clara, 2017. *Regulation of cellulose synthesis in response to stress* [en ligne]. 1 décembre 2017. S.l. : Elsevier Current Trends. [Consulté le 23 mars 2018]. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526617300699?via%3Dihub>.

KIEDAISCH, B M, BLANTON, R L et HAIGLER, C H, 2003. Characterization of a novel cellulose synthesis inhibitor. In : *Planta* [en ligne]. 2003. Vol. 217, n° 6, p. 922-930. DOI 10.1007/s00425-003-1071-y.

KIM, H. B., KWON, Mi, RYU, Hojin, FUJIOKA, Shozo, TAKATSUTO, Suguru, YOSHIDA, Shigeo, AN, Chung Sun, LEE, Ilha, HWANG, Ildoo et CHOE, Sunghwa, 2006. The Regulation of DWARF4 Expression Is Likely a Critical Mechanism in Maintaining the Homeostasis of Bioactive Brassinosteroids in Arabidopsis. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 13 janvier 2006. Vol. 140, n° 2, p. 548-557. DOI 10.1104/pp.105.067918.

KIM, Won Chan, KIM, Joo Yeol, KO, Jae Heung, KIM, Jungmook et HAN, Kyung Hwan, 2013. Transcription factor MYB46 is an obligate component of the transcriptional regulatory complex for functional expression of secondary wall-associated cellulose synthases in Arabidopsis thaliana. In : *Journal of Plant Physiology* [en ligne]. 15 octobre 2013. Vol. 170, n° 15, p. 1374-1378. DOI 10.1016/j.jplph.2013.04.012.

KIM, Won Chan, KO, Jae Heung et HAN, Kyung Hwan, 2012. Identification of a cis-acting regulatory motif recognized by MYB46, a master transcriptional regulator of secondary wall biosynthesis. In : *Plant Molecular Biology* [en ligne]. 21 mars 2012. Vol. 78, n° 4-5, p. 489-501. DOI 10.1007/s11103-012-9880-7.

KIM, Won Chan, KO, Jae Heung, KIM, Joo Yeol, KIM, Jungmook, BAE, Hyeun Jong et HAN, Kyung Hwan, 2013. MYB46 directly regulates the gene expression of secondary wall-associated cellulose synthases in Arabidopsis. In : *Plant Journal* [en ligne]. 1 janvier 2013. Vol. 73, n° 1, p. 26-36. DOI 10.1111/j.1365-313x.2012.05124.x.

KIMURA, Satoshi, 1999. Immunogold Labeling of Rosette Terminal Cellulose-Synthesizing Complexes in the Vascular Plant *Vigna angularis*. In : *THE PLANT CELL ONLINE* [en ligne]. 1999. Vol. 11, n° 11, p. 2075-2086. DOI 10.1105/tpc.11.11.2075.

KING, Russell R., HAROLD LAWRENCE, C. et GRAY, James A., 2001. Herbicidal properties of the thaxtomin group of phytotoxins. In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [en ligne]. 2001. Vol. 49, n° 5, p. 2298-2301. DOI 10.1021/jf0012998.

KINOSHITA, Toshinori, CAÑO-DELGADO, Ana, SETO, Hideharu, HIRANUMA, Sayoko, FUJIOKA, Shozo, YOSHIDA, Shigeo et CHORY, Joanne, 2005. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BR11. In : *Nature* [en ligne]. 13 janvier 2005. Vol. 433, n° 7022, p. 167-171. DOI 10.1038/nature03227.

KNOX, J. Paul, LINSTEAD, Paul J., KING, Janet, COOPER, Christine et ROBERTS, Keith, 1990. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. In : *Planta*. 1990. Vol. 181, n° 4, p. 512-521. DOI 10.1007/BF00193004.

KO, Jae Heung, KIM, Won Chan et HAN, Kyung Hwan, 2009. Ectopic expression of MYB46 identifies transcriptional regulatory genes involved in secondary wall biosynthesis in Arabidopsis. In : *Plant Journal* [en ligne]. 1 novembre 2009. Vol. 60, n° 4, p. 649-665. DOI 10.1111/j.1365-313X.2009.03989.x.

KO, Jae Heung, PRASSINOS, Constantinos, KEATHLEY, Daniel et HAN, Kyung Hwan, 2011. Novel aspects of transcriptional regulation in the winter survival and maintenance mechanism of poplar. In : *Tree Physiology* [en ligne]. 1 février 2011. Vol. 31, n° 2, p. 208-225. DOI 10.1093/treephys/tpq109.

KOCK, C, DUFRENE, Y F et HEINISCH, J J, 2015. Up against the wall: is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? In : *Appl Environ Microbiol* [en ligne]. 2015. Vol. 81, n° 3, p. 806-811. DOI 10.1128/AEM.03273-14.

KOHORN, Bruce D., HOON, Divya, MINKOFF, Benjamin B, SUSSMAN, Michael R et KOHORN, Susan L, 2016. Rapid Oligo-Galacturonide Induced Changes in Protein Phosphorylation in Arabidopsis. In : *Molecular & Cellular Proteomics* [en ligne]. 2016. Vol. 15, n° 4, p. 1351-1359. DOI 10.1074/mcp.M115.055368.

KOHORN, Bruce D., JOHANSEN, Susan, SHISHIDO, Akira, TODOROVA, Tanya, MARTINEZ, Rhysly, DEFEO, Elita et OBREGON, Pablo, 2009. Pectin activation of MAP kinase and gene expression is WAK2 dependent. In : *Plant Journal* [en ligne]. 1 décembre 2009. Vol. 60, n° 6, p. 974-982. DOI 10.1111/j.1365-313X.2009.04016.x.

KOMIS, George, ŠAMAJOVÁ, Olga, OVEČKA, Miroslav et ŠAMAJ, Jozef, 2018. Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. In : *Annual review of plant biology* [en ligne]. 29 avril 2018. Vol. 69, n° 1, p. annurev-arplant-042817-040314. DOI 10.1146/annurev-arplant-042817-040314.

KOOPMAN, H. et DAAMS, J., 1960. 2,6-Dichlorobenzonitrile: a New Herbicide. In : *Nature* [en ligne]. 2 avril 1960. Vol. 186, n° 4718, p. 89-90. DOI 10.1038/186089a0.

KUDO, Noriaki, FURUTA, Satoru, TANIGUCHI, Misa, ENDO, Takeshi et SATO, Kazuo, 1999. Synthesis and Herbicidal Activity of 1,5-Diarylpyrazole Derivatives. In : *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* [en ligne]. 15 juin 1999. Vol. 47, n° 6, p. 857-868. DOI 10.1248/cpb.47.857.

KUMAR, Kundan, WANKHEDE, Dhammaprakash Pandhari et SINHA, Alok Krishna, 2013. *Signal convergence through the lenses of MAP kinases: Paradigms of stress and hormone signaling in plants* [en ligne]. février 2013. S.l. : SP Higher Education Press. [Consulté le 25 août 2018]. ISBN 1151501212. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/s11515-012-1207-1>.

KUMAR, Manoj, ATANASSOV, Ivan et TURNER, Simon, 2017. Functional Analysis of Cellulose Synthase (CESA) Protein Class Specificity. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 1 février 2017. Vol. 173, n° 2, p. 970-983. DOI 10.1104/pp.16.01642.

KUMAR, Manoj, MISHRA, Laxmi, CARR, Paul, PILLING, Michael, GARDNER, Peter, MANSFIELD, Shawn D. et TURNER, Simon R., 2018. Exploiting CELLULOSE SYNTHASE (CESA) class-specificity to probe cellulose microfibril biosynthesis. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2018. Vol. 177, n° May, p. pp.00263.2018. DOI 10.1104/pp.18.00263.

KUMAR, Manoj et TURNER, Simon, 2015. *Plant cellulose synthesis: CESA proteins crossing kingdoms* [en ligne]. 1 avril 2015. S.l. : Pergamon. [Consulté le 10 juillet 2018]. ISBN 0031-9422. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942214002799#f0005>.

KUMAR, Manoj, WIGHTMAN, Raymond, ATANASSOV, Ivan, GUPTA, Anjali, HURST, Charlotte H, HEMSLEY, Piers A et TURNER, Simon, 2016. S-acylation of the cellulose synthase complex is essential for its plasma membrane localization. In : *Science* [en ligne]. 8 juillet 2016. Vol. 353, n° 6295, p. 166-169. DOI 10.1126/science.aaf4009.

KUREK, Isaac, KAWAGOE, Yasushi, JACOB-WILK, Deborah, DOBLIN, Monika et DELMER, Deborah, 2002. Dimerization of cotton fiber cellulose synthase catalytic subunits occurs via oxidation of the zinc-binding domains. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2002. Vol. 99, n° 17, p. 11109-11114. DOI 10.1073/pnas.162077099.

KURUSU, Takamitsu, KUCHITSU, Kazuyuki, NAKANO, Masataka, NAKAYAMA, Yoshitaka et IIDA, Hidetoshi, 2013. Plant mechanosensing and Ca²⁺ transport. In : *Trends in Plant Science* [en ligne]. 1 avril 2013. Vol. 18, n° 4, p. 227-233. DOI 10.1016/j.tplants.2012.12.002.

KWON, Y, KIM, S H, JUNG, M S, KIM, M S, OH, J E, JU, H W, KIM, K I, VIERLING, E, LEE, H et HONG, S W, 2007. Arabidopsis hot2 encodes an endochitinase-like protein that is essential for tolerance to heat, salt and drought stresses. In : *Plant J* [en ligne]. 2006/12/13. 2007. Vol. 49, n° 2, p. 184-193. DOI TPJ2950 [pii]10.1111/j.1365-313X.2006.02950.x.

LADO, P, DE MICHELIS, M. I., CERANA, R et MARRÈ, E, 1976. Fusicoccin-induced, K⁺-stimulated proton secretion and acid-induced growth of apical root segments. In : *Plant Science Letters* [en ligne]. 1 janvier 1976. Vol. 6, n° 1, p. 5-20. DOI 10.1016/0304-4211(76)90173-5.

LAMPORT, D T, KIELISZEWSKI, M J, CHEN, Y et CANNON, M C, 2011. Role of the Extensin Superfamily in Primary Cell Wall Architecture. In : *Plant Physiol* [en ligne]. 2011/03/19. 2011. DOI pp.110.169011 [pii]10.1104/pp.110.169011.

LANE, D R, WIEDEMEIER, A, PENG, L, HÖFTE, H, VERNHETTES, S, DESPREZ, T, HOCART, C H, BIRCH, R J, BASKIN, T I, BURN, J E, ARIOLI, T, BETZNER, A S et WILLIAMSON, R E, 2001. Temperature-sensitive alleles of rsw2 link the KORRIGAN endo-1,4-β-glucanase to cellulose synthesis and cytokinesis in Arabidopsis. In : *Plant Physiology*. 2001. Vol. 126, n° 1. DOI 10.1104/pp.126.1.278.

LARSKAYA, I A et GORSHKOVA, T A, 2015. Plant Oligosaccharides – Outsiders among Elicitors? In : *Biochemistry* [en ligne]. 2015. Vol. 80, n° 7, p. 1049-1071. DOI 10.1134/S0006297915070081.

LEDBETTER, M C et PORTER, K R, 1963. A « MICROTUBULE » IN PLANT CELL FINE

STRUCTURE. In : *J Cell Biol* [en ligne]. 1963. Vol. 19, n° 1, p. 239-250.

LEE, H, SPARKES, I, GATTOLIN, S, DZIMITROWICZ, N, ROBERTS, L M, HAWES, C et FRIGERIO, L, 2013. An Arabidopsis reticulon and the atlastin homologue RHD3-like2 act together in shaping the tubular endoplasmic reticulum. In : *The New phytologist* [en ligne]. 2012/11/21. 2013. Vol. 197, n° 2, p. 481-489. DOI 10.1111/nph.12038.

LEI, Lei, LI, Shundai, DU, Juan, BASHLINE, Logan et GU, Ying, 2013. CELLULOSE SYNTHASE INTERACTIVE3 Regulates Cellulose Biosynthesis in Both a Microtubule-Dependent and Microtubule-Independent Manner in Arabidopsis. In : *The Plant Cell* [en ligne]. 2013. Vol. 25, n° 12, p. 4912-4923. DOI 10.1105/tpc.113.116715.

LEI, Lei, LI, Shundai et GU, Ying, 2012. Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1) mediates the intimate relationship between cellulose microfibrils and cortical microtubules. In : *Plant Signaling & Behavior* [en ligne]. 2012. Vol. 7, n° 7, p. 714-718. DOI 10.4161/psb.20338.

LEVIN, David E, 2011. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. In : *Genetics*. 2011. Vol. 189, n° 4, p. 1145-1175. DOI 10.1534/genetics.111.128264.

LEVY, Samuel, MACLACHLAN, Gordon et STAEHELIN, L. Andrew, 1997. Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. In : *Plant Journal* [en ligne]. 1 mars 1997. Vol. 11, n° 3, p. 373-386. DOI 10.1046/j.1365-3113.1997.11030373.x.

LI, Chao, YEH, Fang Ling, CHEUNG, Alice Y., DUAN, Qiaohong, KITA, Daniel, LIU, Ming Che, MAMAN, Jacob, LUU, Emily J., WU, Brendan W., GATES, Laura, JALAL, Methun, KWONG, Amy, CARPENTER, Hunter et WU, Hen Ming, 2015. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins as chaperones and co-receptors for FERONIA receptor kinase signaling in Arabidopsis. In : *eLife*. 2015. Vol. 4, n° JUNE, p. 1-21. DOI 10.7554/eLife.06587.

LI, R, LIU, P, WAN, Y, CHEN, T, WANG, Q, METTBACH, U, BALUSKA, F, SAMAJ, J, FANG, X, LUCAS, W J et LIN, J, 2012. A membrane microdomain-associated protein, Arabidopsis flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. In : *Plant Cell* [en ligne]. 2012/05/17. 2012. Vol. 24, n° 5, p. 2105-2122. DOI tpc.112.095695 [pii]10.1105/tpc.112.095695.

LI, S, LEI, L et GU, Y, 2013. Functional analysis of complexes with mixed primary and secondary cellulose synthases. In : *Plant Signaling & Behavior* [en ligne]. 2013/01/10. 2013. Vol. 8, n° 3.

LI, Shundai, BASHLINE, Logan, LEI, Lei et GU, Ying, 2014. Cellulose Synthesis and Its Regulation. In : *The Arabidopsis Book* [en ligne]. 2014. Vol. 12, p. e0169. DOI 10.1199/tab.0169.

LI, Shundai, LEI, Lei, SOMERVILLE, Chris R et GU, Ying, 2012. Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1) links microtubules and cellulose synthase complexes. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2012. Vol. 109, n° 1, p. 185-190. DOI 10.1073/pnas.1118560109.

LIANG, Xiangxiu et ZHOU, Jian-Min, 2018. Receptor-Like Cytoplasmic Kinases: Central Players in Plant Receptor Kinase-Mediated Signaling. In : *Annu. Rev. Plant Biol* [en ligne]. 29 avril 2018. Vol. 69, n° 1, p. 267-99. DOI 10.1146/annurev-arplant-042817.

LIAO, Hongdong, TANG, Renjie, ZHANG, Xin, LUAN, Sheng et YU, Feng, 2017. FERONIA Receptor Kinase at the Crossroads of Hormone Signaling and Stress Responses. In : *Plant and Cell Physiology* [en ligne]. 1 juillet 2017. Vol. 58, n° 7, p. 1143-1150. DOI 10.1093/pcp/pcx048.

LIEBMINGER, Eva, GRASS, Josephine, ALTMANN, Friedrich, MACH, Lukas et STRASSER, Richard, 2013. Characterizing the link between glycosylation state and enzymatic activity of the endo-B1,4-glcuanase KORRIGAN1 from *Arabidopsis thaliana*. In : *Journal of Biological Chemistry* [en ligne]. 2 août 2013. Vol. 288, n° 31, p. 22270-22280. DOI 10.1074/jbc.M113.475558.

LIN, D, CAO, L, ZHOU, Z, ZHU, L, EHRHARDT, D, YANG, Z et FU, Y, 2013. Rho GTPase Signaling Activates Microtubule Severing to Promote Microtubule Ordering in *Arabidopsis*. In : *Current biology: CB* [en ligne]. 2013/02/12. 2013. DOI 10.1016/j.cub.2013.01.022.

LIN, Wenwei, TANG, Wenxin, ANDERSON, Charles et YANG, Zhenbiao, 2018. FERONIA's sensing of cell wall pectin activates ROP GTPase signaling in *Arabidopsis*. In : *bioRxiv* [en ligne]. 22 février 2018. p. 269647. DOI 10.1101/269647.

LINDEBOOM, Jelmer J, NAKAMURA, Masayoshi, HIBBEL, Anneke, SHUNDYAK, Kostya, GUTIERREZ, Ryan, KETELAAR, Tijs, EMONS, Anne Mie C, MULDER, Bela M, KIRIK, Viktor et EHRHARDT, David W, 2013. A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. In : *Science* [en ligne]. 6 décembre 2013. Vol. 342, n° 6163, p. 1245533. DOI 10.1126/science.1245533.

LINDNER, Heike, KESSLER, Sharon A., MÜLLER, Lena M., SHIMOSATO-ASANO, Hiroko, BOISSON-DERNIER, Aurélien et GROSSNIKLAUS, Ueli, 2015. TURAN and EVAN Mediate Pollen Tube Reception in *Arabidopsis* Synergids through Protein Glycosylation. In : YANG, Zhenbiao (éd.), *PLoS Biology* [en ligne]. 28 avril 2015. Vol. 13, n° 4, p. e1002139. DOI 10.1371/journal.pbio.1002139.

LINDNER, Heike, MÜLLER, Lena Maria, BOISSON-DERNIER, Aurélien et GROSSNIKLAUS, Ueli, 2012. CrRLK1L receptor-like kinases: Not just another brick in the wall. In : *Current Opinion in Plant Biology*. 2012. Vol. 15, n° 6, p. 659-669. DOI 10.1016/j.pbi.2012.07.003.

LINO, Bárbara, BAIZABAL-AGUIRRE, Victor M. et DE LA VARA, Luis E.González, 1998. The plasma-membrane H⁺-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. In : *Planta* [en ligne]. 20 février 1998. Vol. 204, n° 3, p. 352-359. DOI 10.1007/s004250050266.

LIONETTI, Vincenzo et MÉTRAUX, Jean-Pierre, 2014. *Plant cell wall in pathogenesis, parasitism and symbiosis* [en ligne]. S.l. : s.n. ISBN 9782889194421. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00612/abstract>.

LIU, Lifeng, SHANG-GUAN, Keke, ZHANG, Baocai, LIU, Xiangling, YAN, Meixian, ZHANG, Lanjun, SHI, Yanyun, ZHANG, Mu, QIAN, Qian, LI, Jiayang et ZHOU, Yihua, 2013.

Brittle Culm1, a COBRA-Like Protein, Functions in Cellulose Assembly through Binding Cellulose Microfibrils. In : *PLoS Genetics* [en ligne]. 2013. Vol. 9, n° 8, p. 1003704. DOI 10.1371/journal.pgen.1003704.

LIU, Zengyu, SCHNEIDER, Rene, KESTEN, Christopher, ZHANG, Yi, SOMSSICH, Marc, ZHANG, Youjun, FERNIE, Alisdair R. et PERSSON, Staffan, 2016. Cellulose-Microtubule Uncoupling Proteins Prevent Lateral Displacement of Microtubules during Cellulose Synthesis in Arabidopsis. In : *Developmental Cell* [en ligne]. 8 août 2016. Vol. 38, n° 3, p. 305-315. DOI 10.1016/j.devcel.2016.06.032.

LLOYD, Clive et CHAN, Jordi, 2008. The parallel lives of microtubules and cellulose microfibrils. In : *Current Opinion in Plant Biology* [en ligne]. 1 décembre 2008. Vol. 11, n° 6, p. 641-646. DOI 10.1016/j.pbi.2008.10.007.

LOMBARD, Vincent, GOLACONDA RAMULU, Hemalatha, DRULA, Elodie, COUTINHO, Pedro M. et HENRISSAT, Bernard, 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. In : *Nucleic Acids Research* [en ligne]. 1 janvier 2014. Vol. 42, n° D1, p. D490-D495. DOI 10.1093/nar/gkt1178.

LOS, Dmitry A. et MURATA, Norio, 2004. *Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals* [en ligne]. 3 novembre 2004. S.l. : Elsevier. [Consulté le 16 août 2018]. ISBN 0005-2736. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273604002032>.

LOZANO-DURÁN, Rosa et ZIPFEL, Cyril, 2015. *Trade-off between growth and immunity: Role of brassinosteroids* [en ligne]. 1 janvier 2015. S.l. : Elsevier Current Trends. [Consulté le 25 août 2018]. ISBN 1878-4372 (Electronic)r1360-1385 (Linking). Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138514002283#fig0005>.

LU, D, LIN, W, GAO, X, WU, S, CHENG, C, AVILA, J, HEESE, A, DEVARENNE, T P, HE, P et SHAN, L, 2011. Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. In : *Science* [en ligne]. 2011/06/18. 2011. Vol. 332, n° 6036, p. 1439-1442. DOI 332/6036/1439 [pii]10.1126/science.1204903.

LUO, Yu, SCHOLL, Stefan, DOERING, Anett, ZHANG, Yi, IRANI, Niloufer G., DI RUBBO, Simone, NEUMETZLER, Lutz, KRISHNAMOORTHY, Praveen, VAN HOUTTE, Isabelle, MYLLE, Evelien, BISCHOFF, Volker, VERNHETTES, Samantha, WINNE, Johan, FRIML, Jiří, STIERHOF, York-Dieter, SCHUMACHER, Karin, PERSSON, Staffan et RUSSINOVA, Eugenia, 2015. V-ATPase activity in the TGN/EE is required for exocytosis and recycling in Arabidopsis. In : *Nature Plants* [en ligne]. 6 juillet 2015. Vol. 1, n° 7, p. 15094. DOI 10.1038/nplants.2015.94.

MANFIELD, Iain W., ORFILA, Caroline, MCCARTNEY, Lesley, HARHOLT, Jesper, BERNAL, Adriana J., SCHELLER, Henrik Vibe, GILMARTIN, Philip M., MIKKELSEN, Jørn D., KNOX, J. Paul et WILLATS, William G. T., 2004. Novel cell wall architecture of isoxaben-habituated Arabidopsis suspension-cultured cells: Global transcript profiling and cellular analysis. In : *Plant Journal* [en ligne]. 17 septembre 2004. Vol. 40, n° 2, p. 260-275. DOI 10.1111/j.1365-313X.2004.02208.x.

MANZANO, Concepción, ABRAHAM, Zamira, LÓPEZ-TORREJÓN, Gema et DEL POZO, Juan C., 2008. Identification of ubiquitinated proteins in Arabidopsis. In : *Plant Molecular*

Biology [en ligne]. 2008. Vol. 68, n° 1-2, p. 145-158. DOI 10.1007/s11103-008-9358-9.

MANZOOR, Hamid, KELLONIEMI, Jani, CHILTZ, Annick, WENDEHENNE, David, PUGIN, Alain, POINSSOT, Benoit et GARCIA-BRUGGER, Angela, 2013. Involvement of the glutamate receptor AtGLR3.3 in plant defense signaling and resistance to *Hyaloperonospora arabidopsidis*. In : *Plant Journal* [en ligne]. 1 novembre 2013. Vol. 76, n° 3, p. 466-480. DOI 10.1111/tpj.12311.

MAO, D, YU, F, LI, J, B, Van De Poel, TAN, D, LI, J, LIU, Y, LI, X, DONG, M, CHEN, L, LI, D et LUAN, S, 2015. FERONIA Receptor Kinase Interacts with S-adenosylmethionine Synthetase and Suppresses S-adenosylmethionine Production and Ethylene Biosynthesis in Arabidopsis. In : *Plant Cell Environ* [en ligne]. 2015. DOI 10.1111/pce.12570.

MASACHIS, Sara, SEGORBE, David, TURRÀ, David, LEON-RUIZ, Mercedes, FÜRST, Ursula, EL GHALID, Mennat, LEONARD, Guy, LÓPEZ-BERGES, Manuel S, RICHARDS, Thomas A, FELIX, Georg et DI PIETRO, Antonio, 2016. A fungal pathogen secretes plant alkalizing peptides to increase infection. In : *Nature Microbiology*. 2016. Vol. 1, n° 6, p. 16043. DOI 10.1038/nmicrobiol.2016.43.

MATTHYSSE, Ann G, THOMAS, Darby L et WHITE, Alan R, 1995. Mechanism of Cellulose Synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. In : *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* [en ligne]. 1995. Vol. 177, n° 4, p. 1076-1081.

MBENGUE, Malick, BOURDAIS, Gildas, GERVASI, Fabio, BECK, Martina, ZHOU, Ji, SPALLEK, Thomas, BARTELS, Sebastian, BOLLER, Thomas, UEDA, Takashi, KUHN, Hannah et ROBATZEK, Silke, 2016. Clathrin-dependent endocytosis is required for immunity mediated by pattern recognition receptor kinases. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2016. Vol. 113, n° 39, p. 11034-11039. DOI 10.1073/pnas.1606004113.

MCCARTHY, Ryan L., ZHONG, Ruiqin et YE, Zheng Hua, 2009. MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in arabidopsis. In : *Plant and Cell Physiology* [en ligne]. 1 novembre 2009. Vol. 50, n° 11, p. 1950-1964. DOI 10.1093/pcp/pcp139.

MCFARLANE, Heather E., DÖRING, Anett et PERSSON, Staffan, 2014. The Cell Biology of Cellulose Synthesis. In : *Annual Review of Plant Biology* [en ligne]. 2014. Vol. 65, n° 1, p. 69-94. DOI 10.1146/annurev-arplant-050213-040240.

MCNEIL, Michael, DARVILL, Alan G., FRY, Stephen C. et ALBERSHEIM, Peter, 1984. Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants. In : *Annual Review of Biochemistry* [en ligne]. 28 juin 1984. Vol. 53, n° 1, p. 625-663. DOI 10.1146/annurev.bi.53.070184.003205.

MCQUEEN-MASON, Simon, DURACHKO, Daniel M et COSGROVE, Daniel J, 1992. Two Endogenous Pmteins That Induce Cell Wall Extension in Plants. In : *The Plant Cell* [en ligne]. 1 novembre 1992. Vol. 4, n° November, p. 1425-1433. DOI 10.1105/tpc.4.11.1425.

MEENTS, Miranda J, WATANABE, Yoichiro et SAMUELS, A Lacey, 2018. *The cell biology of secondary cell wall biosynthesis* [en ligne]. 11 mai 2018. S.l. : Oxford University Press. [Consulté le 23 mai 2018]. Disponible à l'adresse :

<https://academic.oup.com/aob/article/121/6/1107/4839028>.

MEINERT, M C et DELMER, D P, 1977. Changes in Biochemical Composition of the Cell Wall of the Cotton Fiber During Development. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. juin 1977. Vol. 59, n° 6, p. 1088-1097. DOI 10.1104/pp.59.6.1088.

MERCADANTE, Davide, MELTON, Laurence D., JAMESON, Geoffrey B., WILLIAMS, Martin A K et DE SIMONE, Alfonso, 2013. Substrate dynamics in enzyme action: Rotations of monosaccharide subunits in the binding groove are essential for pectin methylesterase processivity. In : *Biophysical Journal* [en ligne]. 16 avril 2013. Vol. 104, n° 8, p. 1731-1739. DOI 10.1016/j.bpj.2013.02.049.

MIART, F, DESPREZ, T, BIOT, E, MORIN, H, BELCRAM, K, HÖFTE, H, GONNEAU, M et VERNHETTES, S, 2014. Spatio-temporal analysis of cellulose synthesis during cell plate formation in Arabidopsis. In : *Plant Journal*. 2014. Vol. 77, n° 1. DOI 10.1111/tpj.12362.

MITSUDA, Nobutaka, IWASE, Akira, YAMAMOTO, Hiroyuki, YOSHIDA, Masato, SEKI, Motoaki, SHINOZAKI, Kazuo et OHME-TAKAGI, Masaru, 2007. NAC Transcription Factors, NST1 and NST3, Are Key Regulators of the Formation of Secondary Walls in Woody Tissues of Arabidopsis. In : *THE PLANT CELL ONLINE* [en ligne]. 2007. Vol. 19, n° 1, p. 270-280. DOI 10.1105/tpc.106.047043.

MIYAZAKI, Saori, MURATA, Takashi, SAKURAI-OZATO, Nami, KUBO, Minoru, DEMURA, Taku, FUKUDA, Hiroo et HASEBE, Mitsuyasu, 2009. ANXUR1 and 2, Sister Genes to FERONIA/SIRENE, Are Male Factors for Coordinated Fertilization. In : *Current Biology* [en ligne]. 11 août 2009. Vol. 19, n° 15, p. 1327-1331. DOI 10.1016/j.cub.2009.06.064.

MIZUTA, S. et BROWN, Jr. R. M., 1992. *Effects of 2,6-dichlorobenzonitrile and Tinopal LPW on the structure of the cellulose synthesizing complexes of Vaucheria hamata* [en ligne]. septembre 1992. S.l. : Springer-Verlag. [Consulté le 23 août 2018]. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/BF01322782>.

MOLINA, Antonio et GARCÍA-OLMEDO, Francisco, 1993. Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. In : *Plant Journal* [en ligne]. 1 décembre 1993. Vol. 4, n° 6, p. 983-991. DOI 10.1046/j.1365-313X.1993.04060983.x.

MOLONEY, M. M., ELLIOTT, M. C. et CLELAND, R. E., 1981. Acid growth effects in maize roots: Evidence for a link between auxin-economy and proton extrusion in the control of root growth. In : *Planta* [en ligne]. juillet 1981. Vol. 152, n° 4, p. 285-291. DOI 10.1007/BF00388251.

MONSHAUSEN, G B et HASWELL, E S, 2013. A force of nature: molecular mechanisms of mechanoperception in plants. In : *Journal of Experimental Botany* [en ligne]. 2013/08/06. 2013. Vol. 64, n° 15, p. 4663-4680. DOI 10.1093/jxb/ert204.

MONSHAUSEN, Gabriele B., MILLER, Nathan D., MURPHY, Angus S. et GILROY, Simon, 2011. Dynamics of auxin-dependent Ca²⁺ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. In : *Plant Journal* [en ligne]. 1 janvier 2011. Vol. 65, n° 2, p. 309-318. DOI 10.1111/j.1365-313X.2010.04423.x.

MONSHAUSEN, Gabriele B, BIBIKOVA, Tatiana N, WEISENSEEL, Manfred H et GILROY, Simon, 2009. Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in Arabidopsis roots. In : *The Plant cell* [en ligne]. 1 août 2009. Vol. 21, n° 8, p. 2341-56. DOI 10.1105/tpc.109.068395.

MONTEZINOS, David et DELMER, Deborah P., 1980. Characterization of Inhibitors of Cellulose Synthesis in Cotton Fibers. In : *Planta* [en ligne]. avril 1980. Vol. 148, n° 4, p. 305-311. DOI 10.1007/BF00388116.

MORGAN, Jacob L.W., STRUMILLO, Joanna et ZIMMER, Jochen, 2013. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. In : *Nature* [en ligne]. 9 décembre 2013. Vol. 493, n° 7431, p. 181-186. DOI 10.1038/nature11744.

MORI, Kendo, RENHU, Na, NAITO, Maho, NAKAMURA, Aki, SHIBA, Hayato, YAMAMOTO, Tsuyoshi, SUZAKI, Takuya, IIDA, Hidetoshi et MIURA, Kenji, 2018. Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels MCA1 and MCA2 mediate cold-induced cytosolic Ca²⁺-increase and cold tolerance in Arabidopsis. In : *Scientific Reports* [en ligne]. 11 décembre 2018. Vol. 8, n° 1, p. 550. DOI 10.1038/s41598-017-17483-y.

MORRIS, E R, POWELL, D A, GIDLEY, M J et REES, D A, 1982. Conformations and interactions of pectins. In : *J Mol Biol* [en ligne]. 1982. Vol. 155, n° 4, p. 507-516. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90484-3](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(82)90484-3).

MOUILLE, Grégory, ROBIN, Stéphane, LECOMTE, Mannaig, PAGANT, Silvère et HÖFTE, Herman, 2003. Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. In : *Plant Journal*. 2003. Vol. 35, n° 3, p. 393-404. DOI 10.1046/j.1365-313X.2003.01807.x.

MOURA, Jullyana Cristina Magalhães Silva, BONINE, Cesar Augusto Valencise, DE OLIVEIRA FERNANDES VIANA, Juliana, DORNELAS, Marcelo Carnier et MAZZAFERA, Paulo, 2010. *Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants* [en ligne]. avril 2010. S.l.: Wiley/Blackwell (10.1111). [Consulté le 12 juin 2018]. ISBN 1744-7909 (Electronic)r1672-9072 (Linking). Disponible à l'adresse : <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x>.

MOUSSU, Steven, AUGUSTIN, Sebastian, ROMAN, Andra Octavia, BROYART, Caroline et SANTIAGO, Julia, 2018. Crystal structures of two tandem malectin-like receptor kinases involved in plant reproduction. In : *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology* [en ligne]. 1 juillet 2018. Vol. 74, n° 7, p. 671-680. DOI 10.1107/S205979831800774X.

MOUSTAFA, Khaled, ABUQAMAR, Synan, JARRAR, Mohammad, AL-RAJAB, Abdul Jabbar et TRÉMOUILLAUX-GUILLER, Jocelyne, 2014. *MAPK cascades and major abiotic stresses* [en ligne]. 15 août 2014. S.l.: Springer Berlin Heidelberg. [Consulté le 25 août 2018]. ISBN 0721-7714. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/s00299-014-1629-0>.

MUELLER, Susette C., BROWN, R. Malcolm et SCOTT, Tom K., 1976. Cellulosic microfibrils: Nascent stages of synthesis in a higher plant cell. In : *Science* [en ligne]. 26 novembre 1976. Vol. 194, n° 4268, p. 949-951. DOI 10.1126/science.194.4268.949.

MUELLER, Susette C et MALCOLM BROWN, R., 1980. Evidence for an intramembrane

component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. In : *Journal of Cell Biology* [en ligne]. 1 février 1980. Vol. 84, n° 2, p. 315-326. DOI 10.1083/jcb.84.2.315.

MUKHTAR, M Shahid, CARVUNIS, Anne Ruxandra, DREZE, Matija, EPPLE, Petra, STEINBRENNER, Jens, MOORE, Jonathan, TASAN, Murat, GALLI, Mary, HAO, Tong, NISHIMURA, Marc T, PEVZNER, Samuel J, DONOVAN, Susan E, GHAMSARI, Lila, SANTHANAM, Balaji, ROMERO, Viviana, POULIN, Matthew M, GEBREAB, Fana, GUTIERREZ, Bryan J, TAM, Stanley, MONACHELLO, Dario, BOXEM, Mike, HARBORT, Christopher J, MCDONALD, Nathan, GAI, Lantian, CHEN, Huaming, HE, Yijian, VANDENHAUTE, Jean, ROTH, Frederick P, HILL, David E, ECKER, Joseph R, VIDAL, Marc, BEYNON, Jim, BRAUN, Pascal, DANGL, Jeffery L, CABRAL, A., VAN DEN ACKERVEKEN, G., BATOR, J., YATUSEVICH, R., KATOU, S., PARKER, J., FABRO, G., JONES, J., COATES, M. et PAYNE, T., 2011. Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. In : *Science* [en ligne]. 29 juillet 2011. Vol. 333, n° 6042, p. 596-601. DOI 10.1126/science.1203659.

MULKEY, Timothy J et EVANS, Michael L, 1981. Geotropism in corn roots: Evidence for its mediation by differential acid efflux. In : *Science* [en ligne]. 3 avril 1981. Vol. 212, n° 4490, p. 70-71. DOI 10.1126/science.212.4490.70.

MUNNÉ-BOSCH, Sergi et MÜLLER, Maren, 2013. Hormonal cross-talk in plant development and stress responses. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 24 décembre 2013. Vol. 4, p. 529. DOI 10.3389/fpls.2013.00529.

NEWMAN, R H, HILL, S J et HARRIS, P J, 2013. Wide-angle x-ray scattering and solid-state nuclear magnetic resonance data combined to test models for cellulose microfibrils in mung bean cell walls. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2013/10/25. 2013. Vol. 163, n° 4, p. 1558-1567. DOI 10.1104/pp.113.228262.

NGO, Q A, VOGLER, H, LITUIEV, D S, NESTOROVA, A et GROSSNIKLAUS, U, 2014. A calcium dialog mediated by the FERONIA signal transduction pathway controls plant sperm delivery. In : *Dev Cell* [en ligne]. 2014/05/13. 2014. Vol. 29, n° 4, p. 491-500. DOI 10.1016/j.devcel.2014.04.008.

NIBAU, Candida, WU, Hen ming et CHEUNG, Alice Y., 2006. *RAC/ROP GTPases: « hubs » for signal integration and diversification in plants* [en ligne]. 1 juin 2006. S.l. : Elsevier Current Trends. [Consulté le 28 août 2018]. ISBN 1360-1385 (Print)r1360-1385 (Linking). Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138506001026?via%3Dihub>.

NICOL, Frédéric, HIS, Isabelle, JAUNEAU, Alain, VERNHETTES, Samantha, CANUT, Hervé et HÖFTE, Herman, 1998. A plasma membrane-bound putative endo-1,4-β-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in Arabidopsis. In : *EMBO Journal* [en ligne]. 1998. Vol. 17, n° 19, p. 5563-5576. DOI 10.1093/emboj/17.19.5563.

NIKLAS, Karl J., 1992. *Plant biomechanics : an engineering approach to plant form and function* [en ligne]. S.l. : University of Chicago Press. ISBN 0226586316. Disponible à l'adresse : <https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=l3bRJVMbNMcc&oi=fnd&pg=PR9&dq=Plant+Biomechanics:+An+Engineering+Approach+to+Plant+Form+and+Function&ots=IOD>

3xk4llI&sig=5NKIGerxG-tLOG7b4AvPAfFnOCs#v=onepage&q=Plant Biomechanics%3A An Engineering Approach to Plant Form and Function&f=false.

NISHIMURA, Marc T, STEIN, Mónica, HOU, Bi Huei, VOGEL, John P, EDWARDS, Herb et SOMERVILLE, Shauna C, 2003. Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. In : *Science* [en ligne]. 15 août 2003. Vol. 301, n° 5635, p. 969-972. DOI 10.1126/science.1086716.

NISHIYAMA, Yoshiharu, 2009. *Structure and properties of the cellulose microfibril* [en ligne]. 2009. S.l. : s.n. [Consulté le 10 août 2018]. ISBN 1435-0211. Disponible à l'adresse : <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10086-009-1029-1.pdf>.

NIXON, B. Tracy, MANSOURI, Katayoun, SINGH, Abhishek, DU, Juan, DAVIS, Jonathan K., LEE, Jung Goo, SLABAUGH, Erin, VANDAVASI, Venu Gopal, O'NEILL, Hugh, ROBERTS, Eric M., ROBERTS, Alison W., YINGLING, Yaroslava G. et HAIGLER, Candace H., 2016. Comparative Structural and Computational Analysis Supports Eighteen Cellulose Synthases in the Plant Cellulose Synthesis Complex. In : *Scientific Reports* [en ligne]. 2016. Vol. 6, n° March, p. 1-14. DOI 10.1038/srep28696.

NOTHNAGEL, E A, MCNEIL, M, ALBERSHEIM, P et DELL, A, 1983. Host-Pathogen Interactions : XXII. A Galacturonic Acid Oligosaccharide from Plant Cell Walls Elicits Phytoalexins. In : *Plant physiology* [en ligne]. 1 avril 1983. Vol. 71, n° 4, p. 916-926. DOI 10.1104/pp.71.4.916.

NUHSE, T S, STENSBALLE, A, JENSEN, O N et PECK, S C, 2004. Phosphoproteomics of the Arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database. In : *Plant Cell* [en ligne]. 2004. Vol. 16, n° 9, p. 2394-2405.

O'KEEFFE, M.G., KLEVORN, T.B., CHIDA, T. et SHIDA, T., 1991. Flupoxam: a new pre- and post-emergence herbicide for broad-leaved weed control in winter cereals. In : *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference, Weeds (United Kingdom)* [en ligne]. S.l. : British Crop Protection Council. 1991. p. 1313. [Consulté le 7 septembre 2018]. Disponible à l'adresse : <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9121219>.

O'NEILL, M A, EBERHARD, S, ALBERSHEIM, P et DARVILL, A G, 2001. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. In : *Science* [en ligne]. 2001. Vol. 294, n° 5543, p. 846-849. DOI 10.1126/science.1062319294/5543/846 [pii].

OROLOGAS, Nicolas, DELIVOPOULOS, Stylianos G., DIMOPOULOU, Areti et TSEKOS, Ioannes, 2005. Effects of 2,6-dichlorobenzonitrile on plasma membrane cellulose synthesizing complexes and cellulose localization in cells of the red alga *Erythrocladia subintegra*. In : *Phycologia* [en ligne]. 2005. Vol. 44, n° 5, p. 465-476. DOI 10.2216/0031-8884(2005)44[465:EODOPM]2.0.CO;2.

OSORIO, Sonia, CASTILLEJO, Cristina, QUESADA, Miguel A., MEDINA-ESCOBAR, Nieves, BROWNSEY, Geoff J., SUAUA, Rafael, HEREDIA, Antonio, BOTELLA, Miguel A. et VALPUESTA, Victoriano, 2008. Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). In : *Plant Journal* [en ligne]. 15 décembre 2008. Vol. 54, n° 1, p. 43-55. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03398.x.

PACHECO-VILLALOBOS, D, DIAZ-MORENO, S M, VAN DER SCHUREN, A, TAMAKI, T, KANG, Y H, GUJAS, B, NOVAK, O, JASPERT, N, LI, Z, WOLF, S, OECKING, C, LJUNG, K, BULONE, V et HARDTKE, C S, 2016. The Effects of High Steady State Auxin Levels on Root Cell Elongation in *Brachypodium*. In : *Plant Cell* [en ligne]. 2016. Vol. 28, n° 5, p. 1009-1024. DOI 10.1105/tpc.15.01057.

PAGANT, S, BICHET, A, SUGIMOTO, K, LEROUXEL, O, DESPREZ, T, MCCANN, M, LEROUGE, P, VERNHETTES, S et HÖFTE, H, 2002. Kobito1 encodes a novel plasma membrane protein necessary for normal synthesis of cellulose during cell expansion in arabidopsis. In : *Plant Cell*. 2002. Vol. 14, n° 9. DOI 10.1105/tpc.002873.

PALIN, R et GEITMANN, A, 2012. The role of pectin in plant morphogenesis. In : *Biosystems* [en ligne]. 2012/05/05. 2012. DOI S0303-2647(12)00060-3 [pii]10.1016/j.biosystems.2012.04.006.

PAREDEZ, A R, SOMERVILLE, C R et EHRHARDT, D W, 2006. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. In : *Science* [en ligne]. 2006. Vol. 312, n° 5779, p. 1491-1495.

PAREDEZ, Alexander R, PERSSON, Staffan, EHRHARDT, David W et SOMERVILLE, Chris R, 2008. Genetic Evidence That Cellulose Synthase Activity Influences Microtubule Cortical Array Organization. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2008. Vol. 147, n° 4, p. 1723-1734. DOI 10.1104/pp.108.120196.

PARK, Yong Bum et COSGROVE, Daniel J., 2015. *Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall* [en ligne]. 1 février 2015. S.l. : Oxford University Press. [Consulté le 22 septembre 2018]. ISBN 1471-9053 (Electronic)r0032-0781 (Linking). Disponible à l'adresse : <https://academic.oup.com/pcp/article-lookup/doi/10.1093/pcp/pcu204>.

PARRE, Elodie et GEITMANN, Anja, 2005. Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. In : *Planta* [en ligne]. 21 février 2005. Vol. 220, n° 4, p. 582-592. DOI 10.1007/s00425-004-1368-5.

PAULY, Markus, GILLE, Sascha, LIU, Lifeng, MANSOORI, Nasim, DE SOUZA, Amancio, SCHULTINK, Alex et XIONG, Guangyan, 2013. *Hemicellulose biosynthesis* [en ligne]. 26 octobre 2013. S.l. : Springer Berlin Heidelberg. [Consulté le 28 mai 2018]. ISBN 1432-2048 (Electronic) 0032-0935 (Linking). Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/s00425-013-1921-1>.

PAULY, Markus et KEEGSTRA, Kenneth, 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. In : *The Plant Journal* [en ligne]. mai 2008. Vol. 54, n° 4, p. 559-568. DOI 10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x.

PAULY, Markus et KEEGSTRA, Kenneth, 2016. Biosynthesis of the Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Xyloglucan. In : *Annual Review of Plant Biology* [en ligne]. 2016. Vol. 67, n° 1, p. 235-259. DOI 10.1146/annurev-arplant-043015-112222.

PEAR, Julie R, KAWAGOET, Yasushi, SCHRECKENGOST, William E, DELMERT, Deborah P et STALKER, David M, 1996. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. In : *Plant Biology* [en ligne]. 1996. Vol. 93, p. 12637-12642.

PEARCE, G, YAMAGUCHI, Y, MUNSKE, G et RYAN, C A, 2010. Structure-activity studies of RALF, Rapid Alkalinization Factor, reveal an essential--YISY--motif. In : *Peptides* [en ligne]. 2010. Vol. 31, n° 11, p. 1973-1977. DOI 10.1016/j.peptides.2010.08.012.

PEAUCELLE, A, LOUVET, R, JOHANSEN, J N, HÖFTE, H, LAUFS, P, PELLOUX, J et MOUILLE, G, 2008. Arabidopsis Phyllotaxis Is Controlled by the Methyl-Esterification Status of Cell-Wall Pectins. In : *Current Biology*. 2008. Vol. 18, n° 24. DOI 10.1016/j.cub.2008.10.065.

PEAUCELLE, Alexis, BRAYBROOK, Siobhan A., LE GUILLOU, Laurent, BRON, Emeric, KUHLEMEIER, Cris et HÖFTE, Herman, 2011. Pectin-Induced Changes in Cell Wall Mechanics Underlie Organ Initiation in Arabidopsis. In : *Current Biology* [en ligne]. 25 octobre 2011. Vol. 21, n° 20, p. 1720-1726. DOI 10.1016/J.CUB.2011.08.057.

PEAUCELLE, Alexis, WIGHTMAN, Raymond et HÖFTE, Herman, 2015. The Control of Growth Symmetry Breaking in the Arabidopsis Hypocotyl. In : *Current Biology*. 2015. Vol. 25, n° 13, p. 1746-1752. DOI 10.1016/j.cub.2015.05.022.

PELLETIER, Sandra, VAN ORDEN, Jürgen, WOLF, Sebastian, VISSENBERG, Kris, DELACOURT, Julien, NDONG, Yves Assoumou, PELLOUX, Jérôme, BISCHOFF, Volker, URBAIN, Aurélie, MOUILLE, Grégory, LEMONNIER, Gaëtan, RENO, Jean Pierre et HÖFTE, Herman, 2010. A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown Arabidopsis hypocotyls. In : *New Phytologist*. 2010. Vol. 188, n° 3, p. 726-739. DOI 10.1111/j.1469-8137.2010.03409.x.

PENG, L, HOCART, C H, REDMOND, J W et WILLIAMSON, R E, 2000. Fractionation of carbohydrates in Arabidopsis root cell walls shows that three radial swelling loci are specifically involved in cellulose production. In : *Planta*. 2000. Vol. 211, p. 406-414.

PENG, L, XIANG, F, ROBERTS, Eric M., KAWAGOE, Y, GREVE, L C, KREUZ, K et DELMER, D P, 2001. The experimental herbicide CGA 325'615 inhibits synthesis of crystalline cellulose and causes accumulation of non-crystalline beta-1,4-glucan associated with Cesa protein. In : *Plant physiology*. 2001. Vol. 126, n° 3, p. 981-992. DOI 10.1104/pp.126.3.981.

PENG, Liangcai, KAWAGOE, Yasushi, HOGAN, Pat et DELMER, Deborah, 2002. Sitosterol- β -glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. In : *Science* [en ligne]. 4 janvier 2002. Vol. 295, n° 5552, p. 147-150. DOI 10.1126/science.1064281.

PÉREZ, Serge et MAZEAU, Karim, 2004. Conformations, Structures, and Morphologies of Celluloses. In : DUMITRIU, Severian (éd.), *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility* [en ligne]. 2. Boca Raton : CRC Press. p. 41-68. [Consulté le 10 août 2018]. ISBN 978-0-8247-5480-8. Disponible à l'adresse : <https://www.taylorfrancis.com/books/9781420030822>.

PERSSON, S, WEI, H, MILNE, J, PAGE, G P et SOMERVILLE, C R, 2005. Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* [en ligne]. 2005/06/04. 2005. Vol. 102, n° 24, p. 8633-8638. DOI 0503392102 [pii] 10.1073/pnas.0503392102.

PERSSON, Staffan, PAREDEZ, Alexander, CARROLL, Andrew, PALSDOTTIR, H., DOBLIN, Monika, POINDEXTER, Patricia, KHITROV, Natalie, AUER, Manfred et

SOMERVILLE, Chris R, 2007. Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in Arabidopsis. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2007. Vol. 104, n° 39, p. 15566-15571. DOI 10.1073/pnas.0706592104.

PHILIPPE, Florian, PELLOUX, Jérôme et RAYON, Catherine, 2017. Plant pectin acetyltransferase structure and function: New insights from bioinformatic analysis. In : *BMC Genomics* [en ligne]. 2017. Vol. 18, n° 1. DOI 10.1186/s12864-017-3833-0.

PHYO, Pyae, WANG, Tuo, XIAO, Chaowen, ANDERSON, Charles Thomas et HONG, Mei, 2017. Effects of Pectin Molecular-Weight Changes on the Structure, Dynamics, and Polysaccharide Interactions of Primary Cell Walls of Arabidopsis thaliana: Insights from Solid-State NMR. In : *Biomacromolecules* [en ligne]. 11 septembre 2017. Vol. 18, n° 9, p. acs.biomac.7b00888. DOI 10.1021/acs.biomac.7b00888.

PLOMION, Christophe, LEPROVOST, Grégoire et STOKES, Alexia, 2001. Wood Formation in Trees. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2001. Vol. 127, n° 4, p. 1513-1523. DOI 10.1104/pp.010816.

POPPER, Zoë A, MICHEL, Gurvan, HERVÉ, Cécile, DOMOZYCH, David S, WILLATS, William G T, TUOHY, Maria G, KLOAREG, Bernard et STENGEL, Dagmar B, 2011. Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants. In : *Annu. Rev. Plant Biol* [en ligne]. 2011. Vol. 62, p. 567-90. DOI 10.1146/annurev-arplant-042110-103809.

QIN, Ling, KUDLA, Urszula, ROZE, Erwin H. A., GOVERSE, Aska, POPEIJUST, Herman, NIEUWLAND, Jeroen, OVERMARS, Hein, JONES, John T., SCHOTS, Arjen, SMANT, Geert, BAKKER, Jaap et HELDER, Johannes, 2004. A nematode expansin acting on plants. In : *Nature* [en ligne]. 1 janvier 2004. Vol. 427, n° 6969, p. 30. DOI 10.1038/427030a.

QU, Shaofeng, ZHANG, Xi, SONG, Yutong, LIN, Jinxing et SHAN, Xiaoyi, 2017. *THESEUS1* positively modulates plant defense responses against *Botrytis cinerea* through *GUANINE EXCHANGE FACTOR4* signaling [en ligne]. 1 novembre 2017. S.l. : Wiley/Blackwell (10.1111). [Consulté le 28 août 2018]. Disponible à l'adresse : <http://doi.wiley.com/10.1111/jipb.12565>.

RAGGI, S, FERRARINI, A, DELLEDONNE, M, DUNAND, C, RANOCHA, P, DE LORENZO, G, CERVONE, F et FERRARI, S, 2015. The Arabidopsis thaliana Class III Peroxidase AtPRX71 Negatively Regulates Growth under Physiological Conditions and in Response to Cell Wall Damage. In : *Plant Physiol* [en ligne]. 2015. DOI 10.1104/pp.15.01464.

RAJANGAM, Alex S, KUMAR, Manoj, ASPEBORG, Henrik, GUERRIERO, Gea, ARVESTAD, Lars, PANSRI, Podjamas, BROWN, C. J.-L., HOBBER, Sophia, BLOMQUIST, Kristina, DIVNE, Christina, EZCURRA, Ines, MELLEROWICZ, Ewa, SUNDBERG, B., BULONE, Vincent et TEERI, Tuula T, 2008. MAP20, a Microtubule-Associated Protein in the Secondary Cell Walls of Hybrid Aspen, Is a Target of the Cellulose Synthesis Inhibitor 2,6-Dichlorobenzonitrile. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2008. Vol. 148, n° 3, p. 1283-1294. DOI 10.1104/pp.108.121913.

RALET, Marie Christine, DRONNET, Vincent, BUCHHOLT, Hans Christian et THIBAUT, Jean François, 2001. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: Characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. In :

Carbohydrate Research [en ligne]. 2001. Vol. 336, n° 2, p. 117-125. DOI 10.1016/S0008-6215(01)00248-8.

RAMÍREZ, Vicente, XIONG, Guangyan, MASHIGUCHI, Kiyoshi, YAMAGUCHI, Shinjiro et PAULY, Markus, 2018. Growth- and stress-related defects associated with wall hypoacetylation are strigolactone-dependent. In : *Plant Direct* [en ligne]. 1 juin 2018. Vol. 2, n° 6, p. e00062. DOI 10.1002/pld3.62.

RAYLE, D L et CLELAND, R E, 1992. The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 1992/08/01. 1992. Vol. 99, n° 4, p. 1271-1274.

RAYLE, David L et CLELAND, Robert, 1970. Enhancement of wall loosening and elongation by Acid solutions. In : *Plant physiology* [en ligne]. 1970. Vol. 46, n° 2, p. 250-253. DOI 10.1104/pp.46.2.250.

REFRÉGIER, Guislaine, PELLETIER, Sandra, JAILLARD, Danielle et HÖFTE, Herman, 2004. Interaction between wall deposition and cell elongation in dark-grown hypocotyl cells in Arabidopsis. In : *Plant physiology*. 2004. Vol. 135, n° 2, p. 959-968. DOI 10.1104/pp.104.038711.

REYNOLDS, Gregory D, WANG, Chao, PAN, Jianwei et BEDNAREK, Sebastian, 2017. Inroads into Internalization: Five Years of Endocytic Exploration. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2017. Vol. 6, p. pp.01117.2017. DOI 10.1104/pp.17.01117.

RICHTER, G L, MONSHAUSEN, G B, KROL, A et GILROY, S, 2009. Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2009/10/02. 2009. Vol. 151, n° 4, p. 1855-1866. DOI 10.1104/pp.109.142448.

RIDLEY, B L, O'NEILL, M A et MOHNEN, D, 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. In : *Phytochemistry*. 2001. Vol. 57, n° 6, p. 929--67.

RINGLI, C, KELLER, B et RYSER, U, 2001. Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. In : *Cellular and molecular life sciences : CMLS* [en ligne]. 2001. Vol. 58, n° 10, p. 1430-41. DOI 10.1007/PL00000786.

RIVAS-SAN VICENTE, M. et PLASENCIA, J., 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. In : *Journal of Experimental Botany* [en ligne]. 1 juin 2011. Vol. 62, n° 10, p. 3321-3338. DOI 10.1093/jxb/err031.

ROBERT, Stéphanie, BICHET, Adeline, GRANDJEAN, Olivier, KIERZKOWSKI, Daniel, SATIAT-JEUNEMAÎTRE, Béatrice, PELLETIER, Sandra, HAUSER, Marie-Theres, HÖFTE, Herman et VERNHETTES, Samantha, 2005. An Arabidopsis Endo-1,4-B-D-Glucanase Involved in Cellulose Synthesis Undergoes Regulated Intracellular Cycling. In : *THE PLANT CELL* [en ligne]. décembre 2005. Vol. 17, n° 12, p. 3378-3389. DOI 10.1105/tpc.105.036228.

ROBERT, Stéphanie, MOUILLE, Grégory et HÖFTE, Herman, 2004. The mechanism and regulation of cellulose synthesis in primary walls: lessons from cellulose-deficient Arabidopsis mutants. In : *Cellulose* [en ligne]. 2004. Vol. 11, n° 3/4, p. 351-364. DOI 10.1023/B:CELL.0000046415.45774.80.

RÖMLING, Ute, 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria. In :

Research in Microbiology [en ligne]. 2002. Vol. 153, p. 205-212.

ROTMAN, Nicolas, ROZIER, Frédérique, BOAVIDA, Leonor, DUMAS, Christian, BERGER, Frédéric et FAURE, Jean Emmanuel, 2003. Female control of male gamete delivery during fertilization in *Arabidopsis thaliana*. In : *Current Biology* [en ligne]. 4 mars 2003. Vol. 13, n° 5, p. 432-436. DOI 10.1016/S0960-9822(03)00093-9.

ROUDIER, F., FERNANDEZ, Anita G., FUJITA, Miki, HIMMELSPACH, Regina, BORNER, Georg H.H., SCHINDELMAN, Gary, SONG, Shuang, BASKIN, Tobias I., DUPREE, Paul, WASTENEYS, Geoffrey O. et BENFEY, Philip N., 2005. COBRA, an *Arabidopsis* Extracellular Glycosyl-Phosphatidyl Inositol-Anchored Protein, Specifically Controls Highly Anisotropic Expansion through Its Involvement in Cellulose Microfibril Orientation. In : *THE PLANT CELL ONLINE* [en ligne]. 2005. Vol. 17, n° 6, p. 1749-1763. DOI 10.1105/tpc.105.031732.

RUDOLPH, Ulrike et SCHNEPF, E., 1988. Investigations of the turnover of the putative Cellulose-synthesizing particle « rosettes » within the plasma membrane of *Funaria hygrometrica* protonema cells - I. Effects of monensin and cytochalasin B. In : *Protoplasma* [en ligne]. juin 1988. Vol. 143, n° 1, p. 63-73. DOI 10.1007/BF01282960.

SABBA, Robert P. et VAUGHN, Kevin C., 1999. Herbicides that inhibit cellulose biosynthesis. In : *Weed Science* [en ligne]. 1999. Vol. 47, n° 6, p. 757-763. DOI 10.1017/s004317450009144x.

SAFFER, Adam M., 2018. Expanding roles for pectins in plant development. In : *Journal of Integrative Plant Biology* [en ligne]. 4 juillet 2018. [Consulté le 7 août 2018]. Disponible à l'adresse : <http://doi.wiley.com/10.1111/jipb.12662>.

SAMAJ, Jozef, 2004. Endocytosis, Actin Cytoskeleton, and Signaling. In : *Plant Physiology* [en ligne]. juillet 2004. Vol. 135, n° 3, p. 1150-1161. DOI 10.1104/pp.104.040683.

SAMPATHKUMAR, A, GUTIERREZ, R, MCFARLANE, H, BRINGMANN, M, LINDEBOOM, J, EMONS, A M, SAMUELS, L, KETELAAR, T, EHRHARDT, D et PERSSON, S, 2013. Patterning and life-time of plasma membrane localized cellulose synthase is dependent on actin organization in *Arabidopsis* interphase cells. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2013/04/23. 2013. DOI 10.1104/pp.113.215277.

SANCHEZ-RODRIGUEZ, C., BAUER, S., HEMATY, K., SAXE, F., IBANEZ, A. B., VODERMAIER, V., KONLECHNER, C., SAMPATHKUMAR, A., RUGGEBERG, M., AICHINGER, E., NEUMETZLER, L., BURGERT, I., SOMERVILLE, C., HAUSER, M.-T. et PERSSON, S., 2012. CHITINASE-LIKE1/POM-POM1 and Its Homolog CTL2 Are Glucan-Interacting Proteins Important for Cellulose Biosynthesis in *Arabidopsis*. In : *the Plant Cell Online* [en ligne]. 2012. Vol. 24, n° 2, p. 589-607. DOI 10.1105/tpc.111.094672.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Clara, KETELAAR, KassaDee, SCHNEIDER, Rene, VILLALOBOS, Jose A, SOMERVILLE, Chris R, PERSSON, Staffan et WALLACE, Ian S, 2017. BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 negatively regulates cellulose synthesis in *Arabidopsis* by phosphorylating cellulose synthase 1. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. DOI 10.1073/pnas.1615005114.

SANGWAN, Veena, FOULDS, Inge, SINGH, Jas et DHINDSA, Rajinder S, 2001. Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in

membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. In : *Plant Journal* [en ligne]. juillet 2001. Vol. 27, n° 1, p. 1-12. DOI 10.1046/j.1365-313X.2001.01052.x.

SANTIAGO, J, HENZLER, C et HOTHORN, M, 2013. Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. In : *Science* [en ligne]. 2013. Vol. 341, n° 6148, p. 889-892. DOI 10.1126/science.1242468.

SATO, Shigeru, KATO, Tomohiko, KAKEGAWA, Koichi, ISHII, Tadashi, LIU, Yao-Guang, AWANO, Tatsuya, TAKABE, Keiji, NISHIYAMA, Yoshiharu, KUGA, Shigenori, SATO, Shusei, NAKAMURA, Yasukazu et SHIBATA, Daisuke, 2001. Role of the Putative Membrane-Bound Endo-1,4-B-Glucanase KORRIGAN in Cell Elongation and Cellulose Synthesis in *Arabidopsis thaliana*. In : *Plant Cell Physiol* [en ligne]. 2001. Vol. 42, n° 3, p. 251-263.

SAUER, Michael, ROBERT, Stéphanie et KLEINE-VEHN, Jürgen, 2013. Auxin: Simply complicated. In : *Journal of Experimental Botany* [en ligne]. 2013. Vol. 64, n° 9, p. 2565-2577. DOI 10.1093/jxb/ert139.

SAVATIN, D V, GRAMEGNA, G, MODESTI, V et CERVONE, F, 2014. Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. In : *Front Plant Sci* [en ligne]. 2014. Vol. 5, p. 470. DOI 10.3389/fpls.2014.00470.

SCHALLUS, Thomas, JAECKH, Christine, FEHÉR, Krisztina, PALMA, Angelina S, LIU, Yan, SIMPSON, Jeremy C, MACKEEN, Mukram, STIER, Gunter, GIBSON, Toby J, FEIZI, Ten, PIELER, Tomas et CLAUDIA, Muhle-Goll, 2008. Malectin: a novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein N-glycosylation. In : *Mol. Biol. Cell* [en ligne]. août 2008. Vol. 19, n° 8, p. 3404-3414. DOI 10.1091/mbc.E08-04-0354.

SCHEIBLE, W.-R., ESHED, R., RICHMOND, T., DELMER, D. et SOMERVILLE, C., 2001. Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis* *Ixr1* mutants. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2001. Vol. 98, n° 18, p. 10079-10084. DOI 10.1073/pnas.191361598.

SCHEIBLE, Wolf-Rüdiger, FRY, Barbara, KOCHEVENKO, Andrej, SCHINDELASCH, Dana, ZIMMERLI, Laurent, SOMERVILLE, Shauna, LORIA, Rosemary et SOMERVILLE, Chris R, 2003. An *Arabidopsis* Mutant Resistant to Thaxtomin A , a Cellulose Synthesis Inhibitor from *Streptomyces* Species. In : *The Plant Cell*. 2003. Vol. 15, n° August, p. 1781-1794. DOI 10.1105/tpc.013342.

SCHELLER, H V et ULVSKOV, P, 2010. Hemicelluloses. In : *Annu Rev Plant Biol* [en ligne]. 2010/03/03. 2010. Vol. 61, p. 263-289. DOI 10.1146/annurev-arplant-042809-112315.

SCHINDELMAN, Gary, MORIKAMI, Atsushi, JUNG, Jee, BASKIN, Tobias I, CARPITA, Nicholas C, DERBYSHIRE, Paul, MCCANN, Maureen C et BENFEY, Philip N, 2001. COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in *arabidopsis*. In : *Genes and Development* [en ligne]. 1 mai 2001. Vol. 15, n° 9, p. 1115-1127. DOI 10.1101/gad.879101.

SCHNEIDER, R, HANAK, T, PERSSON, S et VOIGT, C A, 2016. Cellulose and callose synthesis and organization in focus, what's new? In : *Curr Opin Plant Biol* [en ligne]. 2016. Vol. 34, p. 9-16. DOI 10.1016/j.pbi.2016.07.007.

SCHNEIDER, Rene, TANG, Lu, LAMPUGNANI, Edwin R, BARKWILL, Sarah, LATHE, Rahul, ZHANG, Yi, MCFARLANE, Heather E, PESQUET, Edouard, NIITTYLA, Totte, MANSFIELD, Shawn D, ZHOU, Yihua et PERSSON, Staffan, 2017. Two Complementary Mechanisms Underpin Cell Wall Patterning during Xylem Vessel Development. In : *The Plant cell* [en ligne]. 25 octobre 2017. Vol. 29, n° 10, p. 2433-2449. DOI 10.1105/tpc.17.00309.

SCHRICK, Kathrin, DEBOLT, Seth et BULONE, Vincent, 2012. Deciphering the molecular functions of sterols in cellulose biosynthesis. In : *Frontiers in plant science* [en ligne]. 2012. Vol. 3, p. 84. DOI 10.3389/fpls.2012.00084.

SCHUHEGGER, Regina, NAFISI, Majse, MANSOUROVA, Madina, PETERSEN, Larsen, OLSEN, Carl Erik, SVATOŠ, Aleš, HALKIER, Barbara Ann et GLAWISCHNIG, Erich, 2006. CYP71B15 (PAD3) Catalyzes the Final Step in Camalexin Biosynthesis 1. In : [en ligne]. 2006. DOI 10.1104/pp.106.082024.

SCHULZE-MUTH, Paul, IRMLER, Stefan, SCHRÖDER, Gudrun et SCHRÖDER, Joachim, 1996. Novel Type of Receptor-like Protein Kinase from a Higher Plant (*Catharanthus roseus*). In : *the journal of biolo* [en ligne]. 1996. Vol. 271, n° 43, p. 26684-26689.

SCHUSTER, Erich, CUCHEVAL, Aurelie, LUNDIN, Leif et WILLIAMS, Martin A K, 2011. Using SAXS to Reveal the Degree of Bundling in the Polysaccharide Junction Zones of Microrheologically Distinct Pectin Gels. In : [en ligne]. 2011. DOI 10.1021/bm200578d.

SEBASTIAN, Derek J., FLEMING, Margaret B, PATTERSON, Eric L, SEBASTIAN, James R et NISSEN, Scott J, 2017. Indaziflam: a new cellulose-biosynthesis-inhibiting herbicide provides long-term control of invasive winter annual grasses. In : *Pest Management Science* [en ligne]. 2017. Vol. 73, n° 10, p. 2149-2162. DOI 10.1002/ps.4594.

SEGONZAC, Cécile, MACHO, Alberto P, SANMARTÍN, Maite, NTOUKAKIS, Vardis, SÁNCHEZ-SERRANO, José Juan et ZIPFEL, Cyril, 2014. Negative control of BAK1 by protein phosphatase 2A during plant innate immunity. In : *The EMBO journal* [en ligne]. 2014. Vol. 33, n° 18, p. 1-11. DOI 10.15252/embj.201488698.

SELS, Jan, MATHYS, Janick, DE CONINCK, Barbara M.A., CAMMUE, Bruno P.A. et DE BOLLE, Miguel F.C., 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. In : *Plant Physiology and Biochemistry* [en ligne]. novembre 2008. Vol. 46, n° 11, p. 941-950. DOI 10.1016/j.plaphy.2008.06.011.

SÉNÉCHAL, Fabien, WATTIER, Christopher, RUSTÉRUCCI, Christine et PELLOUX, Jérôme, 2014. Homogalacturonan-modifying enzymes: Structure, expression, and roles in plants. In : *Journal of Experimental Botany*. 2014. Vol. 65, n° 18, p. 5125-5160. DOI 10.1093/jxb/eru272.

SETHAPHONG, Latsavongsakda, HAIGLER, Candace H, KUBICKI, James D, ZIMMER, Jochen, BONETTA, Dario, DEBOLT, S. et YINGLING, Yaroslava G, 2013. Tertiary model of a plant cellulose synthase. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2013. Vol. 110, n° 18, p. 7512-7517. DOI 10.1073/pnas.1301027110.

SHAH, Jyoti, 2003. The salicylic acid loop in plant defense. In : *Current Opinion in Plant Biology* [en ligne]. 1 août 2003. Vol. 6, n° 4, p. 365-371. DOI 10.1016/S1369-5266(03)00058-X.

SHARPLES, Kate R., HAWKES, Tim R., MITCHELL, Glynn, EDWARDS, Lucretia S., LANGFORD, Mike P., LANGTON, David W., ROGERS, Katherine M., TOWNSON, Jane K. et WANG, Youlin, 1998. A novel thiazolidinone herbicide is a potent inhibitor of glucose incorporation into cell wall material. In : *Pesticide Science* [en ligne]. 1 décembre 1998. Vol. 54, n° 4, p. 368-376. DOI 10.1002/(SICI)1096-9063(199812)54:4<368::AID-PS845>3.0.CO;2-6.

SHI, Xiao, HAN, Xiao et LU, Tie gang, 2016. Callose synthesis during reproductive development in monocotyledonous and dicotyledonous plants. In : *Plant Signaling and Behavior* [en ligne]. 2016. Vol. 11, n° 2. DOI 10.1080/15592324.2015.1062196.

SHIH, Han Wei, MILLER, Nathan D., DAI, Cheng, SPALDING, Edgar P. et MONSHAUSEN, Gabriele B., 2014. The receptor-like kinase FERONIA is required for mechanical signal transduction in Arabidopsis seedlings. In : *Current Biology* [en ligne]. 18 août 2014. Vol. 24, n° 16, p. 1887-1892. DOI 10.1016/j.cub.2014.06.064.

SHIU, S.-H. et BLEECKER, A. B., 2001. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2001. Vol. 98, n° 19, p. 10763-10768. DOI 10.1073/pnas.181141598.

SHOWALTER, Allan M et BASU, Debarati, 2016. Glycosylation of arabinogalactan-proteins essential for development in Arabidopsis. In : *Communicative and Integrative Biology* [en ligne]. 2016. Vol. 9, n° 3. DOI 10.1080/19420889.2016.1177687.

SILLO, Fabiano, FANGEL, Jonatan U., HENRISSAT, Bernard, FACCIO, Antonella, BONFANTE, Paola, MARTIN, Francis, WILLATS, William G.T. et BALESTRINI, Raffaella, 2016. Understanding plant cell-wall remodelling during the symbiotic interaction between *Tuber melanosporum* and *Corylus avellana* using a carbohydrate microarray. In : *Planta* [en ligne]. 12 août 2016. Vol. 244, n° 2, p. 347-359. DOI 10.1007/s00425-016-2507-5.

SINCLAIR, Scott A., LARUE, Camille, BONK, Laura, KHAN, Asif, CASTILLO-MICHEL, Hiram, STEIN, Ricardo J., GROLIMUND, Daniel, BEGEROW, Dominik, NEUMANN, Ulla, HAYDON, Michael J. et KRÄMER, Ute, 2017. Etiolated Seedling Development Requires Repression of Photomorphogenesis by a Small Cell-Wall-Derived Dark Signal. In : *Current Biology* [en ligne]. 20 novembre 2017. Vol. 27, n° 22, p. 3403-3418.e7. DOI 10.1016/J.CUB.2017.09.063.

SLABAUGH, Erin, DAVIS, Jonathan K., HAIGLER, Candace H., YINGLING, Yaroslava G. et ZIMMER, Jochen, 2014. Cellulose synthases: New insights from crystallography and modeling. In : *Trends in Plant Science*. 2014. Vol. 19, n° 2, p. 99-106. DOI 10.1016/j.tplants.2013.09.009.

SMAKOWSKA-LUZAN, Elwira, MOTT, G. Adam, PARYS, Katarzyna, STEGMANN, Martin, HOWTON, Timothy C, LAYEGHIFARD, Mehdi, NEUHOLD, Jana, LEHNER, Anita, KONG, Jixiang, GRÜNWARD, Karin, WEINBERGER, Natascha, SATBHAI, Santosh B., MAYER, Dominik, BUSCH, Wolfgang, MADALINSKI, Mathias, STOLT-BERGNER, Peggy, PROVART, Nicholas J., MUKHTAR, M. Shahid, ZIPFEL, Cyril, DESVEAUX, Darrell, GUTTMAN, David S. et BELKHADIR, Youssef, 2018. An extracellular network of Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinases. In : *Nature* [en ligne]. 10 janvier 2018. Vol. 553, n° 7688, p. 342-346. DOI 10.1038/nature25184.

SMANT, Geert, STOKKERMANS, J. P. W. G., YAN, Yitang, DE BOER, J. M., BAUM, Thomas J, WANG, Xiaohong, HUSSEY, Richard S, GOMMERS, Fred J, HENRISSAT, Bernard, DAVIS, Eric L, HELDER, Johannes, SCHOTS, Arjen et BAKKER, Jaap, 1998. Endogenous cellulases in animals: Isolation of -1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 1998. Vol. 95, n° 9, p. 4906-4911. DOI 10.1073/pnas.95.9.4906.

SMITH, A. M., KRUGER, N. J. et LUNN, J. E., 2012. Source of sugar nucleotides for starch and cellulose synthesis. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2012. Vol. 109, n° 14, p. E776-E776. DOI 10.1073/pnas.1200878109.

SOBRY, S, HAVELANGE, A et VAN CUTSEM, P, 2005. Immunocytochemistry of pectins in shoot apical meristems: consequences for intercellular adhesion. In : *Protoplasma* [en ligne]. 2005. Vol. 225, n° 1-2, p. 15-22. DOI 10.1007/s00709-005-0089-3.

SOMERVILLE, Chris, 2006. Cellulose Synthesis in Higher Plants. In : *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [en ligne]. 2006. Vol. 22, n° 1, p. 53-78. DOI 10.1146/annurev.cellbio.22.022206.160206.

SØRENSEN, Iben, DOMOZYCH, David et WILLATS, William G T, 2010. How have plant cell walls evolved? In : *Plant physiology* [en ligne]. 1 juin 2010. Vol. 153, n° 2, p. 366-72. DOI 10.1104/pp.110.154427.

SOUZA, Clarice de Azevedo, LI, Shundai, LIN, Andrew Z, BOUTROT, Freddy, GROSSMANN, Guido, ZIPFEL, Cyril et SOMERVILLE, Shauna C, 2017. Cellulose-Derived Oligomers Act as Damage-Associated Molecular Patterns and Trigger Defense-Like Responses. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2017. Vol. 173, n° 4, p. 2383-2398. DOI 10.1104/pp.16.01680.

SPIRO, Mark D, BOWERS, Jonathan F et COSGROVE, Daniel J, 2002. A comparison of oligogalacturonide- and auxin-induced extracellular alkalization and growth responses in roots of intact cucumber seedlings. In : *Plant physiology* [en ligne]. 2002. Vol. 130, n° 2, p. 895-903. DOI 10.1104/pp.006064.

SRIVASTAVA, Renu, LIU, Jian Xiang, GUO, Hongqing, YIN, Yanhai et HOWELL, Stephen H., 2009. Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis. In : *Plant Journal* [en ligne]. 1 septembre 2009. Vol. 59, n° 6, p. 930-939. DOI 10.1111/j.1365-313X.2009.03926.x.

STEGMANN, Martin, MONAGHAN, Jacqueline, SMAKOWSKA-LUZAN, Elwira, ROVENICH, Hanna, LEHNER, Anita, HOLTON, Nicholas, BELKHADIR, Youssef et ZIPFEL, Cyril, 2017. The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. In : *Science* [en ligne]. 20 janvier 2017. Vol. 355, n° 6322, p. 287-289. DOI 10.1126/science.aal2541.

STEINWAND, Blaire J., XU, Shouling, POLKO, Joanna K., DOCTOR, Stephanie M., WESTAFER, Mike et KIEBER, Joseph J., 2014. Alterations in Auxin Homeostasis Suppress Defects in Cell Wall Function. In : DE SMET, Ive (éd.), *PLoS ONE* [en ligne]. 23 mai 2014. Vol. 9, n° 5, p. e98193. DOI 10.1371/journal.pone.0098193.

STICKLEN, M B, 2008. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. In : *Nat Rev Genet* [en ligne]. 2008/05/20. 2008. Vol. 9, n° 6,

p. 433-443. DOI nrg2336 [pii] 10.1038/nrg2336.

STOLLER, André, HAAKE, Manfred et ZONDLER, Helmut, 1996. Herbicidal 1,2,4,6-thiatriazines [en ligne]. 1996001814. 1996. Disponible à l'adresse : <https://patentscope.wipo.int/search/fr/detail.jsf?docId=WO1996001814&recNum=10&office=&queryString=ALLNUM%3A%289601814%29&prevFilter=&sortOption=Date+de+pub.+antichronologique&maxRec=10>.

STORK, J, HARRIS, D, GRIFFITHS, J, WILLIAMS, B, BEISSON, F, LI-BEISSON, Y, MENDU, V, HAUGHN, G et DEBOLT, S, 2010. CELLULOSE SYNTHASE9 serves a non-redundant role in secondary cell wall synthesis in Arabidopsis epidermal testa cells. In : *Plant Physiol* [en ligne]. 2010/03/26. 2010. DOI pp.110.154062 [pii]10.1104/pp.110.154062.

SUGIMOTO, K, HIMMELSPACH, R, WILLIAMSON, R E et WASTENEYS, G O, 2003. Mutation or drug-dependent microtubule disruption causes radial swelling without altering parallel cellulose microfibril deposition in Arabidopsis root cells. In : *Plant Cell* [en ligne]. 2003. Vol. 15, n° 6, p. 1414-1429.

SUN, Y, HAN, Z, TANG, J, HU, Z, CHAI, C, ZHOU, B et CHAI, J, 2013. Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. In : *Cell Res* [en ligne]. 2013. Vol. 23, n° 11, p. 1326-1329. DOI 10.1038/cr.2013.131.

SUN, Y, LI, L, MACHO, A P, HAN, Z, HU, Z, ZIPFEL, C, ZHOU, J M et CHAI, J, 2013. Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. In : *Science* [en ligne]. 2013/10/12. 2013. Vol. 342, n° 6158, p. 624-628. DOI 10.1126/science.1243825.

SZYJANOWICZ, Pio M. J., MCKINNON, Iain, TAYLOR, Neil G., GARDINER, John, JARVIS, Mike C. et TURNER, Simon R., 2004. The irregular xylem 2 mutant is an allele of korrgan that affects the secondary cell wall of Arabidopsis thaliana. In : *The Plant Journal* [en ligne]. mars 2004. Vol. 37, n° 5, p. 730-740. DOI 10.1111/j.1365-313X.2003.02000.x.

TABUCHI, Akira, LI, Lian Chao et COSGROVE, Daniel J., 2011. Matrix solubilization and cell wall weakening by β -expansin (group-1 allergen) from maize pollen. In : *Plant Journal*. 2011. Vol. 68, n° 3, p. 546-559. DOI 10.1111/j.1365-313X.2011.04705.x.

TAKAHASHI, Koji, HAYASHI, K.-i. et KINOSHITA, Toshinori, 2012. Auxin Activates the Plasma Membrane H⁺-ATPase by Phosphorylation during Hypocotyl Elongation in Arabidopsis. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2012. Vol. 159, n° 2, p. 632-641. DOI 10.1104/pp.112.196428.

TAN, Li, TEES, David, QIAN, Jin, KAREEM, Sulaiman et KIELISZEWSKI, Marcia J., 2018. Intermolecular interactions between glycomodules of plant cell wall arabinogalactan-proteins and extensins. In : *The Cell Surface* [en ligne]. 1 mars 2018. Vol. 1, p. 25-33. DOI 10.1016/j.tcs.2018.03.001.

TANG, J, HAN, Z, SUN, Y, ZHANG, H, GONG, X et CHAI, J, 2015. Structural basis for recognition of an endogenous peptide by the plant receptor kinase PEPR1. In : *Cell Res* [en ligne]. 2015. Vol. 25, n° 1, p. 110-120. DOI 10.1038/cr.2014.161.

TATENO, Mizuki, BRABHAM, Chad et DEBOLT, Seth, 2016. Cellulose biosynthesis inhibitors - A multifunctional toolbox. In : *Journal of Experimental Botany*. 2016. Vol. 67,

n° 2, p. 533-542. DOI 10.1093/jxb/erv489.

TAYLOR, N G, HOWELLS, R M, HUTTLY, A K, VICKERS, K et TURNER, S R, 2003. Interactions among three distinct Cesa proteins essential for cellulose synthesis. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* [en ligne]. 2003. Vol. 100, n° 3, p. 1450-1455. DOI 10.1073/pnas.03376281000337628100 [pii].

TAYLOR, N G, LAURIE, S et TURNER, S R, 2000. Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in Arabidopsis. In : *Plant Cell* [en ligne]. 2000. Vol. 12, n° 12, p. 2529--2540.

TAYLOR, Neil G, 2007. Identification of cellulose synthase AtCesA7 (IRX3) in vivo phosphorylation sites - A potential role in regulating protein degradation. In : *Plant Molecular Biology* [en ligne]. 2007. Vol. 64, n° 1-2, p. 161-171. DOI 10.1007/s11103-007-9142-2.

TENHAKEN, Raimund, 2014. Cell wall remodeling under abiotic stress. In : *Frontiers in plant science* [en ligne]. 2014. Vol. 5, p. 771. DOI 10.3389/fpls.2014.00771.

THIELE, K, WANNER, G, KINDZIERSKI, V, JURGENS, G, MAYER, U, PACHL, F et ASSAAD, F F, 2009. The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in Arabidopsis. In : *Plant J* [en ligne]. 2008/12/11. 2009. Vol. 58, n° 1, p. 13-26. DOI TPJ3760 [pii]10.1111/j.1365-313X.2008.03760.x.

TOR, M, LOTZE, M T et HOLTON, N, 2009. Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. In : *J Exp Bot* [en ligne]. 2009/07/25. 2009. Vol. 60, n° 13, p. 3645-3654. DOI erp233 [pii] 10.1093/jxb/erp233.

TORII, Keiko U, 2004. Leucine-Rich Repeat Receptor Kinases in Plants: Structure, Function, and Signal Transduction Pathways. In : *International Review of Cytology* [en ligne]. 1 janvier 2004. Vol. 234, p. 1-46. DOI 10.1016/S0074-7696(04)34001-5.

TRAN, L.-S. Phan, URAO, Takeshi, QIN, Feng, MARUYAMA, Kyonoshin, KAKIMOTO, Tatsuo, SHINOZAKI, Kazuo et YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko, 2007. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 18 décembre 2007. Vol. 104, n° 51, p. 20623-20628. DOI 10.1073/pnas.0706547105.

TRAN, M. L. et ROBERTS, A. W., 2016. Cellulose synthase gene expression profiling of *Physcomitrella patens*. In : MENDEL, R. (éd.), *Plant Biology* [en ligne]. mai 2016. Vol. 18, n° 3, p. 362-368. DOI 10.1111/plb.12416.

TROJAN, Anna et GABRYS, Halina, 1996. Chloroplast Distribution in Arabidopsis thaliana (L.) Depends on Light Conditions during Growth. In : *Plant physiology* [en ligne]. 1996. Vol. 111, n° 2, p. 419-425. DOI 10.1104/pp.111.2.419.

TRUJILLO, Martha E., BACIGALUPE, Rodrigo, PUJIC, Petar, IGARASHI, Yasuhiro, BENITO, Patricia, RIESCO, Raúl, MÉDIGUE, Claudine et NORMAND, Philippe, 2014. Genome features of the Endophytic Actinobacterium *Micromonospora lupini* strain lupac 08: On the process of adaptation to an Endophytic life style? e108522. In : *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, n° 9. DOI 10.1371/journal.pone.0108522.

TSANG, Dat L, EDMOND, Clare, HARRINGTON, Jennifer L et NUHSE, T. S., 2011. Cell Wall Integrity Controls Root Elongation via a General 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid-Dependent, Ethylene-Independent Pathway. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2011. Vol. 156, n° 2, p. 596-604. DOI 10.1104/pp.111.175372.

TURNER, Simon et KUMAR, Manoj, 2018. Cellulose synthase complex organization and cellulose microfibril structure. In : *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* [en ligne]. 13 février 2018. Vol. 376, n° 2112, p. 20170048. DOI 10.1098/rsta.2017.0048.

UDOMCHALOTHORN, Thanikarn, PLAIMAS, Kitiporn, COMAI, Luca, BUABOOCHA, Teerapong et CHADCHAWAN, Supachitra, 2014. Molecular Karyotyping and Exome Analysis of Salt-Tolerant Rice Mutant from Somaclonal Variation. In : *The Plant Genome* [en ligne]. 1 novembre 2014. Vol. 7, n° 3, p. 0. DOI 10.3835/plantgenome2014.04.0016.

UEDA, T., 2014. Cellulase in Cellulose Synthase: A Cat among the Pigeons? In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2014. Vol. 165, n° 4, p. 1397-1398. DOI 10.1104/pp.114.245753.

URAO, Takeshi, YAKUBOV, Bakhtiyor, SATOH, Rie, YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko, SEKI, Motoaki, HIRAYAMA, Takashi et SHINOZAKI, Kazuo, 1999. A Transmembrane Hybrid-Type Histidine Kinase in Arabidopsis Functions as an Osmosensor. In : *THE PLANT CELL ONLINE* [en ligne]. 1999. Vol. 11, n° 9, p. 1743-1754. DOI 10.1105/tpc.11.9.1743.

UYTTEWAAL, Magalie, BURIAN, Agata, ALIM, Karen, LANDREIN, Benoît, BOROWSKA-WYKRĘT, Dorota, DEDIEU, Annick, PEAUCELLE, Alexis, LUDYNIA, Michał, TRAAS, Jan, BOUDAUD, Arezki, KWIATKOWSKA, Dorota et HAMANT, Olivier, 2012. Mechanical Stress Acts via Katanin to Amplify Differences in Growth Rate between Adjacent Cells in Arabidopsis. In : *Cell* [en ligne]. 13 avril 2012. Vol. 149, n° 2, p. 439-451. DOI 10.1016/J.CELL.2012.02.048.

VAIN, Thomas, CROWELL, Elizabeth Faris, TIMPANO, Hélène, BIOT, Eric, DESPREZ, Thierry, MANSOORI, Nasim, TRINDADE, Luisa M, PAGANT, Silvère, ROBERT, Stéphanie, HOFTE, H., GONNEAU, Martine et VERNHETTES, Samantha, 2014. The Cellulase KORRIGAN Is Part of the Cellulose Synthase Complex. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. août 2014. Vol. 165, n° 4, p. 1521-1532. DOI 10.1104/pp.114.241216.

VALENTIN, R, CERCLIER, C, GENEIX, N, AGUIE-BEGHIN, V, GAILLARD, C, RALET, M C et CATHALA, B, 2010. Elaboration of extensin-pectin thin film model of primary plant cell wall. In : *Langmuir* [en ligne]. 2010/03/13. 2010. Vol. 26, n° 12, p. 9891-9898. DOI 10.1021/la100265d.

VAN DER DOES, Dieuwertje, BOUTROT, Freddy, ENGELSDORF, Timo, RHODES, Jack, MCKENNA, Joseph F., VERNHETTES, Samantha, KOEVOETS, Iko, TINTOR, Nico, VEERABAGU, Manikandan, MIEDES, Eva, SEGONZAC, Cécile, ROUX, Milena, BREDA, Alice S., HARDTKE, Christian S., MOLINA, Antonio, REP, Martijn, TESTERINK, Christa, MOUILLE, Grégory, HÖFTE, Herman, HAMANN, Thorsten et ZIPFEL, Cyril, 2017. The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase MIK2/LRR-KISS connects cell wall integrity sensing, root growth and response to abiotic and biotic stresses. In : *PLoS Genetics*. 2017. Vol. 13, n° 6, p. 1-27. DOI 10.1371/journal.pgen.1006832.

VAN ERP, Harrie et WALTON, Jonathan D, 2009. Regulation of the cellulose synthase-

like gene family by light in the maize mesocotyl. In : *Planta* [en ligne]. 2009. Vol. 229, n° 4, p. 885-897. DOI 10.1007/s00425-008-0881-3.

VANDEVASI, Venu Gopal, PUTNAM, Daniel K., ZHANG, Qiu, PETRIDIS, Loukas, HELLER, William T., NIXON, B. Tracy, HAIGLER, Candace H., KALLURI, Udaya, COATES, Leighton, LANGAN, Paul, SMITH, Jeremy C., MEILER, Jens et O'NEILL, Hugh, 2016. A Structural Study of CESA1 Catalytic Domain of Arabidopsis Cellulose Synthesis Complex: Evidence for CESA Trimers. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2016. Vol. 170, n° 1, p. 123-135. DOI 10.1104/pp.15.01356.

VAUGHN, K. C., HOFFMAN, J. C., HAHN, M. G. et STAEHELIN, L. A., 1996. The herbicide dichlobenil disrupts cell plate formation: Immunogold characterization. In : *Protoplasma* [en ligne]. septembre 1996. Vol. 194, n° 3-4, p. 117-132. DOI 10.1007/BF01882020.

VAUGHN, K C et TURLEY, R B, 2001. Ultrastructural effects of cellulose biosynthesis inhibitor herbicides on developing cotton fibers. In : *Protoplasma* [en ligne]. 2001. Vol. 216, n° 1-2, p. 80-93. DOI 10.1007/BF02680135.

VELASQUEZ, S M, RICARDI, M M, DOROSZ, J G, FERNANDEZ, P V, NADRA, A D, POLFACHIN, L, EGELUND, J, GILLE, S, HARHOLT, J, CIANCIA, M, VERLI, H, PAULY, M, BACIC, A, OLSEN, C E, ULVSKOV, P, PETERSEN, B L, SOMERVILLE, C, IUSEM, N D et ESTEVEZ, J M, 2011. O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. In : *Science* [en ligne]. 2011/06/18. 2011. Vol. 332, n° 6036, p. 1401-1403. DOI 10.1126/science.1206657.

VERBANČIČ, Jana, LUNN, John Edward, STITT, Mark et PERSSON, Staffan, 2018. *Carbon Supply and the Regulation of Cell Wall Synthesis* [en ligne]. 8 janvier 2018. S.l. : Cell Press. [Consulté le 16 avril 2018]. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674205217303039?via%3Dihub#fig1>.

VERHERTBRUGGEN, Yves, MARCUS, Susan E, HAEGER, Ash, ORDAZ-ORTIZ, José J et KNOX, J Paul, 2009. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. In : *Carbohydrate Research* [en ligne]. 2009. Vol. 344, n° 14, p. 1858-1862. DOI 10.1016/j.carres.2008.11.010.

VERICA, Joseph A, HE, Zheng-Hui, GARCIA, Virginie, PETIT, Johann, MAUCOURT, Michael, DEBORDE, Catherine, BERNILLON, Stéphane, GALL, Gwénaëlle Le, COLQUHOUN, Ian, DEFERNEZ, Marianne, GIRAUDEL, Jean-Luc, ROLIN, Dominique, ROTHAN, Christophe et LEMAIRE-CHAMLEY, Martine, 2002. The Cell Wall-Associated Kinase (WAK) and WAK-Like Kinase Gene Family. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2002. Vol. 129, n° 2, p. 455-459. DOI 10.1104/pp.011028.

VOGEL, J P, TUNA, M, BUDAK, H, HUO, N, GU, Y Q et STEINWAND, M A, 2009. Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of *Brachypodium distachyon*. In : *BMC Plant Biol* [en ligne]. 2009/07/15. 2009. Vol. 9, p. 88. DOI 10.1186/1471-2229-9-88 [pii] 10.1186/1471-2229-9-88.

VOGLER, H, DRAEGER, C, WEBER, A, FELEKIS, D, EICHENBERGER, C, ROUTIER-KIERZKOWSKA, A L, BOISSON-DERNIER, A, RINGLI, C, NELSON, B J, SMITH, R S et GROSSNIKLAUS, U, 2013. The pollen tube: a soft shell with a hard core. In : *Plant J* [en ligne]. 2013. Vol. 73, n° 4, p. 617-627. DOI 10.1111/tbj.12061.

VOXEUR, A et FRY, S C, 2014. Glycosylinositol phosphorylceramides from Rosa cell cultures are boron-bridged in the plasma membrane and form complexes with rhamnogalacturonan II. In : *Plant J* [en ligne]. 2014. Vol. 79, n° 1, p. 139-149. DOI 10.1111/tpj.12547.

VOXEUR, A et HÖFTE, H, 2016. Cell wall integrity signaling in plants: « To grow or not to grow that's the question ». In : *Glycobiology*. 2016. Vol. 26, n° 9.

VUKAŠINOVIĆ, Nemanja, ODA, Yoshihisa, PEJCHAR, Přemysl, SYNEK, Lukáš, PEČENKOVIČ, Tamara, RAWAT, Anamika, SEKEREŠ, Juraj, POTOCKÍ, Martin et ŽIŘSKÝ, Viktor, 2017. Microtubule-dependent targeting of the exocyst complex is necessary for xylem development in Arabidopsis. In : *New Phytologist* [en ligne]. 1 février 2017. Vol. 213, n° 3, p. 1052-1067. DOI 10.1111/nph.14267.

WANG, Chao, YAN, Xu, CHEN, Qian, JIANG, Nan, FU, Wei, MA, Bojun, LIU, Jianzhong, LI, Chuanyou, BEDNAREK, Sebastian Y et PAN, Jianwei, 2013. Clathrin Light Chains Regulate Clathrin-Mediated Trafficking, Auxin Signaling, and Development in Arabidopsis. In : *The Plant Cell* [en ligne]. 2013. Vol. 25, n° 2, p. 499-516. DOI 10.1105/tpc.112.108373.

WANG, Che, LI, Jiejie et YUAN, Ming, 2007. Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in Arabidopsis. In : *Plant and Cell Physiology* [en ligne]. 28 septembre 2007. Vol. 48, n° 11, p. 1534-1547. DOI 10.1093/pcp/pcm123.

WANG, Jian, HOWLES, Paul A, CORK, Ann H, BIRCH, Rosemary J et WILLIAMSON, Richard E, 2006. Chimeric Proteins Suggest That the Catalytic and/or C-Terminal Domains Give CesA1 and CesA3 Access to Their Specific Sites in the Cellulose Synthase of Primary Walls. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2006. Vol. 142, n° 2, p. 685-695. DOI 10.1104/pp.106.084004.

WANG, Qiannan, WANG, Shufen, GAN, Sufu, WANG, Xin, LIU, Jianwei et WANG, Xiaofeng, 2016. Role of Specific Phosphorylation Sites of Arabidopsis Brassinosteroid-Insensitive 1 Receptor Kinase in Plant Growth and Development. In : *Journal of Plant Growth Regulation* [en ligne]. 20 septembre 2016. Vol. 35, n° 3, p. 755-769. DOI 10.1007/s00344-016-9580-7.

WANG, T et HONG, M, 2015. Solid-state NMR investigations of cellulose structure and interactions with matrix polysaccharides in plant primary cell walls. In : *J Exp Bot* [en ligne]. 2015. DOI 10.1093/jxb/erv416.

WANG, T, PARK, Y B, CAPORINI, M A, ROSAY, M, ZHONG, L, COSGROVE, D J et HONG, M, 2013. Sensitivity-enhanced solid-state NMR detection of expansin's target in plant cell walls. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en ligne]. 2013/09/26. 2013. Vol. 110, n° 41, p. 16444-16449. DOI 10.1073/pnas.1316290110.

WANG, Ting, MCFARLANE, Heather E et PERSSON, Staffan, 2015. The impact of abiotic factors on cellulose synthesis. In : [en ligne]. 2015. DOI 10.1093/jxb/erv488.

WANG, X et CHORY, J, 2006. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. In : *Science* [en ligne]. 2006/07/22. 2006. Vol. 313, n° 5790, p. 1118-1122. DOI 10.1126/science.1127593 [pii]10.1126/science.1127593.

WANG, Xin, JING, Yanjun, ZHANG, Baocai, ZHOU, Yihua et LIN, Rongcheng, 2015. Glycosyltransferase-like protein ABI8/ELD1/KOB1 promotes Arabidopsis hypocotyl elongation through regulating cellulose biosynthesis. In : *Plant, Cell and Environment*. 2015. Vol. 38, n° 3, p. 411-422. DOI 10.1111/pce.12395.

WANG, Zhi Yong, NAKANO, Takeshi, GENDRON, Joshua, HE, Junxian, CHEN, Meng, VAFEADOS, Dionne, YANG, Yanli, FUJIOKA, Shozo, YOSHIDA, Shigeo, ASAMI, Tadao et CHORY, Joanne, 2002. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. In : *Developmental Cell* [en ligne]. 1 avril 2002. Vol. 2, n° 4, p. 505-513. DOI 10.1016/S1534-5807(02)00153-3.

WASTENEYS, G O, 2004. Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. In : *Curr Opin Plant Biol* [en ligne]. 2004. Vol. 7, n° 6, p. 651-660.

WASTERACK, C et HAUSE, B, 2013. *Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany* [en ligne]. juin 2013. S.l. : Oxford University Press. [Consulté le 23 septembre 2018]. ISBN 0305-7364 (Print)n0305-7364 (Linking). Disponible à l'adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558912>.

WATANABE, Y, MEENTS, M J, MCDONNELL, L M, BARKWILL, S, SAMPATHKUMAR, A, CARTWRIGHT, H N, DEMURA, T, EHRHARDT, D W, SAMUELS, A L et MANSFIELD, S D, 2015. Visualization of cellulose synthases in Arabidopsis secondary cell walls. In : *Science* [en ligne]. 2015. Vol. 350, n° 6257, p. 198-203. DOI 10.1126/science.aac7446.

WATANABE, Yoichiro, SCHNEIDER, Rene, BARKWILL, Sarah, GONZALES-VIGIL, Eliana, HILL, Joseph L, SAMUELS, A Lacey, PERSSON, Staffan et MANSFIELD, Shawn D, 2018. Cellulose synthase complexes display distinct dynamic behaviors during xylem transdifferentiation. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2018. Vol. 115, n° 27, p. E6366-E6374. DOI 10.1073/pnas.1802113115.

WEI, Chunfang et LINTILHAC, Philip M, 2007. Loss of Stability: A New Look at the Physics of Cell Wall Behavior during Plant Cell Growth. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2007. Vol. 145, n° 3, p. 763-772. DOI 10.1104/pp.107.101964.

WIGHTMAN, Raymond et TURNER, Simon R., 2008. The roles of the cytoskeleton during cellulose deposition at the secondary cell wall. In : *The Plant Journal* [en ligne]. juin 2008. Vol. 54, n° 5, p. 794-805. DOI 10.1111/j.1365-313X.2008.03444.x.

WILLATS, William G.T., ORFILA, Caroline, LIMBERG, Gerrit, BUCHHOLT, Hans Christian, VAN ALEBEEK, Gert Jan W.M., VORAGEN, Alphons G.J., MARCUS, Susan E., CHRISTENSEN, Tove M.I.E., MIKKELSEN, Jørn D., MURRAY, Brent S. et KNOX, J. Paul, 2001. Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. In : *Journal of Biological Chemistry*. 2001. Vol. 276, n° 22, p. 19404-19413. DOI 10.1074/jbc.M011242200.

WILSON, David B., 2004. Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes. In : *Chemical Record* [en ligne]. 1 janvier 2004. Vol. 4, n° 2, p. 72-82. DOI 10.1002/tcr.20002.

WINCH, Samantha et PRITCHARD, Jeremy, 1999. Acid-induced wall loosening is

confined to the accelerating region of the root growing zone. In : *Journal of Experimental Botany* [en ligne]. 1 septembre 1999. Vol. 50, n° 338, p. 1481-1487. DOI 10.1093/jxb/50.338.1481.

WOLF, S. et HOFTE, H., 2014. Growth Control: A Saga of Cell Walls, ROS, and Peptide Receptors. In : *The Plant Cell* [en ligne]. 2014. Vol. 26, n° 5, p. 1848-1856. DOI 10.1105/tpc.114.125518.

WOLF, S, MOUILLE, G et PELLOUX, J, 2009. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. In : *Mol Plant* [en ligne]. 2009/10/15. 2009. Vol. 2, n° 5, p. 851-860. DOI ssp066 [pii] 10.1093/mp/ssp066.

WOLF, S, MOUILLE, G, SORMANI, R, HEMATY, K, PEAUCELLE, A et HOFTE, H, 2012. *Control of cell wall integrity during plant growth*. 2012. Clermont-Ferrand : s.n.

WOLF, S, MRAVEC, J, GREINER, S, MOUILLE, G, HÖFTE, H, HOFTE, H et HÖFTE, H, 2012. Plant Cell Wall Homeostasis is Mediated by Brassinosteroid Feed-back Signalling. In : *Curr Biol* [en ligne]. 2012/08/14. 2012. Vol. 22, n° 18, p. 1732-1737. DOI S0960-9822(12)00861-5 [pii]10.1016/j.cub.2012.07.036.

WOLF, Sebastian, 2017. Plant cell wall signalling and receptor-like kinases. In : *Biochemical Journal* [en ligne]. 15 février 2017. Vol. 474, n° 4, p. 471-492. DOI 10.1042/BCJ20160238.

WOLF, Sebastian, HÉMATY, Kian et HÖFTE, Herman, 2012. Growth Control and Cell Wall Signaling in Plants. In : *Annual Review of Plant Biology* [en ligne]. 2012. Vol. 63, n° 1, p. 381-407. DOI 10.1146/annurev-arplant-042811-105449.

WOODLEY, Marcus, MULVIHILL, Adam, FUJITA, Miki et WASTENEYS, Geoffrey, 2018. Exploring Microtubule-Dependent Cellulose-Synthase-Complex Movement with High Precision Particle Tracking. In : *Plants* [en ligne]. 2018. Vol. 7, n° 3, p. 53. DOI 10.3390/plants7030053.

WORMIT, A, BUTT, S M, CHAIRAM, I, MCKENNA, J F, NUNES-NESE, A, KJAER, L, O'DONNELLY, K, FERNIE, A R, WOSCHOLSKI, R, BARTER, M C et HAMANN, T, 2012. Osmosensitive changes of carbohydrate metabolism in response to cellulose biosynthesis inhibition. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2012/03/17. 2012. Vol. 159, n° 1, p. 105-117. DOI 10.1104/pp.112.195198.

WU, Guang, WANG, Xiuling, LI, Xianbin, KAMIYA, Yuji, OTEGUI, Marisa S et CHORY, Joanne, 2011. Methylation of a phosphatase specifies dephosphorylation and degradation of activated brassinosteroid receptors. In : *Science Signaling* [en ligne]. 10 mai 2011. Vol. 4, n° 172, p. ra29. DOI 10.1126/scisignal.2001258.

WU, Xu Na, SANCHEZ RODRIGUEZ, Clara, PERTL-OBERMEYER, Heidi, OBERMEYER, Gerhard et SCHULZE, Waltraud X, 2013. Sucrose-induced Receptor Kinase SIRK1 Regulates a Plasma Membrane Aquaporin in Arabidopsis. In : *Molecular & Cellular Proteomics* [en ligne]. 2013. Vol. 12, n° 10, p. 2856-2873. DOI 10.1074/mcp.M113.029579.

XIA, Ye, LEI, Lei, BRABHAM, Chad, STORK, Jozsef, STRICKLAND, James, LADAK, Adam, GU, Ying, WALLACE, Ian et DEBOLT, Seth, 2014. Acetobixan, an inhibitor of cellulose

synthesis identified by microbial bioprospecting. In : ZABOTINA, Olga A. (éd.), *PLoS ONE* [en ligne]. 18 avril 2014. Vol. 9, n° 4, p. e95245. DOI 10.1371/journal.pone.0095245.

XIAO, C, SOMERVILLE, C et ANDERSON, C T, 2014. POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION1 Functions in Cell Elongation and Flower Development in Arabidopsis. In : *Plant Cell* [en ligne]. 2014. Vol. 26, n° 3, p. 1018-1035. DOI 10.1105/tpc.114.123968.

XIE, Liqiong, YANG, Cangjing et WANG, Xuelu, 2011. Brassinosteroids can regulate cellulose biosynthesis by controlling the expression of CESA genes in Arabidopsis. In : *Journal of Experimental Botany*. 2011. Vol. 62, n° 13, p. 4495-4506. DOI 10.1093/jxb/err164.

XU, S.-L., RAHMAN, Abidur, BASKIN, Tobias I et KIEBER, Joseph J, 2008. Two Leucine-Rich Repeat Receptor Kinases Mediate Signaling, Linking Cell Wall Biosynthesis and ACC Synthase in Arabidopsis. In : *THE PLANT CELL ONLINE* [en ligne]. 2008. Vol. 20, n° 11, p. 3065-3079. DOI 10.1105/tpc.108.063354.

YAMADA, Hisami, SUZUKI, Tomomi, TERADA, Kazunori, TAKEI, Kentaro, ISHIKAWA, Kuniko, MIWA, Kumiko, YAMASHINO, Takafumi et MIZUNO, Takeshi, 2001. The arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. In : *Plant and Cell Physiology* [en ligne]. septembre 2001. Vol. 42, n° 9, p. 1017-1023. DOI 10.1093/pcp/pce127.

YAMANAKA, Takuya, NAKAGAWA, Yuko, MORI, Kendo, NAKANO, Masataka, IMAMURA, Tomomi, KATAOKA, Hajime, TERASHIMA, Asuka, IIDA, K., KOJIMA, Itaru, KATAGIRI, Takeshi, SHINOZAKI, Kazuo et IIDA, Hidetoshi, 2010. MCA1 and MCA2 That Mediate Ca²⁺ Uptake Have Distinct and Overlapping Roles in Arabidopsis. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2010. Vol. 152, n° 3, p. 1284-1296. DOI 10.1104/pp.109.147371.

YEATS, T H, SOREK, H, WEMMER, D E et SOMERVILLE, C R, 2016. Cellulose Deficiency Is Enhanced on Hyper Accumulation of Sucrose by a H⁺-Coupled Sucrose Symporter. In : *Plant Physiol* [en ligne]. 2016. Vol. 171, n° 1, p. 110-124. DOI 10.1104/pp.16.00302.

YONEDA, A, HIGAKI, T, KUTSUNA, N, KONDO, Y, OSADA, H, HASEZAWA, S et MATSUI, M, 2007. Chemical genetic screening identifies a novel inhibitor of parallel alignment of cortical microtubules and cellulose microfibrils. In : *Plant Cell Physiol* [en ligne]. 2007. Vol. 48, n° 10, p. 1393-1403. DOI 10.1093/pcp/pcm120.

YONEDA, A, ITO, T, HIGAKI, T, KUTSUNA, N, SAITO, T, ISHIMIZU, T, OSADA, H, HASEZAWA, S, MATSUI, M et DEMURA, T, 2010. Cobtorin target analysis reveals that pectin functions in the deposition of cellulose microfibrils in parallel with cortical microtubules. In : *Plant J* [en ligne]. 2010/11/13. 2010. Vol. 64, n° 4, p. 657-667. DOI 10.1111/j.1365-313X.2010.04356.x.

YORK, W S, DARVILL, A G et ALBERSHEIM, P, 1984. Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. In : *Plant physiology* [en ligne]. 1 juin 1984. Vol. 75, n° 2, p. 295-7. DOI 10.1104/PP.75.2.295.

YU, Q, TANG, C et KUO, J, 2000. A critical review on methods to measure apoplastic

pH in plants. In : *Plant and Soil*. 2000. Vol. 219, p. 29-40.

ZANDLEVEN, Joris, SØRENSEN, Susanne Oxenbøll, HARHOLT, Jesper, BELDMAN, Gerrit, SCHOLS, Henk A., SCHELLER, Henrik V. et VORAGEN, Alphons J., 2007. Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. In : *Phytochemistry* [en ligne]. 1 avril 2007. Vol. 68, n° 8, p. 1219-1226. DOI 10.1016/j.phytochem.2007.01.016.

ZHANG, Deshui, HRMOVA, Maria, WAN, Chun Hua, WU, Chunfa, BALZEN, Jace, CAI, Wendy, WANG, Jing, DENSMORE, Llewellyn D, FINCHER, Geoffrey B, ZHANG, Hong et HAIGLER, Candace H, 2004. Members of a new group of chitinase-like genes are expressed preferentially in cotton cells with secondary walls. In : *Plant Molecular Biology* [en ligne]. 2004. Vol. 54, n° 3, p. 353-372. DOI 10.1023/B:PLAN.0000036369.55253.dd.

ZHANG, Fan, HUANG, Liyu, WANG, Wensheng, ZHAO, Xiuqin, ZHU, Linghua, FU, Binying et LI, Zhikang, 2012. Genome-wide gene expression profiling of introgressed indica rice alleles associated with seedling cold tolerance improvement in a japonica rice background. In : *BMC Genomics* [en ligne]. 7 septembre 2012. Vol. 13, n° 1, p. 461. DOI 10.1186/z.

ZHANG, T, ZHENG, Y et COSGROVE, D J, 2015. Spatial Organization of Cellulose Microfibrils and Matrix Polysaccharides in Primary Plant Cell Walls as Imaged by Multi-Channel Atomic Force Microscopy. In : *Plant J* [en ligne]. 2015. DOI 10.1111/tbj.13102.

ZHANG, Xueyang, DOMINGUEZ, Pia Guadalupe, KUMAR, Manoj, BYGDELL, Joakim, MIROSHNICHENKO, Sergey, SUNDBERG, Björn, WINGSLE, Gunnar et NIITTYLÄ, Totte, 2018. Cellulose Synthase Stoichiometry in Aspen Differs from *Arabidopsis* and Norway Spruce. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2018. Vol. 177, n° 3, p. 1096-1107. DOI 10.1104/pp.18.00394.

ZHANG, Yi, NIKOLOVSKI, Nino, SORIEUL, Mathias, VELLOSILO, Tamara, MCFARLANE, Heather E., DUPREE, Ray, KESTEN, Christopher, SCHNEIDER, René, DRIEMEIER, Carlos, LATHE, Rahul, LAMPUGNANI, Edwin, YU, Xiaolan, IVAKOV, Alexander, DOBLIN, Monika S., MORTIMER, Jenny C., BROWN, Steven P., PERSSON, Staffan et DUPREE, Paul, 2016. Golgi-localized STELLO proteins regulate the assembly and trafficking of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. In : *Nature Communications* [en ligne]. 9 juin 2016. Vol. 7, p. 11656. DOI 10.1038/ncomms11656.

ZHAO, Qingxin, YUAN, Sheng, WANG, Xin, ZHANG, Yuling, ZHU, Hong et LU, Changmei, 2008. Restoration of Mature Etiolated Cucumber Hypocotyl Cell Wall Susceptibility to Expansin by Pretreatment with Fungal Pectinases and EGTA in Vitro. In : *PLANT PHYSIOLOGY* [en ligne]. 2008. Vol. 147, n° 4, p. 1874-1885. DOI 10.1104/pp.108.116962.

ZHONG, R, MORRISON 3RD, W H, FRESHOUR, G D, HAHN, M G et YE, Z H, 2003. Expression of a mutant form of cellulose synthase *AtCesA7* causes dominant negative effect on cellulose biosynthesis. In : *Plant Physiol* [en ligne]. 2003. Vol. 132, n° 2, p. 786-795.

ZHONG, Ruiqin, DEMURA, Taku et YE, Zheng-Hua, 2006. SND1, a NAC Domain Transcription Factor, Is a Key Regulator of Secondary Wall Synthesis in Fibers of *Arabidopsis*. In : *THE PLANT CELL ONLINE* [en ligne]. 2006. Vol. 18, n° 11, p. 3158-3170. DOI 10.1105/tpc.106.047399.

ZHONG, Ruiqin, MCCARTHY, Ryan L., HAGHIGHAT, Marziyeh et YE, Zheng Hua, 2013. The Poplar MYB Master Switches Bind to the SMRE Site and Activate the Secondary Wall Biosynthetic Program during Wood Formation. In : HAZEN, Samuel P. (éd.), *PLoS ONE* [en ligne]. 29 juillet 2013. Vol. 8, n° 7, p. e69219. DOI 10.1371/journal.pone.0069219.

ZHONG, Ruiqin, RICHARDSON, Elizabeth A. et YE, Zheng Hua, 2007. Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. In : *Planta* [en ligne]. 18 avril 2007. Vol. 225, n° 6, p. 1603-1611. DOI 10.1007/s00425-007-0498-y.

ZHONG, Ruiqin, RICHARDSON, Elizabeth A et YE, Zheng-Hua, 2007. The MYB46 Transcription Factor Is a Direct Target of SND1 and Regulates Secondary Wall Biosynthesis in Arabidopsis. In : *THE PLANT CELL ONLINE* [en ligne]. 2007. Vol. 19, n° 9, p. 2776-2792. DOI 10.1105/tpc.107.053678.

ZHONG, Ruiqin et YE, Zheng-Hua, 2010. The poplar PtrWNDs are transcriptional activators of secondary cell wall biosynthesis. In : *Plant Signaling & Behavior* [en ligne]. avril 2010. Vol. 5, n° 4, p. 469-472. DOI 10.4161/psb.5.4.11400.

ZHONG, Ruiqin et YE, Zheng Hua, 2015. Secondary cell walls: Biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. In : *Plant and Cell Physiology* [en ligne]. 1 février 2015. Vol. 56, n° 2, p. 195-214. DOI 10.1093/pcp/pcu140.

ZHU, Chuanmei, GANGULY, Anindya, BASKIN, Tobias I, MCCLOSKEY, Daniel D., ANDERSON, Charles T, FOSTER, Cliff, MEUNIER, Kristoffer A, OKAMOTO, Ruth, BERG, Howard et DIXIT, Ram, 2015. The Fragile Fiber1 Kinesin Contributes to Cortical Microtubule-Mediated Trafficking of Cell Wall Components. In : *Plant Physiology* [en ligne]. 2015. Vol. 167, n° 3, p. 780-792. DOI 10.1104/pp.114.251462.

ZHU, Lei, CHU, Liang-Cui, LIANG, Yan, ZHANG, Xue-Qin, CHEN, Li-Qun et YE, De, 2018. The Arabidopsis CrRLK1L protein kinases BUPS1 and BUPS2 are required for normal growth of pollen tubes in the pistil. In : *The Plant Journal* [en ligne]. 1 août 2018. Vol. 95, n° 3, p. 474-486. DOI 10.1111/tpj.13963.

ZHU, Xiaoyu, LI, Shundai, PAN, Songqin, XIN, Xiaoran et GU, Ying, 2018. CSI1, PATROL1, and exocyst complex cooperate in delivery of cellulose synthase complexes to the plasma membrane. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 2018. p. 201800182. DOI 10.1073/pnas.1800182115.

ZHU, Ya Na, SHI, Dong Qiao, RUAN, Meng Bin, ZHANG, Li Li, MENG, Zhao Hong, LIU, Jie et YANG, Wei Cai, 2013. Transcriptome analysis reveals crosstalk of responsive genes to multiple abiotic stresses in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). In : SUN, Meng-xiang (éd.), *PLoS ONE* [en ligne]. 5 novembre 2013. Vol. 8, n° 11, p. e80218. DOI 10.1371/journal.pone.0080218.

ZIPFEL, Cyril, 2014. *Plant pattern-recognition receptors* [en ligne]. 1 juillet 2014. S.l. : Elsevier Current Trends. [Consulté le 18 septembre 2018]. ISBN 1349-7413. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490614000945>.

ZOHDI, Nor Khanani et AMID, Mehrnoush, 2013. Optimization of extraction of novel pectinase enzyme discovered in red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. In : *Molecules* [en ligne]. 20 novembre 2013. Vol. 18, n° 11, p. 14366-14380.

DOI 10.3390/molecules181114366.

ZYKWINSKA, A W, RALET, M C, GARNIER, C D et THIBAUT, J F, 2005. Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. In : *Plant Physiol* [en ligne]. 2005. Vol. 139, n° 1, p. 397-407.

ANNEXE 1 :

Tableau des mutants *cesa* d'*Arabidopsis thaliana*.
Adapté de McFarlane et al (2010)

CESA gene	Allele	Mutations	Notes	References
CESA1 (At4g32410)	<i>rsw1-1</i>	A-549-V	Ts (31°C)	Arioli 1998
	<i>lycos</i>	G-620-E	quinoxyphe- resistant, SD	Sethaphong 2013
	<i>any1</i>	D-604-N		Fujita 2011
	<i>rsw1-2</i>	G-631-S	Ler background	Gillmor 2002
	<i>rsw1-45</i>	E-779-K	Ler background	Beeckman 2002
	<i>rsw1-20</i>	D-780-N	Ler background	
	<i>aegeus</i>	A-903-V	quinoxyphe- resistant, SD	Harris 2012
	<i>rsw1-10</i>	T-DNA	Ws background	Fagard 2000
	<i>cesa1-1</i>	T-DNA: SAIL_1303_D08		Persson2007
	<i>cesa1-2</i>	T-DNA: SAIL_278_E08		
	<i>cesa1-1BB</i>	A-1023-T	C17 resistant	Hu, 2016
	<i>cesa1-3D</i>	V-297-M	C17 resistant	
	<i>cesa1-3E,4H,7L,17Y,19B1</i>	A-1018-V	C17 resistant	
	<i>cesa1-3G, 9Q</i>	L-872-F	C17 resistant	
	<i>cesa1-3F</i>	S-892-N	C17 resistant	
	<i>cesa1-9R</i>	G-1013-R	C17 resistant	
	<i>cesa1-14v</i>	K-945-R	C17 resistant	
	<i>cesa1-14U,17Z,20D1</i>	G-1013-E	C17 resistant	
	<i>cesa1-18A1</i>	S-307-L	C17 resistant	
<i>cesa1-20C1</i>	P-1010-L	C17 resistant		
CESA2 (At4g39350)	<i>cesa2-1</i>	T-DNA: SAIL_400_D01		
	<i>cesa2-2</i>	T-DNA: SALK_096542		
	<i>cesa2-3</i>	T-DNA: SALK_057274		Desprez 2007
	<i>cesa2-4</i>	Ac/Ds transposon	Ler background, KO	
CESA3 (At5g05170)	<i>eli1-1</i>	S-301-F		Cano Delgado 2000, 2003
	<i>ixr1-6</i>	S-377-F	IXR, Ler background	Sethaphong 2013
	<i>eli1-2</i>	A-522-V		Cano Delgado 2000, 2003
	<i>repp3</i>	P-578-L	IXR	Feraru 2011
	<i>thantos</i>	P-578-S	DN	Daras 2009
	<i>cev1</i>	G-617-E		Ellis 2002
	<i>mre1</i>	G-916-E		Pysh 2012
	<i>ixr1-2</i>	T-942-I	SD, IXR	Scheible 2001

	<i>ixr1-1</i>	G-998-D	SD, IXR, TZ-resistant	Harris 2012 Sharples 1998
	<i>rsw5</i>	P-1056-S	Ts (31°C)	Wang 2006
	<i>eli1-3</i>	Not reported		Cano Delgado 2000
	<i>eli1-4</i>	Not reported	Referred to as eli1-3 in Rogers 2005	Rogers 2005
	<i>je5</i>	G-916-E		Desprez 2007
	<i>cesa3-1</i>	T-DNA: SALK_014134		Persson 2007
	<i>cesa3-2</i>	T-DNA: SALK_137389		
	<i>cesa3-3</i>	T-DNA: SALK_019756		
	<i>cesa3-2C,5R,6K,15W</i>	S-983-F	C17 resistant	Hu, 2016
	<i>cesa3-8P</i>	S-1037F	C17 resistant	
CESA4 (At5g44030)	<i>irx5-3</i>	Q-263-STOP	Ler background	Taylor, 2003
	<i>irx5-2</i>	W-995-STOP	Ler background	
	<i>irx5-1</i>	DS transposon at L858	Ler background	
	<i>irx5-4</i>	T-DNA: SALK_084627		Brown, 2005
	<i>irx5-5/nws2</i>	T-DNA		Hernandez-Blanco, 2007
CESA5 (At5g09870)	<i>mum3-1</i>	W-997-STOP	Col-2 background	Sullivan 2011
	<i>cesa5-1</i>	T-DNA: SALK_125535		Desprez, 2007
	<i>cesa5-2</i>	T-DNA: SALK_099008		Sullivan 2011
	<i>cesa5-3</i>	T-DNA: SALK_070473		
	<i>cesa5-4</i>	T-DNA: SALK_118511	Referred to as <i>cesa5-1</i> in Harpaz-Saad	Harpaz-Saad, 2011
	<i>cesa5-5</i>	T-DNA: SALK_118491	Referred to as <i>cesa5-1</i> in Mendu and <i>cesa5-2</i> in Harpaz-Saad	Harpaz-Saad, 2011, Mendu, 2011
	<i>cesa5-6</i>	T-DNA: SALK_140270	Referred to as <i>cesa5-3</i> in Harpaz-Saad	Harpaz-Saad, 2011, Mendu 2011
	<i>cesa5-7</i>	T-DNA: SALK_023353	Referred to as <i>cesa5-2</i> in Mendu	Mendu, 2011
CESA6 (At5g64740)	<i>prc1-19</i>	Y-275-STOP	Ws background	Fagard, 2000
	<i>prc1-1/prc1-3</i>	Q-720-STOP		
	<i>prc1-9/qui-1</i>	K-722-STOP	Ws background	
	<i>prc1-4/prc1-5</i>	W-777-STOP		
	<i>ixr2-1</i>	R-1064-W	SD, IXR	Desprez, 2007
	<i>prc1-20</i>	Splice site mutation at 7 th intron		Paradez, 2008

	<i>prc1-2</i>	Not reported		Fagard, 2000
	<i>prc1-6</i>	Not reported		
	<i>prc1-7</i>	Not reported		
	<i>prc1-11/qui-3</i>	Not reported		
	<i>prc1-8</i>	T-DNA	Ws background	
	<i>prc1-10/qui-2</i>	T-DNA	Ws background	
	<i>prc1-12</i>	T-DNA	Ws background	
CESA7 (At5g17420)	<i>mur10-1</i>	W-444-STOP		Bosca, 2006
	<i>irx3-5</i>	D-524-N	Col-2 background	Liang, 2010
	<i>fra5</i>	P-557-T	SD	Zhong, 2003
	<i>mur10-2</i>	H-734-Y		Bosca, 2006
	<i>irx3-1</i>	W-859-STOP	Ler background	Taylor, 1999
	<i>irx3-4</i>	T-DNA: SALK_029940		Brown, 2005
	<i>mur10-3</i>	T-DNA: SAIL_24_B10		Bosca, 2006
CESA8 (At4g18780)	<i>irx1-6/ern1-1</i>	W-217-STOP		Hernandez-Blanco, 2007
	<i>lew2-1</i>	W-217-STOP	C24 background	Chen, 2005
	<i>fra6</i>	R-362-K		Zhong, 2003
	<i>irx1-2</i>	S-679-L	Ler background	Taylor, 2000
	<i>irx1-1</i>	D-683-N	Ler background	
	<i>lew2-2</i>	L-792-F		Chen, 2005
	<i>irx1-5</i>	T-DNA: SALK_026812		Brown, 2005
CESA9 (At2g21770)	<i>cesa9-1</i>	T-DNA: SALK_107750		Persson, 2007
	<i>cesa9-2</i>	T-DNA: SALK_121961		
	<i>cesa9-3</i>	T-DNA: SALK_046453		Sullivan, 2011
	<i>cesa9-4</i>	T-DNA: SALK_046455	Referred to as <i>cesa9-2</i> in Stork, 2010	Stork, 2010
CESA10 (At2g25540)	<i>cesa10-1</i>	SALK_150405		Sullivan, 2011

^a The genetic background is Columbia, unless otherwise noted. DN = dominant negative, IXR = isoxaben resistant, KO = knockout mutant (determined by RT-PCR), SD = semi-dominant, Ts = temperature sensitive (restrictive temperature indicated in parentheses).

Références citées dans le tableau :

- Arioli T, Peng L, Betzner AS, Burn J, Wittke W, Herth W, Camilleri C, et al. 1998. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis. *Science* 279(5351):717– 720.
- Beeckman T, Przemeck GKH, Stamatou G, Lau R, Terry N, De Rycke R, Inzé D, and Berleth T. 2002. Genetic complexity of cellulose synthase a gene function in Arabidopsis embryogenesis. *Plant Physiol* 130(4):1883–1893.
- Bosca S, Barton CJ, Taylor NG, Ryden P, Neumetzler L, Pauly M, Roberts K, and Seifert GJ. 2006. Interactions between MUR10/CesA7-dependent secondary cellulose biosynthesis and primary cell wall structure. *Plant Physiol* 142(4):1353– 1363.
- Brown DM, Zeef LAH, Ellis J, Goodacre R, and Turner SR. 2005. Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell* 17(8):2281– 2295.

- Caño-Delgado AI, Metzclaff K, and Bevan MW. 2000. The *eli1* mutation reveals a link between cell expansion and secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 127(15):3395–3405.
- Caño-Delgado A, Penfield S, Smith C, Catley M, and Bevan M. 2003. Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 34(3):351–362.
- Chen Z, Hong X, Zhang H, Wang Y, Li X, Zhu J-K, and Gong Z. 2005. Disruption of the cellulose synthase gene, *AtCesA8/IRX1*, enhances drought and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* 43(2):273–283.
- Chu Z, Chen H, Zhang Y, Zhang Z, Zheng N, Yin B, Yan H, et al., 2007. Knockout of the *AtCESA2* gene affects microtubule orientation and causes abnormal cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143(1):213–224.
- Daras G, Rigas S, Penning B, Milioni D, McCann MC, Carpita NC, Fasseas C, and Hatzopoulos P. 2009. The *thanatos* mutation in *Arabidopsis thaliana* cellulose synthase 3 (*AtCesA3*) has a dominant-negative effect on cellulose synthesis and plant growth. *New Phytol* 184(1):114–126.
- Desprez TT, Juraniec MM, Crowell EFE, Jouy HH, Pochylova ZZ, Parcy FF, Höfte HH, Gonneau MM, and Vernhettes SS. 2007. Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(39):15572–15577.
- Ellis C, Karafyllidis I, Wasternack C, and Turner JG. 2002. The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* 14(7):1557–1566.
- Fagard M, Desnos T, Desprez T, Goubet F, Refregier G, Mouille G, McCann M, Rayon C, Vernhettes S, and 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(12):2409–2423.
- Feraru E, Feraru MI, Kleine-Vehn J, Martinière A, Mouille G, Vanneste S, Vernhettes S, Runions J, and Friml J. 2011. PIN polarity maintenance by the cell wall in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 21(4):338–343.
- Fujita M, Himmelspach R, Hocart CH, Williamson RE, Mansfield SD, and Wasteneys GO. 2011. Cortical microtubules optimize cell-wall crystallinity to drive unidirectional growth in *Arabidopsis*. *Plant J* 66(6):915–928.
- Gillmor CS, Poindexter P, Lorieau J, Palcic MM, and Somerville C. 2002. Alpha-glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*. *J Cell Biol* 156(6):1003–1013.
- Harpaz-Saad S, McFarlane HE, Xu S, Divi UK, Forward B, Western TL, and Kieber JJ. 2011. Cellulose synthesis via the FEI2 RLK/SOS5 pathway and cellulose synthase 5 is required for the structure of seed coat mucilage in *Arabidopsis*. *Plant J* 68(6):941–953.
- Harris DM, Corbin K, Wang T, Gutierrez R, Bertolo AL, Petti C, Smilgies D-M, et al. 2012. Cellulose microfibril crystallinity is reduced by mutating C-terminal transmembrane region residues CESA1A903V and CESA3T942I of cellulose synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(11):4098–4103.
- Hernández-Blanco C, Feng DX, Hu J, Sánchez-Vallet A, Deslandes L, Llorente F, Berrocal-Lobo M, et al. 2007. Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* 19(3):890–903.
- Hu, Z., Vanderhaeghen, R., Cools, T., Wang, Y., De Clercq, I., Leroux, O., Nguyen, L., Belt, K., Millar, A. H., Audenaert, D., Hilson, P., Small, I., Mouille, G., Vernhettes, S., Van Breusegem, F., Whelan, J., Höfte, H., De Veylder, L. 2016. Mitochondrial defects confer tolerance against cellulose deficiency. *Plant Cell*, 28 (9), 2276-2290.
- Liang Y-K, Xie X, Lindsay SE, Wang YB, Masle J, Williamson L, Leyser O, and Hetherington AM. 2010. Cell wall composition contributes to the control of transpiration efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 64(4):679–686.
- Mendu V, Griffiths JS, Persson S, Stork J, Downie AB, Voiniciuc C, Haughn GW, and Debolt S. 2011. Subfunctionalization of cellulose synthases in seed coat epidermal cells mediates secondary radial wall synthesis and mucilage attachment. *Plant Physiol* 157(1):441–453.
- Paredes AR, Persson S, Ehrhardt DW, and Somerville CR. 2008. Genetic evidence that cellulose synthase activity influences microtubule cortical array organization. *Plant Physiol* 147(4):1723–1734.
- Persson S, Paredes A, Carroll A, Palsdottir H, Doblin M, Poindexter P, Khitrov N, Auer M, and Somerville CR. 2007. Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(39):15566–15571.
- Pysl L, Alexander N, Swatzyna L, and Harbert R. 2012. Four alleles of *AtCESA3* form an allelic series with respect to root phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum* 144(4):369–381.
- Rogers LA, Dubos C, Surman C, Willment J, Cullis IF, Mansfield SD, and Campbell MM. 2005. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *New Phytol* 168(1):123–140.
- Scheible WR, Eshed R, Richmond T, Delmer D, and Somerville C. 2001. Modifications of cellulose synthase confers resistance to isoxaben and thiazolidone herbicides in *Arabidopsis ixr1* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18):10079–10084.
- Sethaphong L, Haigler CH, Kubicki JD, Zimmer J, Bonetta D, Debolt S, and Yingling YG. 2013. Tertiary model of a plant cellulose synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(18):7512–7517.

- Sharples KR, Hawkes TR, Mitchell G, Edwards LS, Langford MP, Langton DW, Rogers KM, Townson JK, and Wang Y. 1998. A novel thiazolidinone herbicide is a potent inhibitor of glucose incorporation into cell wall material. *Pesticide Science* 58:368– 376.
- Stork J, Harris D, Griffiths J, Williams B, Beisson F, Li-Beisson Y, Mendu V, Haughn G, and Debolt S. 2010. CELLULOSE SYNTHASE9 serves a nonredundant role in secondary cell wall synthesis in Arabidopsis epidermal testa cells. *Plant Physiol* 153(2):580.
- Sullivan S, Ralet M-C, Berger A, Diatloff E, Bischoff V, Gonneau M, Marion-Poll A, and North HM. 2011. CESA5 is required for the synthesis of cellulose with a role in structuring the adherent mucilage of Arabidopsis seeds. *Plant Physiol* 156(4):1725– 1739.
- Taylor NG, Howells RM, Huttly AK, Vickers K, and Turner SR. 2003. Interactions among three distinct Cesa proteins essential for cellulose synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(3):1450–1455.
- Taylor NG, Laurie S, and Turner SR. 2000. Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 12(12):2529– 2540.
- Taylor NGN, Scheible WRW, Cutler SS, Somerville CRC, and Turner SRS. 1999. The irregular xylem3 locus of Arabidopsis encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. *Plant Cell* 11(5):769–780.
- Wang J, Howles PA, Cork AH, Birch RJ, and Williamson RE. 2006. Chimeric proteins suggest that the catalytic and/or C-terminal domains give Cesa1 and Cesa3 access to their specific sites in the cellulose synthase of primary walls. *Plant Physiol* 142(2):685–695.
- Zhong R, Morrison WH, Freshour GD, Hahn MG, and Ye Z-H. 2003. Expression of a mutant form of cellulose synthase *AtCesA7* causes dominant negative effect on cellulose biosynthesis. *Plant Physiol* 132(2):786–795.

ANNEXE 2 :

Publication sur la signalisation de THESEUS1

J'ai participé dans le cadre de ma thèse aux travaux de mon équipe sur la perception du peptide RALF34 par THESEUS1. J'ai pour cela effectué des mesures de pH pour percevoir l'alcalinisation de la paroi lors de traitements de plantules avec les peptides RALF. Voici le manuscrit concernant cette publication qui est paru dans *Current Biology* en août 2018 :

Receptor Kinase THESEUS1 is a Rapid Alkalinisation Factor 34 receptor in Arabidopsis

Martine Gonneau¹, Thierry Desprez¹, Marjolaine Martin, Verónica G. Doblas, Laura Bacete², Fabien Miart, Rodnay Sormani³, Kian Hématy, Julien Renou, Benoit Landrein⁴, Evan Murphy⁵, Brigitte Van De Cotte^{6,7}, Samantha Vernhettes, Ive De Smet^{6,7}, and Herman Höfte⁸

Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, Centre National pour la Recherche Scientifique, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, RD10, 78026 Versailles Cedex France.

¹These authors contributed equally

²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid (UPM) - Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Campus de Montegancedo UPM, 28223-Pozuelo de Alarcón (Madrid), Spain.

³Current address: Université de Lorraine, UMR 1136 Interactions Arbres/Microorganismes, Faculté des Sciences et Technologies, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁴Sainsbury Laboratory, University of Cambridge, Bateman Street, Cambridge CB2 1LR, UK.

⁵Division of Plant and Crop Sciences, School of Biosciences, University of Nottingham, Loughborough LE12 5RD, UK.

⁶Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent University, Ghent, Belgium.

⁷VIB Center for Plant Systems Biology, Ghent, Belgium.

⁸Corresponding author, lead contact

Highlights:

- THE1 is a Rapid Alkalinisation Factor 34 receptor in *Arabidopsis*
- RALF34-THE1 signalling module fine-tunes lateral root initiation
- RALF34-THE1 signalling depends on FER

In Brief: (346 ch)

Malectin receptor kinase THE1 is required to monitor wall integrity of growing plant cells. Gonneau et al. now show that THE1 is a receptor for the peptide RALF34 and that RALF34-THE1 signalling is required for the fine-tuning of pericycle divisions during lateral root initiation and, at least partially, dependent on FER, another RALF receptor.

Summary (182 wds)

The growth of plants, like that of other walled organisms, depends on the ability of the cell wall to yield without losing its integrity. In this context, plant cells can sense the perturbation of their walls and trigger adaptive modifications in cell wall polymer interactions. *Catharanthus roseus* Receptor Like Kinase 1-like (*CrRLK1L*) THESEUS1 (THE1) was previously shown in *Arabidopsis* to trigger growth inhibition and defence responses upon perturbation of the cell wall but so far neither the ligand was known nor the role of the receptor in normal development. Here we report that THE1 is a receptor for the peptide Rapid Alkalinisation Factor (RALF) 34 and that this signalling module has a role in the fine-tuning of lateral root initiation. We also show that RALF34-THE1 signalling depends, at least for some responses, on FERONIA (FER), another RALF receptor involved in a variety of processes including immune signalling, mechanosensing and fertilisation [1]. Together, the results show that RALF34 and THE1 are part of a signalling network that integrates information on the integrity of the cell wall with the coordination of normal morphogenesis.

Keywords: Cell wall, Rapid Alkalinisation Factor, FERONIA, Lateral Root Initiation, *Arabidopsis thaliana*

Results and Discussion

THE1 is a RALF34 receptor

Recently, several members of the *CrRLK1L* family were identified as receptors for RALF peptides: FER for RALF1 and RALF23 [2,3] and ANX1/2 and BUPS1/2 for RALF4 and 19 [4]. We therefore investigated whether THE1 could act as a receptor for other RALF family members. Six synthetic peptides corresponding to mature RALF peptides predicted to be expressed during seedling development [5][6], were screened for their ability to inhibit root growth in Col-0 and the loss-of-function mutant *the1-1* (encoding inactive THE1^{G37D}, Figure 1A, [7]). Except for RALF32, these peptides significantly inhibited root growth of Col-0 (Figure 1B,C, S1A). Interestingly, among the five active peptides, only RALF34 failed to inhibit root growth in *the1-1* (Figure 1B). Another loss of function allele *the1-6* (carrying a stop codon at position S53 [8]) but also the hypermorphic allele *the1-4* (carrying a T-DNA insertion at position 466, removing the cytoplasmic domain, [8]) and a line overexpressing *THE1:GFP* showed reduced sensitivity to RALF34 (Figure 1B). These results indicate that the mutations in THE1 are causal for the tolerance to RALF34-mediated root growth inhibition. It is not clear, however, why the hypermorphic allele and the overexpression of *THE1:GFP* also prevented the response to RALF34. RALF34 is a 56 amino acid basic (pI = 11.08) peptide, which, like many other RALFs [5], is predicted to be cleaved from its acidic prodomain by a subtilisin-like protease at the recognition site RRXL (Figure S1H). Among the 36 predicted RALF peptides in *A. thaliana*, RALF34 is the only representative of clade III(C) and has orthologs throughout the plant kingdom, suggesting a conserved function [5]. Both *RALF34* and *THE1* are expressed in vegetative tissues and the expression pattern of *RALF34* is most similar to that of *THE1* among the *RALF* and *CrRLK1L* genes analysed (Figure S2A). The overlapping expression was further confirmed using promoter-reporter lines. In the root (Figure 2H), the nuclear *P_{RALF34}::N:3xRFP* signal was present in epidermis, in pericycle cells during lateral root initiation (where it preceded the first formative cell divisions [9]), and emerging lateral roots. *P_{THE1}::N:3xVENUS* signal was observed throughout the central cylinder, including the pericycle and in emerging lateral roots (Figure 2H). In the hypocotyl (Fig. S2B), *P_{THE1}::N:3xVENUS* was expressed in all cell types within the elongation zone (Fig. S2D) whereas *P_{RALF34}::N:3xRFP* was present only in the epidermis but throughout the organ (Figure S2C). The expression of the two genes in the hypocotyl therefore overlapped in the epidermis within the rapid growth zone.

Consistent with the expression pattern in the root, RALF34 plays a role in lateral root initiation [9]. Specifically, *ralf34* partial loss-of-function mutants showed an increased density

and irregular spacing of stage 1 lateral root primordia as well as aberrant formative asymmetric pericycle cell divisions (Figure 2B,D). Interestingly, loss of function alleles *the1-1* and *the1-6* also showed an increased proportion of stage 1 lateral root primordia, relative to the WT (Figure 2C,D) and atypical stage 1 lateral root primordia displaying extra anticlinal pericycle cell divisions (Figure 2C,D). We also observed, especially in *the1-1* and *the1-4*, unusual positioning of lateral root primordia, such as very close to each other or stage 1 lateral root primordia close to a more mature lateral root (Figure 2E,F). The strikingly similar phenotypes for *ralf34* and *the1* mutants suggest that RALF34 signalling was, at least in part, *THE1*-dependent. Interestingly, the hypermorphic allele *the1-4, 35S::THE1:GFP* and 3 independent *35S::RALF34* overexpression lines (Figure 2D,G and S2F) showed the same phenotype as the loss of function alleles. This is consistent with the observations regarding primary root growth inhibition by RALF34 and suggests that the spatio-temporal pattern and the dosage-dependent regulation of *THE1* and RALF34 activity is critical for normal signalling in these contexts.

We next investigated whether *THE1* might be a receptor for RALF34. We used Micro-Scale Thermophoresis (MST) [10] to study the binding of peptides RALF34 and RALF1 to the fluorescently-labelled ectodomains of respectively *THE1* (ecto-*THE1*) and the mutant version *THE1*^{G37D} (ecto-*THE1*m, corresponding to the inactive *the1-1* allele), produced in insect cells. RALF34 specifically bound ecto-*THE1*, with a high signal-to-noise ratio and a K_D in the micromolar range, whereas RALF1 as a negative control did not show saturable binding to ecto-*THE1* (Figure 1D). RALF34 also bound equally well to ecto-*THE1*m (Figure 1D), which carries a mutation in the highly conserved G37 residue [11] (Figure 1A). This suggests that defective RALF34 ligand binding cannot account for the *the1-1* mutant phenotype. Interestingly, RALF34 binding was pH sensitive: binding was highest at pH 7.8, reduced at pH 6.9 and absent at pH 6.5 (Figure S1D), in contrast to RALF1, which did not show a reproducible interaction at pH 7.8 nor at pH 6.9 (Figure S1D). The *in vivo* relevance of the pH-dependency of RALF34 binding was suggested by the complete loss of RALF34-induced (but not of RALF1-induced) root growth inhibition in the presence of the apoplast-acidifying drug fusaric acid [12] (Figure S1E). The alkaline pH-dependence for RALF34 binding to ecto-*THE1*, combined with the RALF34-promoted alkalisation of the apoplast, suggest a possible involvement of the RALF34-*THE1* signalling module in an amplification loop as described for instance in Turing's reaction-diffusion mechanisms [13].

Together, our data support a role for *THE1* as a pH-dependent receptor for RALF34. *THE1* is not the only receptor for RALF34; the peptide also binds to ANX1/2 and BUPS1/2 receptor

kinases that form a complex in the pollen tube to regulate pollen tube growth and sperm cell release [14]. This indicates a complex signalling system, which is dependent on the spatio-temporal expression of RALF34 and its receptors, but likely also on other proteins in the signalling complex.

Concerning the specific role of the RALF34-THE1 signalling module in lateral root initiation, we can only speculate at the moment. Cell wall remodelling plays an essential role during lateral root organogenesis [15][16], and it is possible that RALF34-THE1-mediated signalling is part of the regulatory mechanisms coordinating cell wall integrity and cell division during lateral root initiation. Alternatively, it is possible that RALF34-THE1-induced changes in apoplastic pH interfere with auxin flow, and as such impact the cell division pattern underlying lateral root initiation.

RALF34-THE1-induced cellular responses

The identification of RALF34 as the THE1 ligand, allowed the cellular responses of the activated receptor to be studied. Like for RALF1 [2] and other RALF peptides [17], RALF34 promoted the alkalinisation of the growth medium of light-grown seedlings (Figure 1E). This response was absent in *the1-6* (Figure 1E) and *the1-1* (Figure S1F,G), whereas RALF1 was equally active in WT and *the1-6* (Figure 1F). To assess the role of THE1 in Ca²⁺ signalling, we used the cytosolic Ca²⁺ reporter G5A [18]. RALF34 induced a rapid increase in cytosolic Ca²⁺ in the WT but not in *the1-1* (Figure 1G), whereas RALF1 triggered a Ca²⁺ response also in *the1-1* (Figure 1H), however with a reduced amplitude, relative to the WT, indicating that THE1 quantitatively affects this RALF1 response, in contrast to the other RALF1 responses that we studied. Together the results show that RALF34 triggers THE1-dependent cellular responses that are comparable to those induced by the FER ligand RALF1 [2], suggesting an early convergence of the signalling pathways. We next investigated to what extent the corresponding signalling pathways interact.

THE1 and FER signalling interactions

The loss of function *fer-4* mutant showed, consistent with a role for FER as a RALF1 receptor, resistance to root growth inhibition by RALF1 [2] but, surprisingly, also by RALF34 (Figure 1B,C) and the three other active RALF peptides tested (Figure S1A). More information on the THE1-FER relationship came from the study of the expression of two genes that are rapidly upregulated upon RALF1 treatment (*AT1G80840* and *AT4g14365*, encoding transcription factor WRKY40 and putative ubiquitin ligase XBAT34, respectively)

[2] (Figure 3A). Treatment (for 1 h) of WT seedlings with either RALF1 or RALF34, promoted the accumulation of both transcripts. In *the1-1*, RALF1 but not RALF34, promoted the expression of these genes, consistent with a role for THE1 as a RALF34 receptor. Also, as expected from its RALF-insensitive root phenotype, no induction was observed in *fer-4* for either RALF1 or RALF34. Interestingly, however, in mock-treated *fer-4*, transcript levels of both genes were comparable to those in RALF-treated WT plants (Figure 3A). Finally, the double mutant *the1-1/fer-4* was indistinguishable from *fer-4* with respect to the gene expression pattern (and the adult phenotype, Figure S3A). The constitutive expression of these RALF34-inducible transcripts in *fer-4* and *the1-1/fer-4* and not in *the1-1* suggests that FER, in contrast to THE1, represses the expression of these genes and that this repression is overruled, directly, by RALF1 and, indirectly through THE1, by RALF34 (Figure S4C). To understand this complex THE1–FER interaction, it should be noted that FER can adopt at least two active configurations associated with different signalling activities. Indeed, FER promotes innate immune signalling by acting as a scaffold for immune receptors and the co-receptor BAK1. This immune complex is disassembled upon binding to at least one FER ligand, RALF23 [3]. On the other hand, the RALF1-induced cytosolic Ca²⁺-transients and cell surface alkalisation do not require BAK1 [19]. Together these observations support a scenario (Figure S4C) in which one form of FER (FER_A in Figure S4C), possibly associated with BAK1, represses the expression of a set of genes including *WRKY40* and *XBAT34*. RALF1 would convert FER_A into FER_B and thus promote a (BAK1-independent ?) increase in cytosolic Ca²⁺ and surface pH [2]. RALF34-activated THE1 might also impinge on FER, although a parallel pathway cannot be ruled out (Figure S4C). Another argument for the interdependence of THE1 and FER signalling came from the study of the RALF-induced cytosolic Ca²⁺ transients. These responses (Figure 1G,H) undergo de-sensitisation as shown by the absence of a RALF1-induced Ca²⁺ transient 10 min after a first RALF1 induced response, or of a RALF34-induced transient after a RALF34 pretreatment (Figure 3B). Interestingly, treatment with RALF1 also prevented a subsequent Ca²⁺ response to RALF34 and, vice versa (Figure 3B). This did not simply reflect the depletion of the Ca²⁺ stores since RALF34 and RALF1 responses were respectively not, or only partially, affected by a Ca²⁺-response-triggering pre-treatment with the immune elicitor *flg22* (Figure S3B,C). This mutual desensitisation suggests that the respective signalling pathways converge upstream of the Ca²⁺-response, possibly through an interaction between the two receptors.

Finally, it should be noted that in *the1-4* (Figure 1A)[8][20]), RALF34 still promoted *WRKY40* and *XBAT34* transcript accumulation (Figure 3A) indicating that the THE1 cytosolic domain is not required for the de-repression of the gene expression.

Cell wall integrity signalling and the THE1-RALF34 module.

A recent study showed the requirement for both CrRLKL1 receptor heteromers (ANX1/2-BUPS1/2) and its ligands (RALF4/19) for the maintenance of cell wall integrity in growing pollentubes [4][21], suggesting that these RALF peptides are an integral part of the cell wall monitoring mechanism. It is therefore of interest to see whether this is also the case for the THE1-dependent responses to cell wall damage. Such responses occur for instance during infection with certain pathogens [22][23] or upon treatment with cellulose synthesis inhibitors (e.g. isoxaben) and include growth inhibition and accumulation of defense gene transcripts, ectopic lignin, ROS and the stress hormones jasmonic and salicylic acid [7][24]. We first showed that both isoxaben and the RALF peptides induced the expression of the same reporter genes. We used a luciferase reporter construct driven by the upstream sequence of the gene *At2g26530*, which is upregulated in a cellulose-deficient mutant in a *THE1*-dependent way [11] (Figure 4A,B). RALF34, RALF1 and the cellulose synthesis inhibitor isoxaben promoted luciferase activity in the growing zone of 4-day-old dark-grown hypocotyls, which corresponds to the expression domain of *THE1* in this organ (Figure S2B)[11]. In the *the1-1* background, this reporter did not respond to RALF34, showed a reduced response to isoxaben but still responded normally to RALF1 (Figure 4A,B). Treatment with RALF *and* isoxaben did not further enhance the response, suggesting that the two treatments impinge on the same pathway. In the *the1-4* background, however, the response to RALF34 and RALF1 was comparable to that of the WT, while the isoxaben response was enhanced. This indicates that the cytosolic domain of THE1 is not required for the activation of the *At2g26530* promoter by RALF1 and RALF34 and that it even has a negative effect on isoxaben-induced signalling. Similarly, isoxaben promoted an increase in *WRKY40* and *XBAT34* transcript levels, although with slower response kinetics than RALF1 or RALF34 (Figure 4C,D). This isoxaben response was reduced and enhanced in *the1-1* and *the1-4* respectively and absent in *fer-4* or *the1-1/fer-4* (Figure 4E,F). The mutant *ralf34-1* was unaffected in the isoxaben response, relative to the WT (Figure 4E,F) and isoxaben treatment did not promote *RALF34* transcript levels (Figure S4A). We also observed isoxaben-induced ectopic lignification [24] in the root elongation zone, the level of which was reduced in *the1-1* or *the1-6* and enhanced in *the1-4* and *fer-4* (Figure S4B). No lignin staining was observed in any of the mock-treated control seedlings

[8]. The lignification was unaltered in *ralf34-2* (relative to its WT, Landsberg *erecta*, *Ler*) and in *35S::RALF34* and even slightly increased in *ralf34-1* (relative to Col-0). In conclusion, both *THE1* and *FER* appear to play a role in these isoxaben-induced responses, whereas a role for RALF34, if any, remains to be demonstrated. Future studies will show whether other RALF peptides are redundant with RALF34 or that THE1-dependent cell wall sensing does not involve its RALF34 ligand. Concerning the role of FER in the responses to isoxaben, ectopic lignification was, in contrast to *WRKY40* and *XBAT34* expression, not constitutive in mock-treated *fer-4* [8] and therefore requires an additional, *FER*-independent, signal associated with isoxaben treatment. This is reminiscent of the recently reported role of FER in the repair of salt-induced perturbation of the cell wall [25], where in the absence of FER, growing root cells burst following salt treatment. Similarly, the *fer-4* cell walls may more easily lose their integrity upon isoxaben treatment, relative to the wild type, causing ectopic lignification as part of a damage response [26]. It remains to be seen whether or not the positive effect of THE1 on isoxaben-induced lignification also depends on its interaction with FER.

Conclusion

Overall, our results support that THE1 is a *bona fide* RALF34 receptor. This is shown by (i) the reduced sensitivity of *the1* mutants for RALF34-induced root growth inhibition, surface alkalinisation, cytosolic Ca²⁺ transients and reporter gene expression; (ii) the overlapping expression domains of *RALF34* and *THE1*; (iii) the comparable lateral root phenotypes of *ralf34* and *the1* mutants and (iv) the specific binding (as determined by MST) of RALF34 to ectoTHE1 with an affinity matching the dose-dependence of its biological activity

This study also supports a role for RALF34-THE1 signaling in a normal morphogenic event: the fine tuning of lateral root initiation. Future investigations will focus on the role of RALF34-THE1 in the perception of cell wall perturbations and how these signals are translated into changes in the rheology of the cell wall.

Supplemental Information

Supplemental information includes four figures and Supplemental Experimental Procedures and can be found with the article online at ...

Acknowledgements

The authors are grateful to Margaret Ahmad (Université P&M Curie, Paris) and Felix Cicéron (CERMAV-CNRS, Grenoble) for help with the setting up the insect cell expression system and Pascal Drevet (Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), IBITECS, CEA, CNRS, University Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette) for the large-scale production of insect cell-produced protein. Nadia Bessoltane is thanked for helpful advice on the development of R scripts. Olivier Hamant (ENS, Lyon) and Marie-Theres Hauser are thanked for critical reading of the manuscript. Tou Cheu Xiong is thanked for providing the G5A Ca²⁺ reporter line. This work was supported by the French National Agency for Research (ANR) grants “Wallintegrity”, “GrowPec” and “Pectosign” to HH and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) grant BIO2012-32910 to Antonio Molina (CBGP, UPM-INIA). V.G.D. is an Advanced Postdoc Fellow from Swiss National Science Foundation. L.B. is a recipient of a FPI (BES-2013-065010) and short-stage (EEBB-I-16-10710) fellowship from MINECO. The authors benefited from the IJPB “Plant Observatory” facilities.

Author Contributions

M.G., T.D., M.M., L.B., I.D.S. and H.H. designed experiments. M.G., T.D., M.M., L.B., R.S., J.R., R.S., K.H., F.M., S.V., B.L., E.M., V.G.D. and B.V.C. performed experiments. M.G., T.D., M.M., I.D.S. and H.H. analysed data. H.H. wrote the manuscript.

Declaration of Interests

The authors declare no competing interests

References

1. Wolf, S., and Hofte, H. (2014). Growth Control: A Saga of Cell Walls, ROS, and Peptide Receptors. *Plant Cell* 26, 1848–1856. Available at: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.114.125518>.
2. Haruta, M., Sabat, G., Stecker, K., Minkoff, B.B., and Sussman, M.R. (2014). A Peptide Hormone and Its Receptor Protein Kinase Regulate Plant Cell Expansion. *Science*. 343, 408–411.
3. Stegmann, M., Monaghan, J., Smakowska-Luzan, E., Rovenich, H., Lehner, A., Holton, N., Belkhadir, Y., and Zipfel, C. (2017). The receptor kinase FER is a RALF-

- regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science* (80-.). 355, 287–289. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28104890>.
4. Ge, Z., Bergonci, T., Zhao, Y., Zou, Y., Du, S., Liu, M.C., Luo, X., Ruan, H., García-Valencia, L.E., Zhong, S., *et al.* (2017). Arabidopsis pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling. *Science* (80-.). 358, 1596–1600.
 5. Campbell, L., and Turner, S.R. (2017). A Comprehensive Analysis of RALF Proteins in Green Plants Suggests There Are Two Distinct Functional Groups. *Front. Plant Sci.* 8, article 37.
 6. Murphy, E., and De Smet, I. (2014). Understanding the RALF family: a tale of many species. *Trends Plant Sci* 19, 664–671. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24999241>.
 7. Hématy, K., Sado, P.-E.E., Van Tuinen, A., Rochange, S., Desnos, T., Balzergue, S., Pelletier, S., Renou, J.-P.P., Höfte, H., Hematy, K., *et al.* (2007). A receptor-like kinase mediates the response of Arabidopsis cells to the inhibition of cellulose synthesis. *Curr Biol* 17, 922–931. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17540573.
 8. Merz, D., Richter, J., Gonneau, M., Sanchez-Rodriguez, C., Eder, T., Sormani, R., Martin, M., Hématy, K., Hofte, H., and Hauser, M.T. (2017). T-DNA alleles of the receptor kinase THESEUS1 with opposing effects on well wall integrity signaling. *J. Exp. Bot.* 68, 4583–4593.
 9. Murphy, E., Vu, L.D., Van den Broeck, L., Lin, Z., Ramakrishna, P., van de Cotte, B., Gaudinier, A., Goh, T., Slane, D., Beeckman, T., *et al.* (2016). RALFL34 regulates formative cell divisions in Arabidopsis pericycle during lateral root initiation. *J Exp Bot* 67, 4863–4875. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27521602>.
 10. Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H.M., Duhr, S., Baaske, P., and Breitsprecher, D. (2014). MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J. Mol. Struct.* 1077, 101–113.
 11. Hématy, K., Sado, P.E., Van Tuinen, A., Rochange, S., Desnos, T., Balzergue, S., Pelletier, S., Renou, J.P., and Höfte, H. (2007). A Receptor-like Kinase Mediates the Response of Arabidopsis Cells to the Inhibition of Cellulose Synthesis. *Curr. Biol.* 17, 922–931.
 12. Baunsgaard, L., Fuglsang, A.T., Jahn, T., Korthout, H.A.A.J., De Boer, A.H., and Palmgren, M.G. (1998). The 14-3-3 proteins associate with the plant plasma membrane

- H⁺-atpase to generate a fusicoccin binding complex and a fusicoccin responsive system. *Plant J.* *13*, 661–671.
13. Turing, a. M. (1990). The chemical basis of morphogenesis. 1953. *Bull. Math. Biol.* *52*, 153-97–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2185858>.
 14. Ge, Z., Bergonci, T., Zao, Y., Zou, Y., Du, S., Liu, M.-C., Luo, X., Ruan, H., Garcia-Valencia, L.E., Zhong, S., *et al.* (2017). Arabidopsis pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling. *Science.* *10.1126/sc.*
 15. Roycewicz, P.S., and Malamy, J.E. (2014). Cell wall properties play an important role in the emergence of lateral root primordia from the parent root. *J. Exp. Bot.* *65*, 2057–2069.
 16. Kumpf, R.P., Shi, C.L., Larrieu, A., Sto, I.M., Butenko, M.A., Peret, B., Riiser, E.S., Bennett, M.J., and Aalen, R.B. (2013). Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5235–5240. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479623>.
 17. Morato do Canto, A., Ceciliato, P.H., Ribeiro, B., Ortiz Morea, F.A., Franco Garcia, A.A., Silva-Filho, M.C., and Moura, D.S. (2014). Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: Implications for their perception and function in Arabidopsis. *Plant Physiol. Biochem.* *75*, 45–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24368323>.
 18. Xiong, T.C., Ronzier, E., Sanchez, F., Corratge-Faillie, C., Mazars, C., and Thibaud, J.B. (2014). Imaging long distance propagating calcium signals in intact plant leaves with the BRET-based GFP-aequorin reporter. *Front. Plant Sci.* *5*, 43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24600459>.
 19. Dressano, K., Ceciliato, P.H.O., Silva, A.L., Guerrero-Abad, J.C., Bergonci, T., Ortiz-Morea, F.A., Bürger, M., Silva-Filho, M.C., and Moura, D.S. (2017). BAK1 is involved in AtRALF1-induced inhibition of root cell expansion. *PLoS Genet.* *13*.
 20. Guo, H., Li, L., Ye, H., Yu, X., Algreen, A., and Yin, Y. (2009). Three related receptor-like kinases are required for optimal cell elongation in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 7648–7653. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19383785>.
 21. Mecchia, M.A., Santos-Fernandez, G., Duss, N.N., Somoza, S.C., Boisson-Dernier, A., Gagliardini, V., Martínez-Bernardini, A., Fabrice, T.N., Ringli, C., Muschietti, J.P., *et al.* (2017). RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube

- growth in Arabidopsis. *Science* (80-.). 358, 1600–1603.
22. Qu, S., Zhang, X., Song, Y., Lin, J., Shan, J., and Shan, X. (2017). THESEUS1 positively modulates plant defense responses against *Botrytis cinerea* through GUANINE EXCHANGE FACTOR4 signaling. *J. Integr. Plant Biol.* *in press*, 797–804.
 23. Van der Does, D., Boutrot, F., Engelsdorf, T., Rhodes, J., McKenna, J.F., Vernhettes, S., Koevoets, I., Tintor, N., Veerabagu, M., Miedes, E., *et al.* (2017). The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase MIK2/LRR-KISS connects cell wall integrity sensing, root growth and response to abiotic and biotic stresses. *PLoS Genet.* 13.
 24. Denness, L., McKenna, J.F., Segonzac, C., Wormit, A., Madhou, P., Bennett, M., Mansfield, J., Zipfel, C., and Hamann, T. (2011). Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in Arabidopsis. *Plant Physiol* 156, 1364–1374. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546454>.
 25. Feng, W., Kita, D., Peaucelle, A., Cartwright, H.N., Doan, V., Duan, Q., Liu, M.C., Maman, J., Steinhorst, L., Schmitz-Thom, I., *et al.* (2018). The FERONIA Receptor Kinase Maintains Cell-Wall Integrity during Salt Stress through Ca²⁺ Signaling. *Curr. Biol.* 28, 666–675.e5.
 26. Engelsdorf, T., Gigli-Bisceglia, N., Veerabagu, M., McKenna, J.F., Augstein, F., Does, D. van der, Zipfel, C., and Hamann, T. (2017). Pattern-Triggered Immunity And Cell Wall Integrity Maintenance Jointly Modulate Plant Stress Responses. *bioRxiv*, 130013. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/early/2017/06/26/130013>.
 27. Duan, Q., Kita, D., Li, C., Cheung, A.Y., and Wu, H.M. (2010). FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17821–17826. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20876100.
 28. Karimi, M., Inze, D., Van Lijsebettens, M., and Hilson, P. (2013). Gateway vectors for transformation of cereals. *Trends Plant Sci.* 18, 1–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23121806>.
 29. Bechtold, N., and Pelletier, G. (1998). In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* 82, 259–266.
 30. Schneider, C., Rasband, W., and Eliceiri, K. (2012). ImageJ. *Nat. Methods* 9, 671–675.

31. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., *et al.* (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
32. Malamy, J.E., and Benfey, P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 33–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006065>.
33. Toufighi, K., Brady, S.M., Austin, R., Ly, E., and Provart, N.J. (2005). The botany array resource: e-Northern, expression angling, and promoter analyses. *Plant J.* 43, 153–163.
34. Bacete, L., Mérida, H., Pattathil, S., Hahn, M.G., Molina, A., and Miedes, E. (2017). Characterization of Plant Cell Wall Damage-Associated Molecular Patterns Regulating Immune Responses. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), pp. 13–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28220412> http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6859-6_2.
35. Berger, I., Fitzgerald, D.J., and Richmond, T.J. (2004). Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nat Biotechnol.* 22, 1583-7. Available at <https://www.nature.com/articles/nbt1036>

Legends to figures

Figure 1 (See also Figure S1): **THE1 is a RALF34 receptor.** (A): Domain organisation of THE1 and mutant alleles used in this study. (B,C): Root length, as a percentage of the mock-treated control, in function of RALF34 (B) or RALF1 (C) concentration (error bars = SD, $n \geq 10$, repeated 3x with comparable results, **: Unpaired Student t-test, $P < 0.01$). (D): Binding affinity between fluorescently-labeled ecto-THE1/ecto-THE1m and RALF34/RALF1 by MST analysis; K_d values are as indicated, $\Delta F_{\text{norm}[0/00]}$: baseline corrected normalized fluorescence. S/N above a cut-off of 5 are considered significant (ecto-THE1/RALF34 : S/N = 24.5, ecto-THE1m/RALF34 : S/N = 19.2 and ecto-THE1/RALF1 : S/N = 1.92). (F,G): RALF34(F)- or RALF1(G)-induced alkalinisation of the growth medium: time course of the pH of the growth medium of WT(Col-0) and *the1-6* seedlings, after mock, RALF34 or RALF1 treatment (error bars = SD, $n \geq 4$, **: Unpaired Student t-test, $P \leq 0.01$). (H,I): RALF34(H)- and RALF1(I)-induced transient increase in cytosolic Ca^{2+} , monitored with BRET-based sensor G5A in WT and *the1-1* background (error bars = SE, $n=4$).

Figure 2 (See also Figure S2): **Stage I lateral root initiation is affected when THE1 or RALF34 levels are altered.** (A): Representative picture of typical stage 1 lateral root primordium (image from wild type Col-0) with a core of 4 small cells (black arrowheads), generated by anticlinal asymmetric cell divisions, flanked by 2 large cells (white arrowheads). (B-C): Representative pictures of atypical “stage 1” primordium with extra small cells (black arrowheads) [images from *RALF34-1* (B) and *the1-6* (C)]. (D): Quantification of stage 1 and atypical “stage 1” lateral root primordia in indicated lines as percentage of the total number of counted lateral root primordia and lateral roots. *: statistically significant (compared to Col-0) for $p < 0.05$ according to Student’s t-test (data for Stage 1 and “Stage 1” were combined for error bars and Student’s t-test). Error bars reflect standard error. (E-G): Positioning of lateral roots is affected when *THE1* or *RALF34* levels are altered. For the following lines, it is indicated between brackets: the % of seedlings with (i) at least 3 events of closely spaced LR and (ii) a more mature lateral root (primordium) flanked by a stage 1 or 2 lateral root primordium on either side, respectively: Col-0 (13, 21%), *RALF34-1* (0, 0%), *the1-1* (21, 21%), *the1-4* (33, 58%), *the1-6* (0, 8%), *35S::THE1:GFP* (9, 45%), *35S::RALF34 3.1.1* (0, 33%), *35S::RALF34 7.4.1* (13, 27%), and *35S::RALF34 6.1.1* (75, 42%). (E): Representative picture of regular spacing of lateral roots (image from wild type Col-0). (F-G): Representative pictures of unusual position of lateral root and lateral root initiation sites close

to another one (asterisk indicates lateral root or lateral root initiation site) (images from *the1-4* and *35S::RALF34 6.1.1*). For the above analyses (A-G), the following numbers of seedling roots (8 days after germination) were analysed: Col-0 (24, from 2 independent experiments), *RALF34-1* (8), *the1-1* (24, from 2 independent experiments), *the1-4* (12), *the1-6* (12), *35S::THE1:GFP* (11), *35S::RALF34 3.1.1* (12), *35S::RALF34 7.4.1* (15), and *35S::RALF34 6.1.1* (12). (H): Localisation in the root of 6-7 day-old seedlings of *pTHE1::N:3xVENUS* (green, left) and *pRALF34::N:3xRFP* (red, right). Position of the Z-stack relative to a transverse section of the root is shown in scheme above. ep: epidermis, cc: central cylinder.

Figure 3 (See also Figure S3): Interaction between THE1 and FER signaling: (A): RALF34-induced gene expression requires both THE1 and FER. Q-RT-PCR quantification of transcript levels of reporter genes *WRKY40* (upper panel) and *XBAT34* (lower panel) in light grown seedlings. Log₁₀ of transcript levels. Boxplot (**: Wilcoxon test, P-value < 0.01 and *** : P-value < 0.001, n = 3 biological repeats x 3 technical repeats). (B): RALF34 (upper)- and RALF1 (lower)-induced cytosolic Ca²⁺ responses in seedlings 10 min after pretreatment with Mock (black), RALF34 (blue) or RALF1 (red).

Figure 4 (See also Figure S4): The role of THE1 and RALF34 in cell wall integrity signalling. (A-B): *At2g26530* promoter-luciferase reporter gene expression in WT, *the1-1* and *the1-4* hypocotyls. (A): Example of a photograph of 4-day-old dark-grown seedlings (left panels) and visualisation of the luciferase light signal (right panels). (B): Quantification of the luminescence signal in the hypocotyl after 3h treatment, Unpaired Student t-test: ***: P < 10⁻⁹, **: P = 10⁻⁴ (n = 6 repeats (Mock and Isoxaben (Isox)) or 3 repeats of ≥20 seedlings (other treatments)). (C-F): Q-RT-PCR quantification of *WRKY40* (C,E) and *the4* (D,F) transcript levels in seedlings treated with RALF1, RALF34 or cellulose synthesis inhibitor isoxaben (Isox): time course of response (C,D) and response to 3h Mock or isoxaben treatment in indicated mutants (E,F). **: Wilcoxon test: P < 0.01 (n = 3 biological x 3 technical repeats)

STAR Methods

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Herman Höfte (hermanus.hofte@inra.fr)

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Arabidopsis thaliana WT Col0, *the1-1* [11], *the1-4* [20], *the1-6* [8], *fer-4* [27] were as described. The $P_{At2g26530}::LUC$ construct was made by inserting a 1127 bp DNA fragment upstream the initiation codon of *At2g26530* gene into the pHGWL7 vector [28] Col0 plants were transformed by the floral dip method [29] and hygromycin-resistant plants containing the transgene were selected in the progeny. Lines responding to MeJA or NaCl (conditions that induce the transgene based on microarray data) were selected and introgressed into *the1-1* and *the1-4*. To generate $35S::RALF34$, we cloned the RALF34 CDS into pEG100 with Basta resistance. Synthetic RALF peptides (see Key Resources Table) were provided by ProteoGenix, Schiltigheim, France (<https://www.proteogenix.science/fr/>)

METHOD DETAILS

Plant growth conditions

Culture medium and growth conditions of seedlings on solid medium and adult plants in the greenhouse were as described [11]. To measure root growth responses to RALF peptides, seeds were grown on ½ x MS media plates positioned vertically for two days under constant light at 23°C. Seedlings were aseptically transferred to 500 µL ½ x MS liquid media supplemented or not with RALF peptides and/or 1µM fusicoccin in a 24-well cluster plate (Falcon 3047®) and incubated at 24°C with mild shaking. Seedlings were recovered after 24 – 48 hr incubation and their images were captured by an office scanner (Epson) or a camera on a dissecting microscope and analysed using ImageJ.

Confocal microscopy

For the analysis of $pRALF34::n:3xmCherry$ and $pTHE1::n:3xVENUS$ in Figure 2H, we observed 6-to-7-day-old light-grown roots. Images were collected using a Leica TCS SP8 upright confocal microscope. Images were acquired with a HC PL APO CS2 40x/1.30 oil objective with the following parameters: image dimension (512 x 512), scanning speed (400Hz), line average (2 to 3), pinhole (1 airy unit), optical section (1.039 µm). cpVENUS was excited with a 514 nm diode laser line and mCherry with a 561 diode laser line. Fluorescence emission was collected with a 529 to 550 photomultiplier (PMT) setting for cpVENUS and a 602 to 630 PMT for mCherry. Laser power and gain settings for each PMT were slightly adjusted individually for each sample. Images were collected in 8-bits per pixel. Frame size of the image was ~ 250 µm. Images were processed using Fiji software [30][31]. Z-stacks were acquired in order to determine the location of the labeled nuclei in the root tissues. All optical sections in the center of the root in Z, i.e. all tissues besides the epidermal cell layer on the upper and lower parts of the stack (Figure 2H), were

projected onto a single image by applying a maximum intensity Z-projection with the Z project function in Fiji. For the graphs of Figure S2, we observed 3-to-4day-old dark-grown hypocotyls. A Region Of Interest (ROI) was manually defined on each image to number the nuclei in the center of the optical section in the hypocotyl or the lateral part which corresponds to the epidermal cells.

Microscopy of lateral root initiation

Col-0, *ralf34-1* [9], *the1-1*, *the1-4* and *the1-6* [8] were grown vertically on ½ x MS plates under constant light. Root clearing was performed as described [32] 8 days after germination and observations were done as described [9]. We quantified lateral root spacing as follows: % calculated as the % of seedlings with at least 3 events of closely spaced LR. We defined closely spaced as primordia within ~1.1 mm of each other.

Ectopic lignin quantification

6-day-old seedlings cultivated on half-strength MS medium with 1% sucrose were incubated for 16 h with 600nM isoxaben, and fixed with (3:1) 95% ethanol to glacial acetic acid under brief vacuum, and then incubated at RT for several hours until tissues appeared translucent. The fixative solution was then exchanged for water. The seedlings were mounted in a phloroglucino-HCl solution (VWR) 5 min prior to be photographed. The stained areas in the root tips were measured using ImageJ software.

Co-expression analysis

AGI from CrRLK1L and RALF families were retrieved from TAIR and their co-expression analysed with the Expression Browser from BAR Toronto (<http://www.bar.utoronto.ca/>) [33] using the AtgenExpress_Plus Extended Tissue Series microarray datasets (only RALF genes present on the ATH1 chip are displayed).

Luciferase assays

Seeds were sown in 24 well plates containing 500 μ l ½ x MS liquid medium and incubated at 23°C with mild shaking in the dark. After 4 days of growth, 2 μ M RALF and/or 100 nM isoxaben were added to the medium. After 4 hours of treatment, seedlings were sprayed with a solution of 5 mM D-Luciferin, 0.1% Triton X100. Images were acquired by a LAS-4000 CCD camera (Fujifilm) and quantified by ImageJ.

Cytosolic Ca²⁺ assays

Cytosolic calcium (Ca²⁺) measurements were performed using transgenic Col0 or *the1-1* seedlings overexpressing the BRET-based GFP-aequorin Ca²⁺ reporter G5A [S12] using a coelenterazine-based method as described [34]. A TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies) was used to follow luminescence emission during 20 minutes after dispensing 2 μ M of corresponding RALF peptides or mock treatment using a multi-channel pipette. To select appropriate *the1-1* G5A sensor

lines, seven F₃ lines from *the1-1* x Col0 G5A crosses were analysed: 1M CaCl₂ was added to the wells and luminescence was recorded for 2 minutes using a Varioskan LUX Reader (Thermo Scientific), which allows rapid well-by-well injection. One line showing luminescence responses comparable to that of G5A in a WT background was selected (Figure S1B).

Proton secretion assay

Seedlings were vertically grown for five days on ½ x MS plates, 1% sucrose, 0,5% phytigel in continuous light at 23°C. Seedlings were transferred to a microwell containing 200 µL ¼ x MS salts, 1% sucrose, pH6.6, and a pH indicator, fluorescein-Dextran conjugate (MW, 10,000, Sigma, 30 ug/mL). The reaction was terminated at selected time points by removing seedlings from wells, and fluorescent intensity (excitation at 485 nm, emission 518 nm,) of the medium was recorded with a microplate reader (Fluoroscan ascent, Thermo). A standard curve for pH was obtained for each time point and calculated using the same medium adjusted to various pH levels.

Q-RT-PCR assays

Sterilised seeds were added to 24 well plates (20/30/plate) in 500µl of ½ x MS medium + 1% sucrose, two wells per genotype (mock and RALF treatment) and stratified by incubating for 3 days at 4°C in the dark. Plates were transferred to culture room at 23°C, 200µM/m²s white light and incubated under gentle agitation for 4 days after which culture medium was removed and replaced with the same medium supplemented with mock, 4µM RALF peptides or for the indicated time. After removal of the medium, seedlings were quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. RNA was extracted using Qiagen RNAeasy kit (Qiagen, Paris, France). Integrity of the RNAs was verified by electrophoresis. 2 µg of RNA was treated with RNA-free DNase and used for RT-PCR using the the RevertAid H using ingredients from ThermoFisher (Villebon-sur-Yvette, France). 10 ng of RNA was used for q-PCR. 3 technical repeats for each primer pair and 3 biological repeats for each sample. Transcript levels were calculated relative to the reference (ref) gene UBI4 according to the formula

$$E^{*2^{(Cq \text{ target} - Cq \text{ ref})}}$$

Gene transcript levels were expressed relative to the mock treatment of the WT control. *RALF34* expression in 3 independent *35S::RALF34* lines (Figure S1F) was detected through qRT-PCR in roots of 12 day old homozygous T3 seedlings using control genes *ACTIN* and *EEF1a4*.

Primers used for qRT-PCR:

WRKY40 (ACAAGACCGAAGCTTCTGACA and AGCTCTTGGAGATGGATTGTCT),

XBAT34 (GGGACTCCTCTGCACCATG and AGCAACCTCGAGAGCTGTC),

UBI4 (TGACACCATCGACAACGTGA and GAGGGTGGACTCCTTCTGGA),

RALF34 (Figure S4A) (AGGACATGGCACTCTATTTCG and TTCGAAGTTACGGAGGAAGA), *RALF34* (Figure S2F) (TGGCAGCTTCGTCTCTCAA and TGGAGAGAAATGAAAGTGAGAAGAG),

ACTIN (GGCTCCTCTTAACCCAAAGGC and CACACCATCACCAGAATCCAGC) and

EEF1a4 (CTGGAGGTTTTGAGGCTGGTAT and CCAAGGGTGAAAGCAAGAAGA)

Sf21 insect cells expression and purification of ecto-THE-6His

The extracellular domain of THE (ecto-THE-6xHis) and the mutant version THE1G37D (ecto-THE1m), corresponding to the inactive the1-1 allele, were expressed in *Spodoptera frugiperda* Sf21 insect cells using the Bac-to-Bac® HBM TOPO® Secreted Expression System (Invitrogen™). The sequence of the ecto-THE1 (amino-acid 28 to 415), codon-optimized for insect cells, was cloned in pFastBac™/HBM-TOPO® donor plasmid and transformed in competent EMBAZY *E coli* cells [35]. The purified recombinant bacmid was then transfected using XtremeGENE (ROCHE) reagent in Sf21 cells. The V1 recombinant baculovirus stocks were used to infect insect cells. For protein expression and secretion the Sf21 cells were grown at 27 °C in the absence of serum. The cell culture medium was collected by centrifugation at 500 g for 10 min, after 4 days of culture. The supernatant was adjusted to pH 7.4 with PBS, 5% glycerol, 5 mM DTT, 5 mM imidazole and cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche) before purification using the cComplete His-Tag Purification Resin (Roche). After extensive washings with PBS pH 7.4, 5% glycerol, 5 mM DTT, 20 mM imidazole, the recombinant proteins were eluted with 200 mM imidazole. Protein purification was monitored by SDS-PAGE using NuPAGE™ 10 % Bis-Tris protein gels run in MOPS buffer and western blotting with Anti-His6-Peroxidase (Sigma-Aldrich) and ecto-THE specific polyclonal antibodies and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Sigma-Aldrich). Molecular weight markers: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific. A broad band centered around 70 kDa was observed on SDS-PAGE (Figure S1C). The larger size than that predicted from the 420 amino acid sequence (~46 kDa) is possibly due to extensive glycosylation (ecto-THE1 has 16 predicted N-linked glycosylation sites). Images of the blots were acquired using the Clarity™ Western ECL Blotting Substrates (Bio-Rad) and the ImageQuant LAS 4000 detection system (Amersham Biosciences). Protein content of the purified fractions was quantified using the Thermo Scientific Pierce Micro BCA Protein Assay Kit.

Microscale Thermophoresis (MST) Binding Assays

Molecular interactions between purified ecto-THE-6xHis or ecto-THE1the1-1-6xHis (here referred to as ecto-THE1 and ecto-THE1m respectively) and RALF peptides were studied using MST. ecto-THE and ecto-THE1m, purified from insect cells, were labeled with the dye NT-647 Red-NHS (amine reactive) from NanoTemper, (Munich, Germany) according to the manufacturer's guidelines. The labeled protein was solubilized in MST buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.05 % Tween-20) and centrifuged at 10 000 g for 2 min at 4°C.

For MST assays, a constant concentration of labeled ecto-THE1 in the range of 20 nM was titrated with increasing concentrations of RALF peptides. Mixtures of ecto-THE1/ecto-THE1m and RALF peptides were loaded into Monolith™ NT.115 MST Premium Coated Capillaries-NanoTemper, and incubated for 20 min at room temperature. Thermophoresis analyses were then performed with Monolith NT.115 (NanoTemper) at medium MST power and LED excitation power of 60% for ecto-THE1 and 40% for ecto-THE1m for fluorescence acquisitions. The data were then treated with MO.Affinity analysis v2.2.4 NT software (NanoTemper) to determine the interaction parameters. Signal-to-noise (S/N) ratios above 5 are considered significant as recommended by NanoTemper. Mean binding curves from minimum 3 independent MST measurements are shown; error bars are Mean Square Error (Affinity AnalysisSoftware, V2.2.4).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Number of repeats (n), sample sizes are given for each experiment in the figure legends. Statistical comparisons (Student's t-test and Wilcoxon test) were conducted with R software.

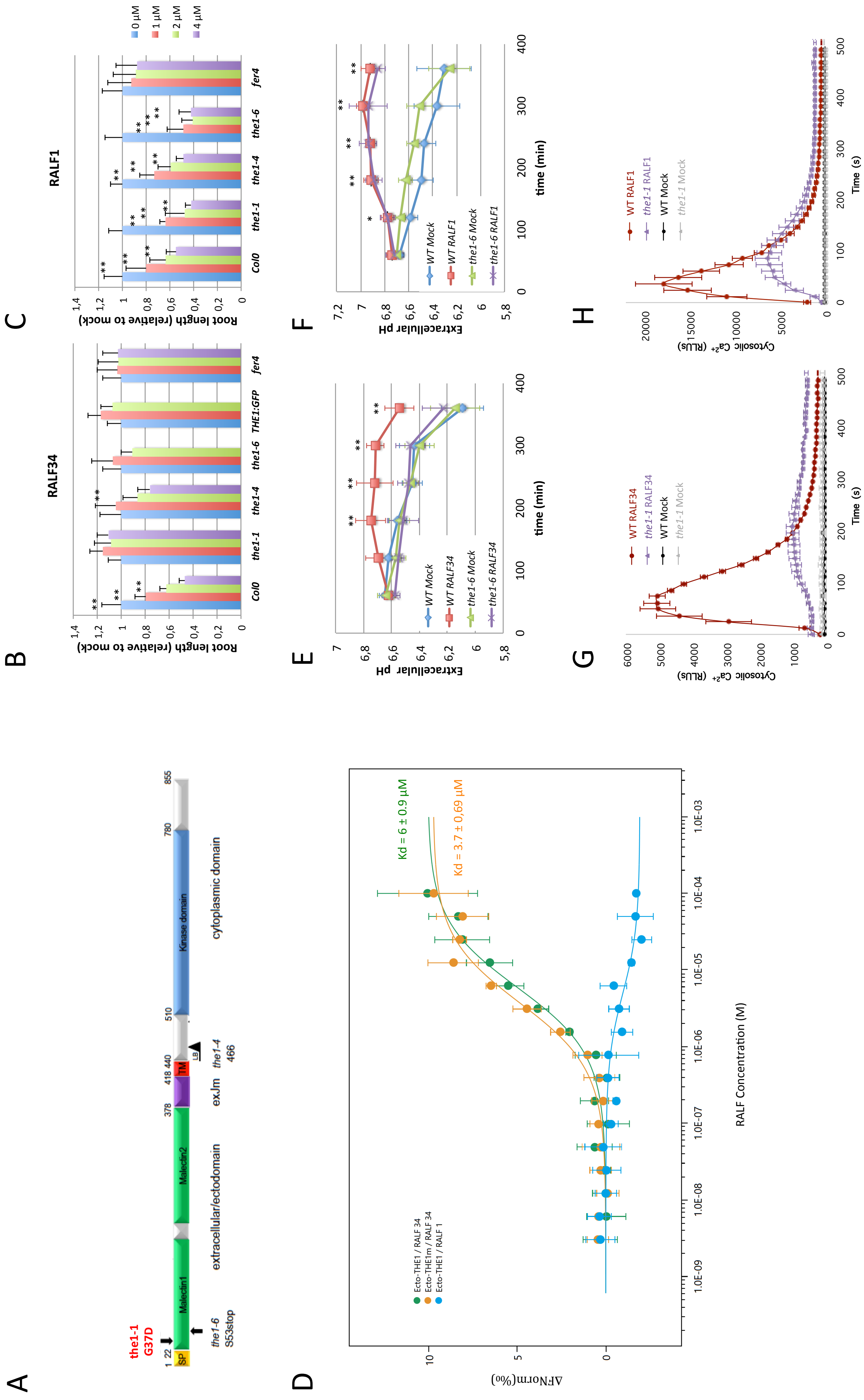


Figure 1 (See also Figure S1): **THE1** is a **RALF34** receptor. **(A)**: Domain organization of THE1 and mutant alleles used in this study. **(B,C)**: Root length, as a percentage of the mock-treated control, in function of RALF34 **(B)** or RALF1 **(C)** concentration (error bars = SD, n \geq 10, repeated 3x with comparable results, **: Unpaired Student t-test, P<0.01). **(D)**: Binding affinity between fluorescently-labeled ecto-THE1/ecto-THE1m and RALF34/RALF1 by MST analysis; Kd values are as indicated, $\Delta F_{norm_{10/001}}$: baseline corrected normalized fluorescence. S/N above a cut-off of 5 are considered significant (ecto-THE1/RALF34 : S/N = 24.5, ecto-THE1m/RALF34 : S/N = 19.2 and ecto-THE1/RALF1 : S/N = 1.92). **(E,F)**: RALF34**(E)**- or RALF1**(F)**-induced alkalisation of the growth medium: time course of the pH of the growth medium of WT(Col0) and *the1-6* seedlings, after mock, RALF34 or RALF1 treatment (error bars = SD, n \geq 4, **: Unpaired Student t-test, P \leq 0.01). **(G,H)**: RALF34**(G)**- and RALF1**(H)**-induced transient increase in cytosolic Ca²⁺, monitored with BRET-based sensor G5A in WT and *the1-1* background (errors bars = SE, n=4).

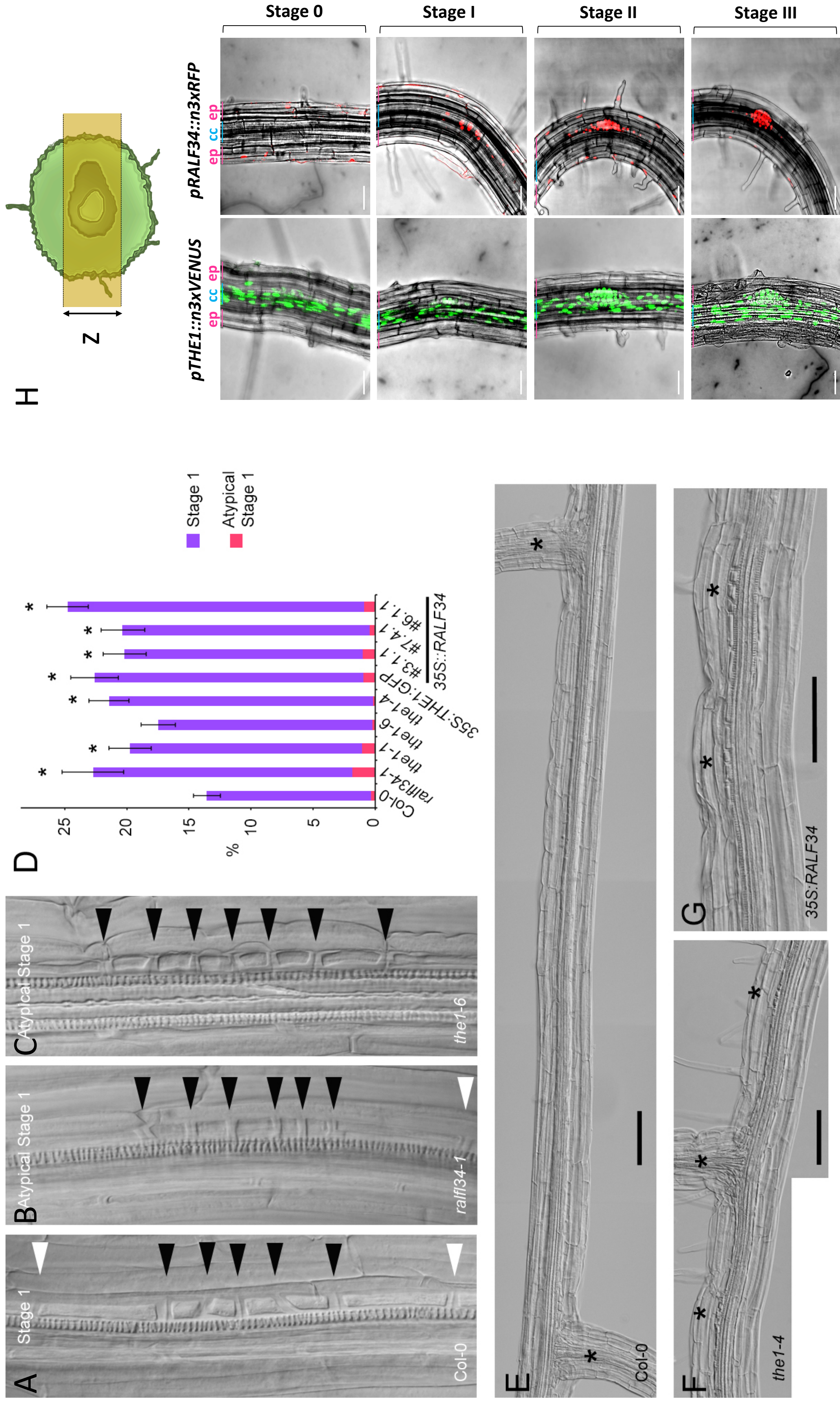


Figure 2 (See also Figure S2): **Stage I lateral root initiation is affected when THE1 or RALF34 levels are altered.** (A): Representative picture of typical stage 1 lateral root primordium (image from wild type Col-0) with a core of 4 small cells (black arrowheads), generated by anticlinal asymmetric cell divisions, flanked by 2 large cells (white arrowheads). (B-C): Representative pictures of atypical "stage 1" primordium with extra small cells (black arrowheads) [images from *rafl34-1* (B) and *the1-6* (C)]. (D): Quantification of stage 1 and atypical "stage 1" lateral root primordia in indicated lines as percentage of the total number of counted lateral root primordia and lateral roots. *, statistically significant (compared to Col-0) for $p < 0.05$ according to Student's t-test (data for Stage 1 and "Stage 1" were combined for error bars and Student's t-test). Error bars reflect standard error. (E-G): Positioning of lateral roots is affected when THE1 or RALF34 levels are altered. For the following lines, it is indicated between brackets: the % of seedlings with (i) at least 3 events of closely spaced LRs and (ii) a more mature lateral root (primordium) flanked by a stage 1 or 2 lateral root primordium on either side, respectively: Col-0 (13, 21%), *rafl34-1* (0, 0%), *the1-1* (21, 21%), *the1-4* (33, 58%), *the1-6* (0, 8%), *35S::THE1:GFP* (9, 45%), *35S::RALF34 3.1.1* (0, 33%), *35S::RALF34 6.1.1* (75, 42%) of lateral roots (image from wild type Col-0) (E). Representative pictures of unusual position of lateral root and lateral root initiation sites close to another one (asterisk indicates lateral root or lateral root initiation site) (F-G): images from *the1-4* and *35S::RALF34 6.1.1*. For the above analyses (A-G), the following number of seedling roots (8 days after germination) were analysed: Col-0 (24, from 2 independent experiments), *rafl34-1* (8), *the1-1* (24, from 2 independent experiments), *the1-4* (12), *35S::THE1:GFP* (11), *35S::RALF34 3.1.1* (12), *35S::RALF34 6.1.1* (12). (H): Localisation in the root of 6-7 day-old seedlings of *pTHE1::N:3xVENUS* (green, left) and *pRALF34::N:3xRFP* (red, right). Position of the Z-stack relative to a transverse section of the root is shown in scheme above, ep: epidermis, cc: central cylinder.

Figure 3 (See also Figure S3): **Interaction between THE1 and FER signaling: (A):** RALF34-induced gene expression requires both THE1 and FER. Q-RT-PCR quantification of transcript levels of reporter genes *WRKY40* (upper panel) and *XBAT34* (lower panel) in light grown seedlings. Log₁₀ of transcript levels. Boxplot (**: Wilcoxon test, P-value < 0.01 and ***: P-value < 0.001, n = 3 biological repeats x 3 technical repeats). **(B):** RALF34 (upper)- and RALF1 (lower)-induced cytosolic Ca²⁺ responses in seedlings 10 min after pretreatment with Mock (black), RALF34 (blue) or RALF1 (red).

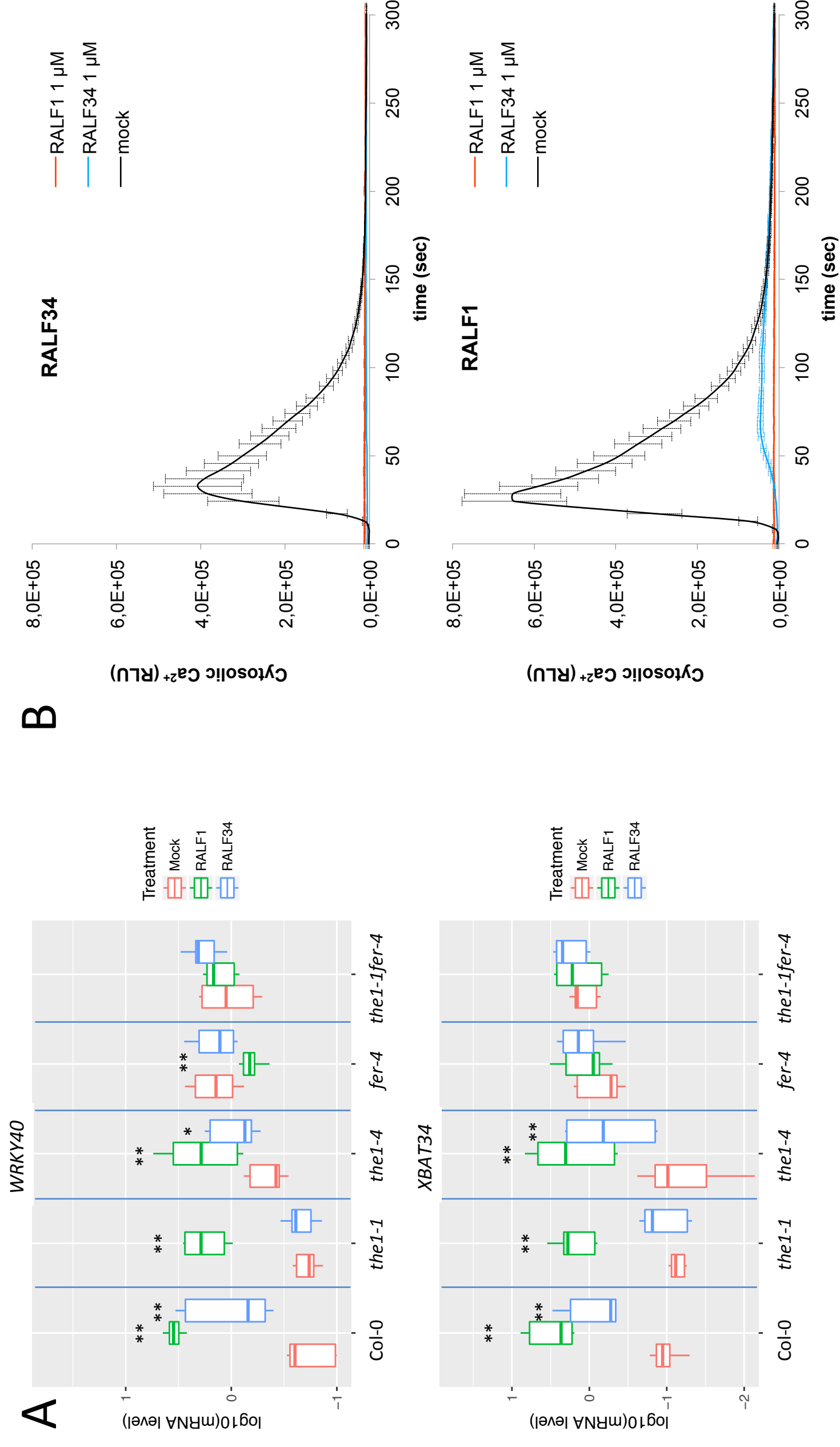


Figure 3

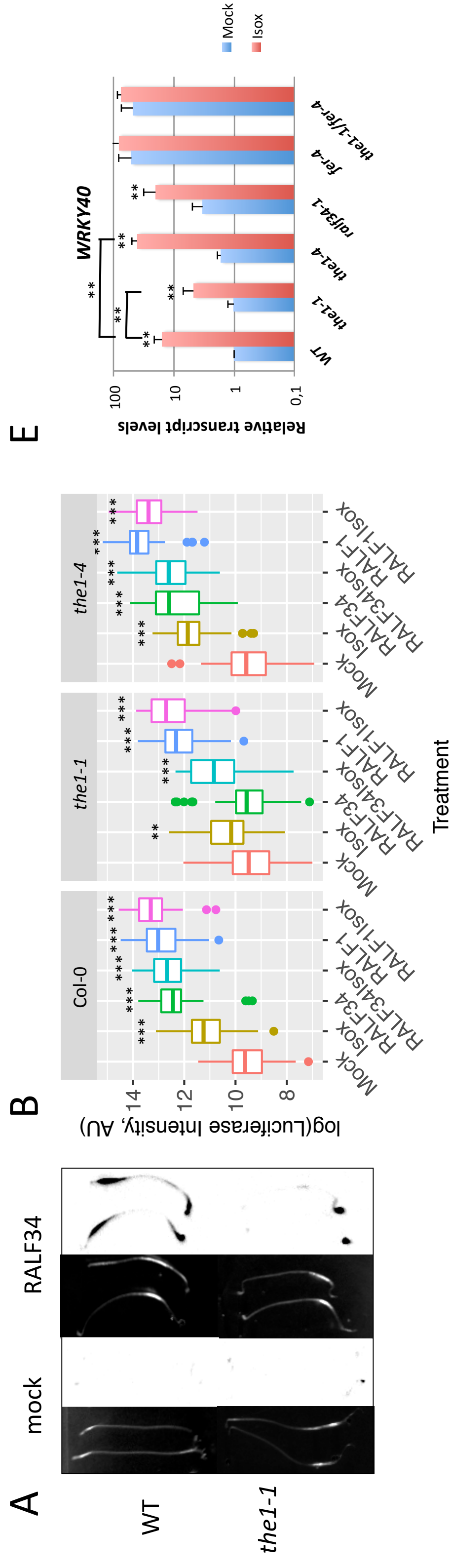
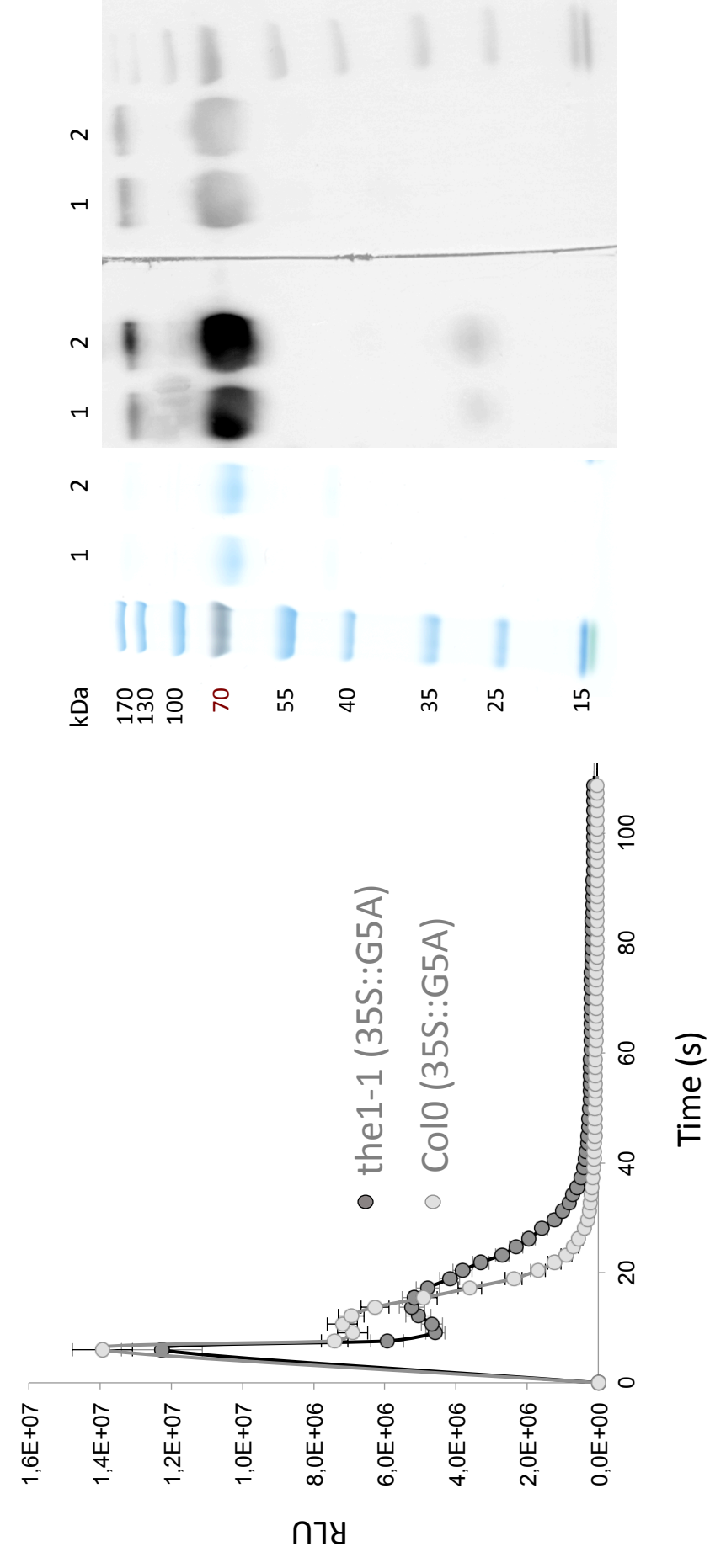
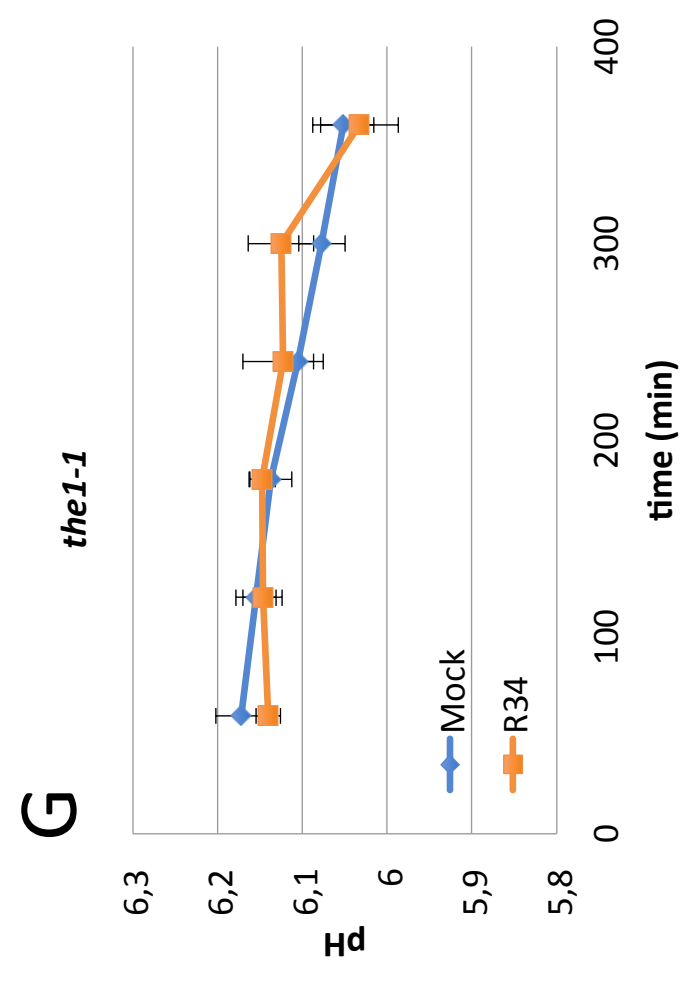
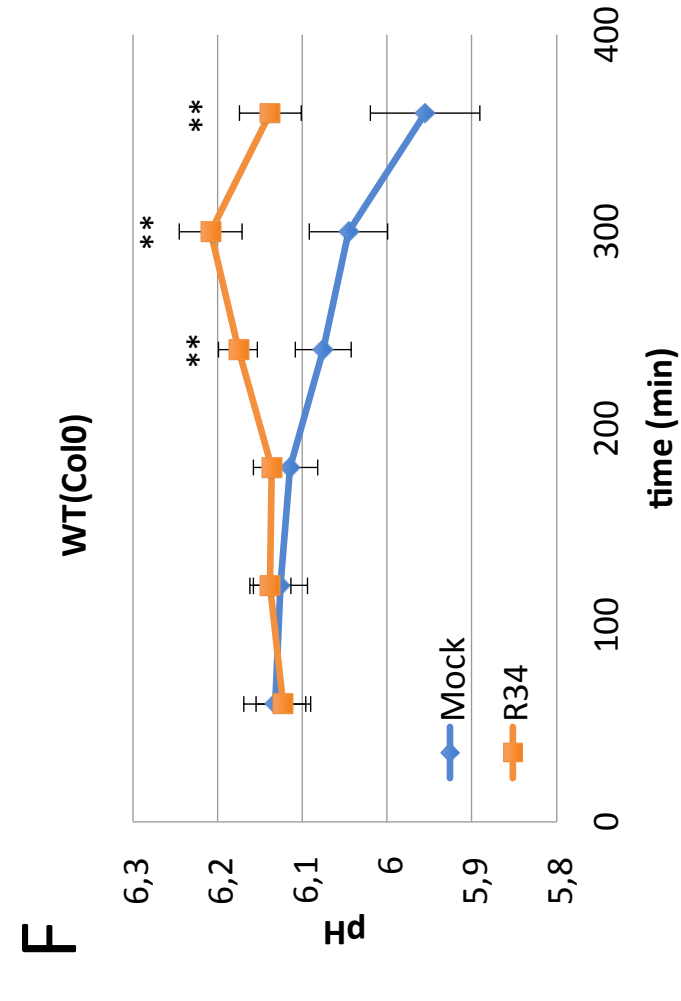
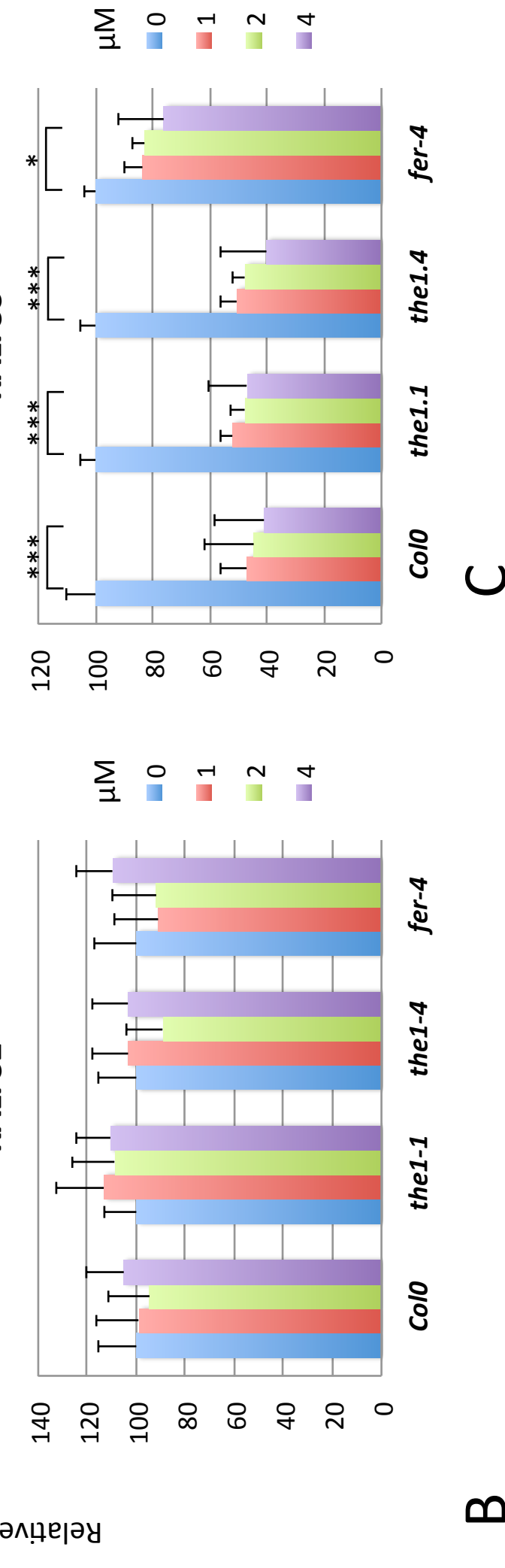
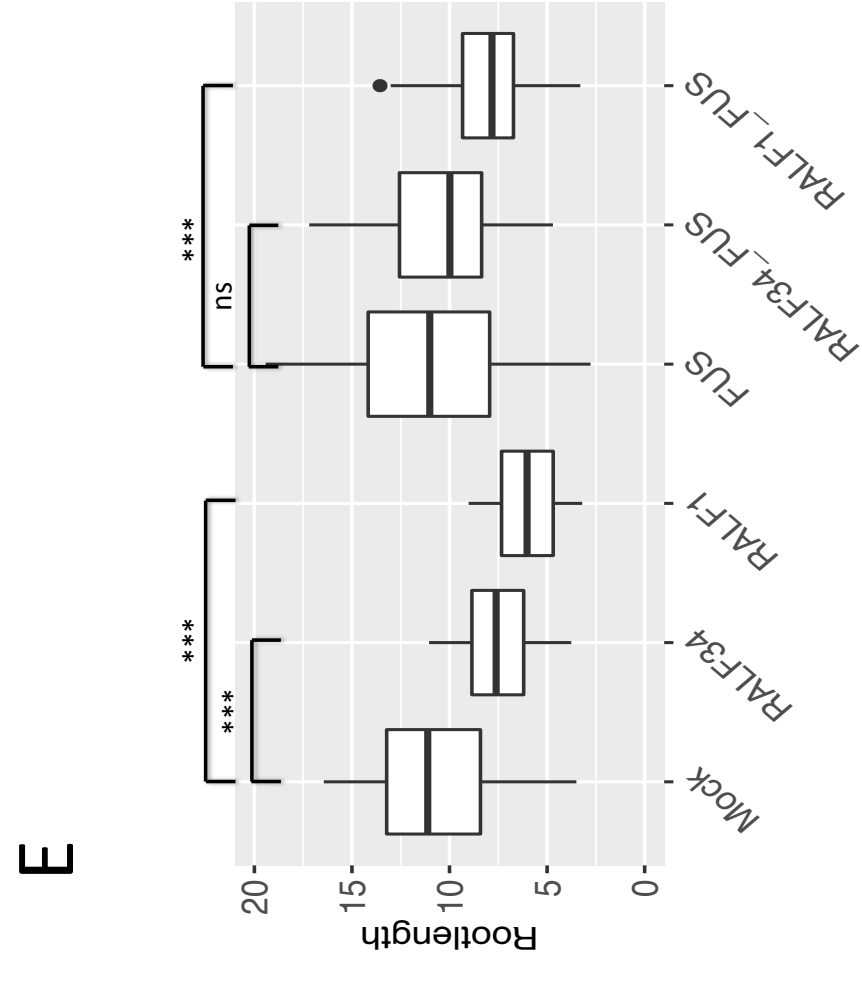
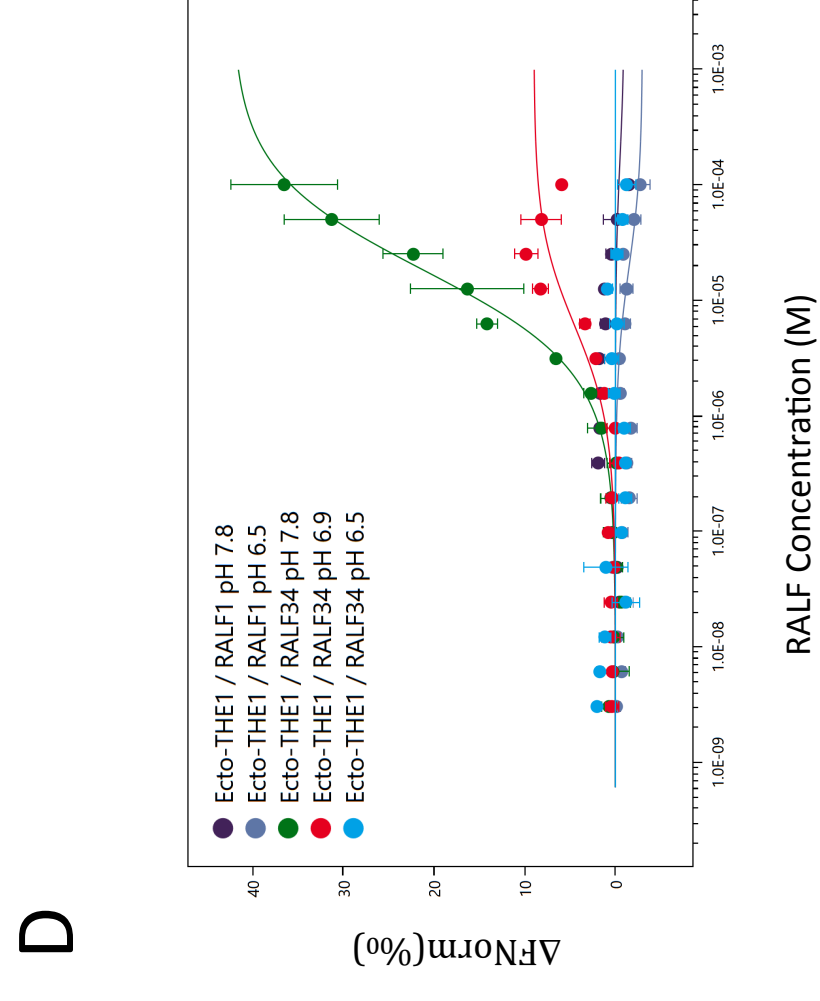
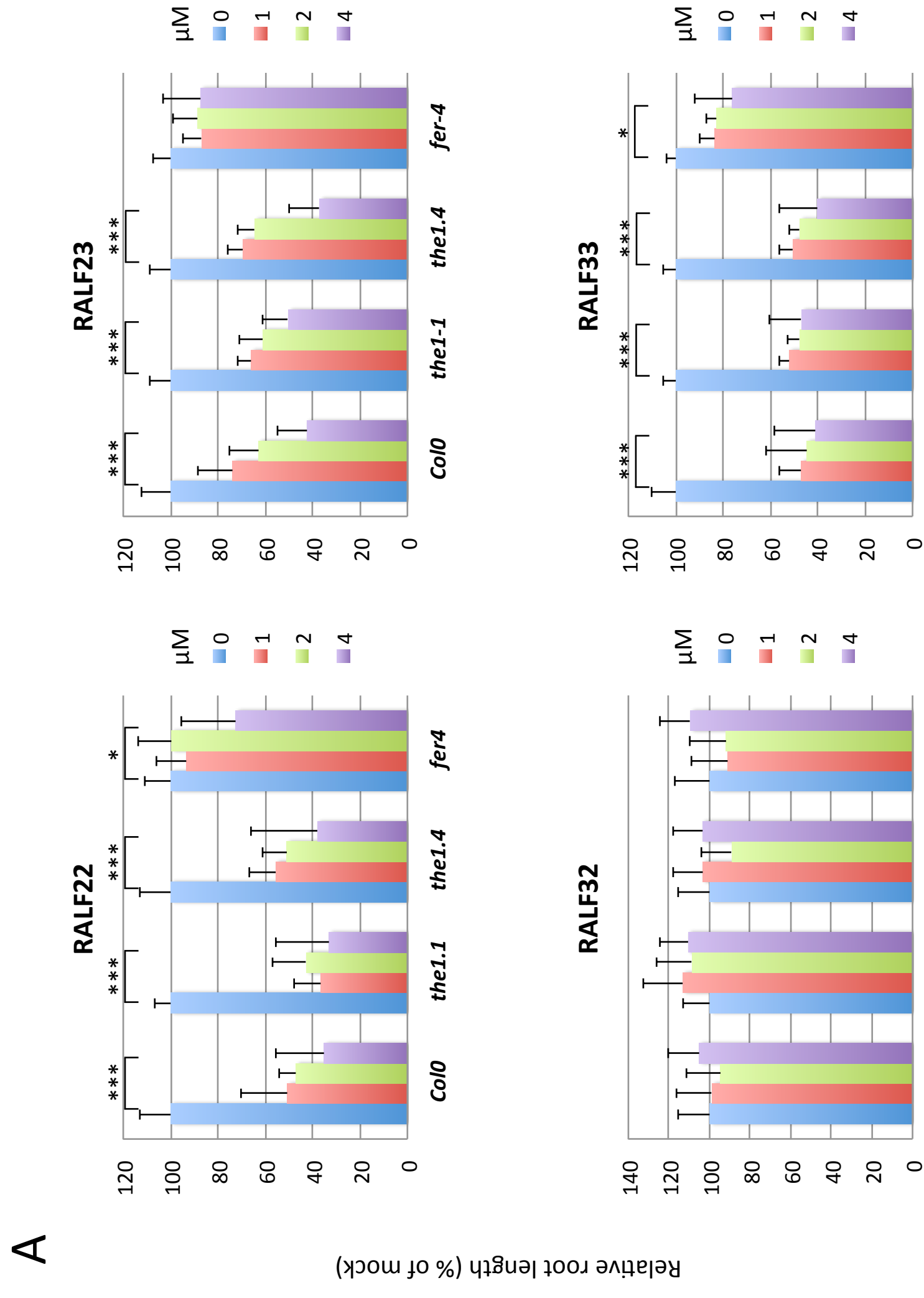


Figure 4 (See also Figure S4): **The role of THE1 and RALF34 in cell wall integrity signaling. (A-B):** *At2g26530* promoter-luciferase reporter gene expression in WT, *the1-1* and *the1-4* hypocotyls. **(A):** Example of a photograph of 4-day-old dark-grown seedlings (left panels) and visualisation of the luciferase light signal (right panels). **(B):** Quantification of the luminescence signal in the hypocotyl after 3h treatment, Unpaired Student t-test: ***: $P < 10^{-9}$, **: $P = 10^{-4}$ (n = 6 repeats (Mock and Isoxaben (Isox)) or 3 repeats of ≥ 20 seedlings (other treatments)). **(C-F):** Q-RT-PCR quantification of *WRKY40* **(C,E)** and *XBAT34* **(D,F)** transcript levels in seedlings treated with RALF1, RALF34 or cellulose synthesis inhibitor isoxaben (Isox) and response of response **(C,D)** and response to 3h Mock or isoxaben treatment in indicated mutants **(E,F)**. Error bars = SD, **: Wilcoxon test: $P < 0.01$ (n = 3 biological x 3 technical repeats)



RALF34 propeptide sequence:

Signal peptide:

MAASSNLLLLLISLLTFISLQRSES

Prodomain:

LSDNPSLTLPLDGFDPISHSDEFDII DGEESFVTEEDDGVTDRRSL

Mature peptide:

YWRRTKYYISYGALSANRVP C P P R S G R S Y Y T H N C F R A R G P V H P Y S R G C S S I T R C R R

Figure S1, related to Figure 1.

(A): Impact of 4 indicated RALF peptides on root growth of WT and mutant (*the1-1*, *the1-4* and *fer-4*) seedlings. **(B):** Control experiment on G5A in WT(Co10) and *the1-1* background in which seedlings are flooded with 1 M CaCl₂, error bars = SD, n≥4, representative experiment of 3 biological repeats. ** and *** are as in Figure 1. **(C):** SDS-PAGE, Coomassie staining and immunoblots with anti-HIS (left panel) and anti-ecto-THE1 (right panel) antibodies. (1) ecto-THE1-6xHis, (2) ecto-THE1m-6xHis secreted in culture medium after Ni-NTA purification. **(D):** Microscale thermophoresis (MST) curves showing RALF34 and RALF1 binding to the THE1 ectodomain at different pH. **(E):** Fusicoccin treatment prevents RALF34- but not RALF1-induced root growth inhibition. Root length of seedlings treated with Fusicoccin (FUS), Mock, combined or not with RALF34 or RALF1. ***: unpaired Student t-test, P values < 10⁻⁷ (n > 65), ns: non-significant. **(F,G):** RALF34-induced alkalisation of the growth medium: time course of the pH of the growth medium of WT(Co10)**(F)** and *the1-1***(G)** seedlings, after mock or RALF34 treatment (error bars = SD, n≥4). **(H):** RALF34 propeptide sequence showing secretory signal peptide, cleaved prodomain and mature peptide. Acidic amino acids (red), basic amino acids and histidines (green), cysteines (blue) and the conserved and essential YISY motif (bold) are highlighted.

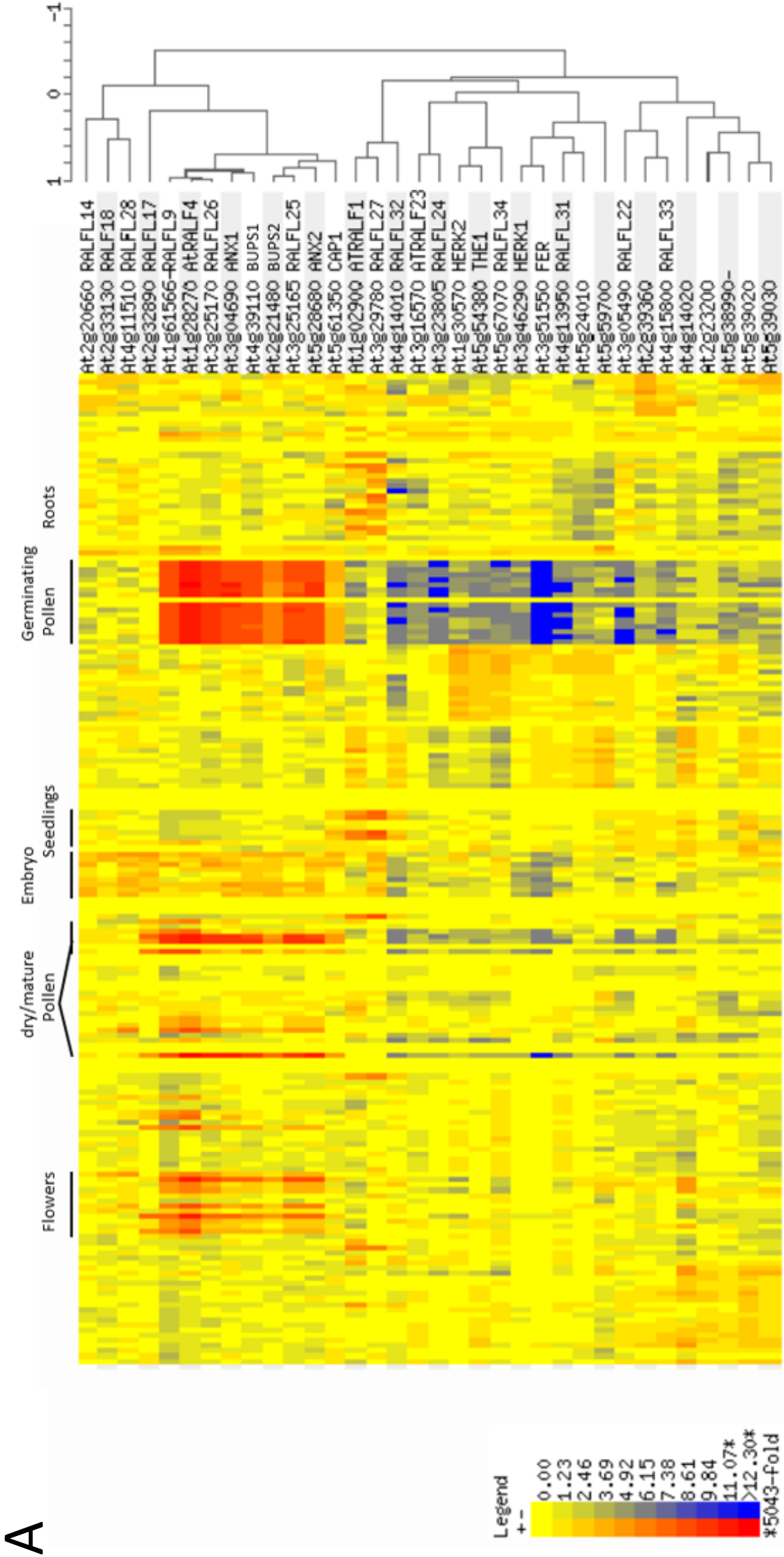
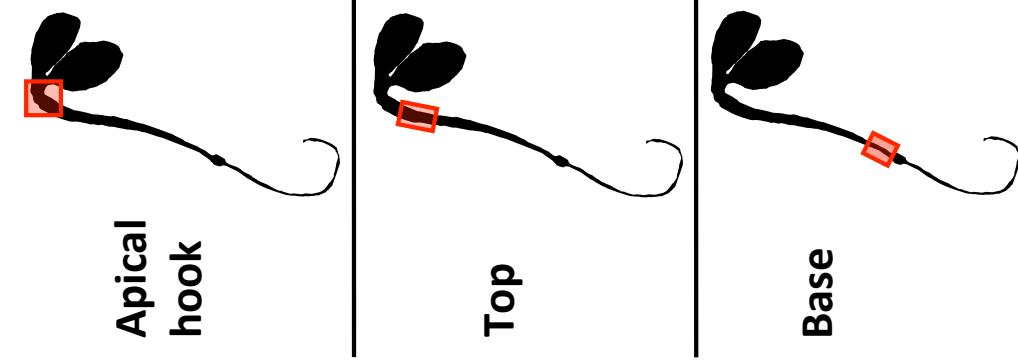
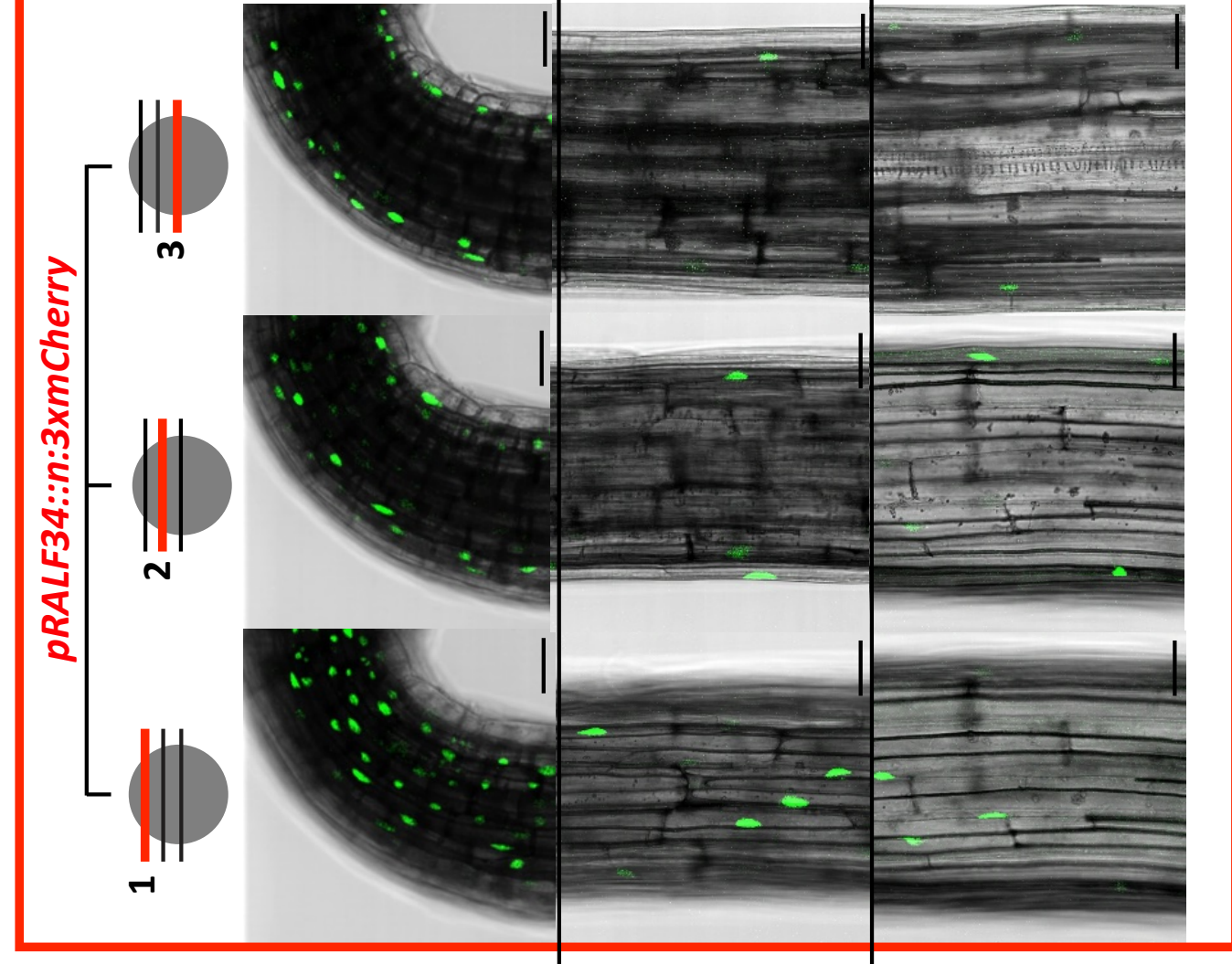
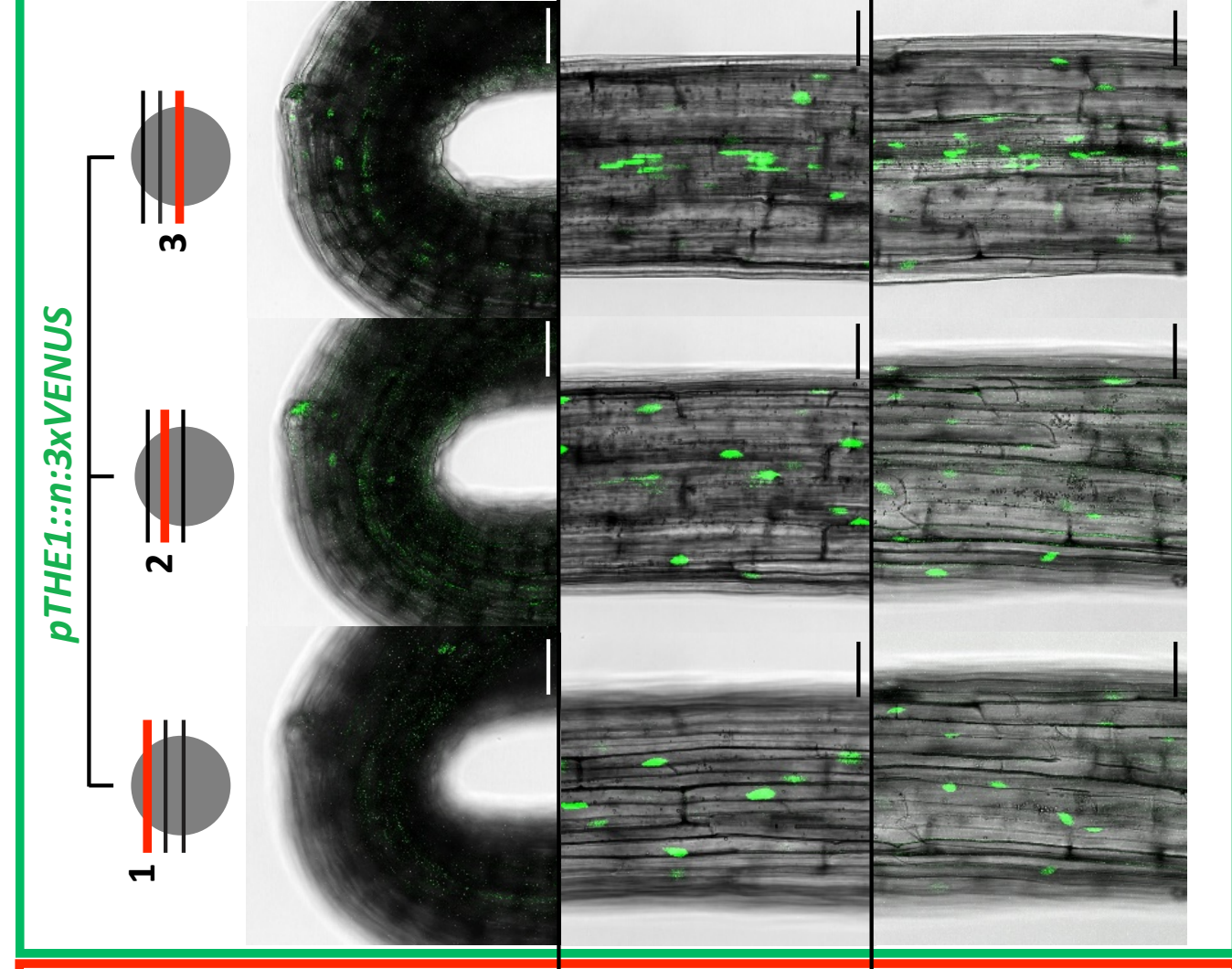
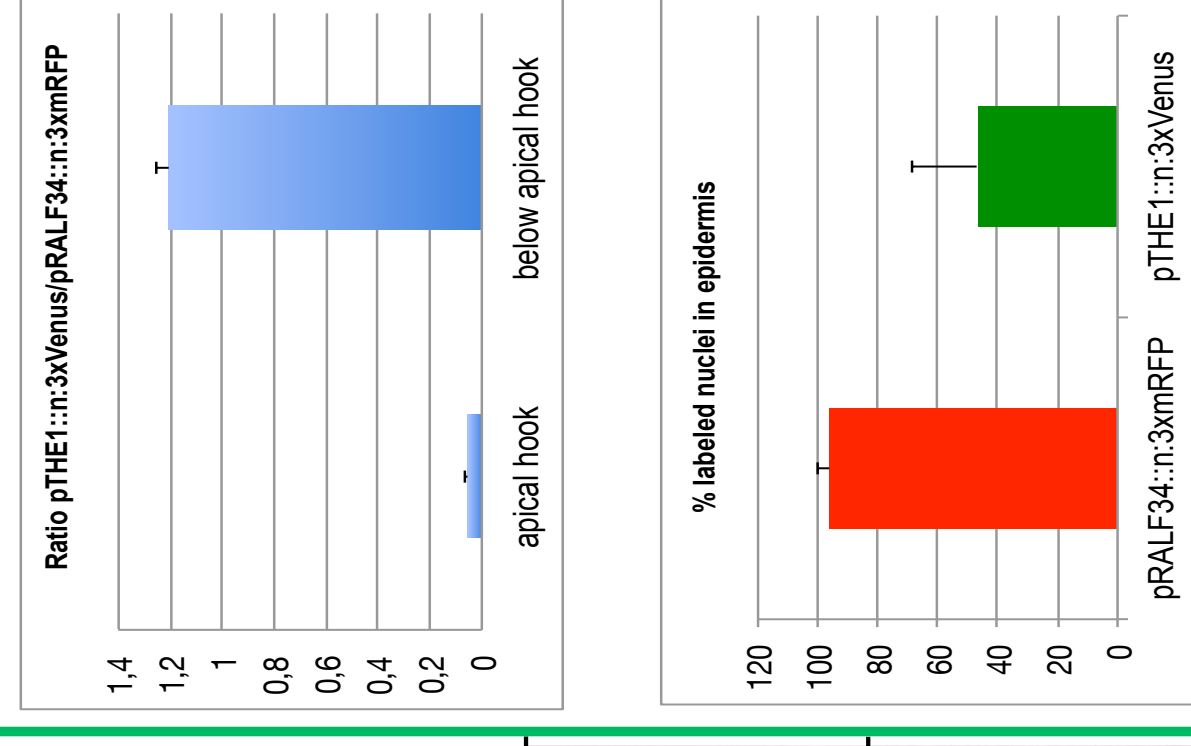
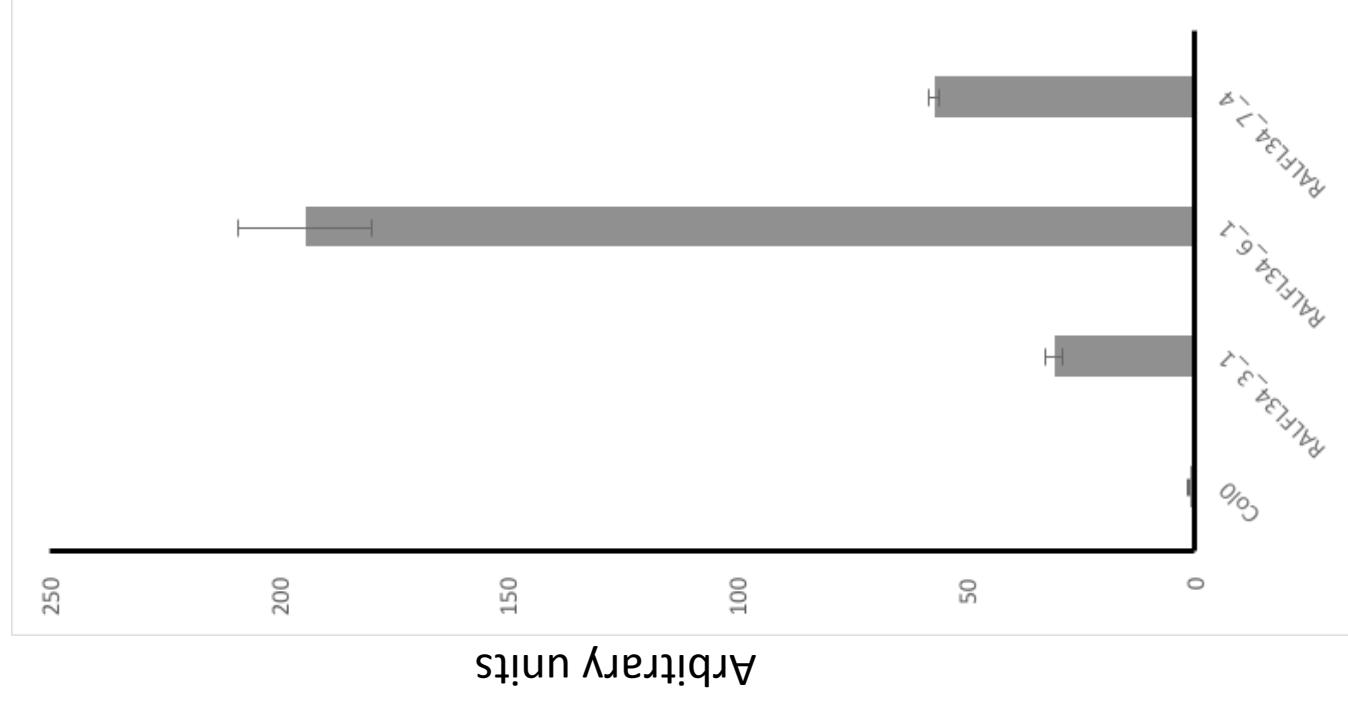
A

Figure S2, related to Figure 2. (A): Clustering of expression profiles of *CrRLK1L* and *RALF* genes (ATGenExpress Plus Extended Tissue Series microarray datasets analysed using the Expression Browser from BAR Toronto (<http://www.bar.toronto.ca/>) [18]. **(B-D):** Overlapping expression domains for

pRALF34::N:3xRFP **(C)** and *pTHE1::N:3xVENUS* **(D)** in the hypocotyl of 4 day-old dark-grown seedlings. **(B):** Positions of regions of interest (ROIs) in the hypocotyl. **(C, D):** Optical sections along the Z-axis of the surface (1), 1/4th (2) and halfway (3) of the seedling at the top (upper row), middle (middle row) and base (lower row) of the hypocotyl, with green signal marking the fluorescent nuclei. **(E):** Quantification of the percentage of the fluorescent nuclei in the epidermis relative to all the cell layers of the organ (upper panel, “below apical hook” = sum of “top” and “base”) and quantification of the ratio between *pTHE1::N:3xVENUS*-positive and *pRALF34::N:3xRFP*-positive nuclei in the epidermis (lower panel). *pTHE1::N:3xVENUS* is expression is 22-fold higher below the apical hook than within the apical hook. Bars = 40 μ m (lower panels) and 100 μ m (upper panel). **(F):** Relative *RALFL34* mRNA levels in independent 35S::*RALFL34* lines. qRT-PCR values are averages of 1 biological sample and 2 technical replicates. Standard error is indicated.

B**C****D****E****F**

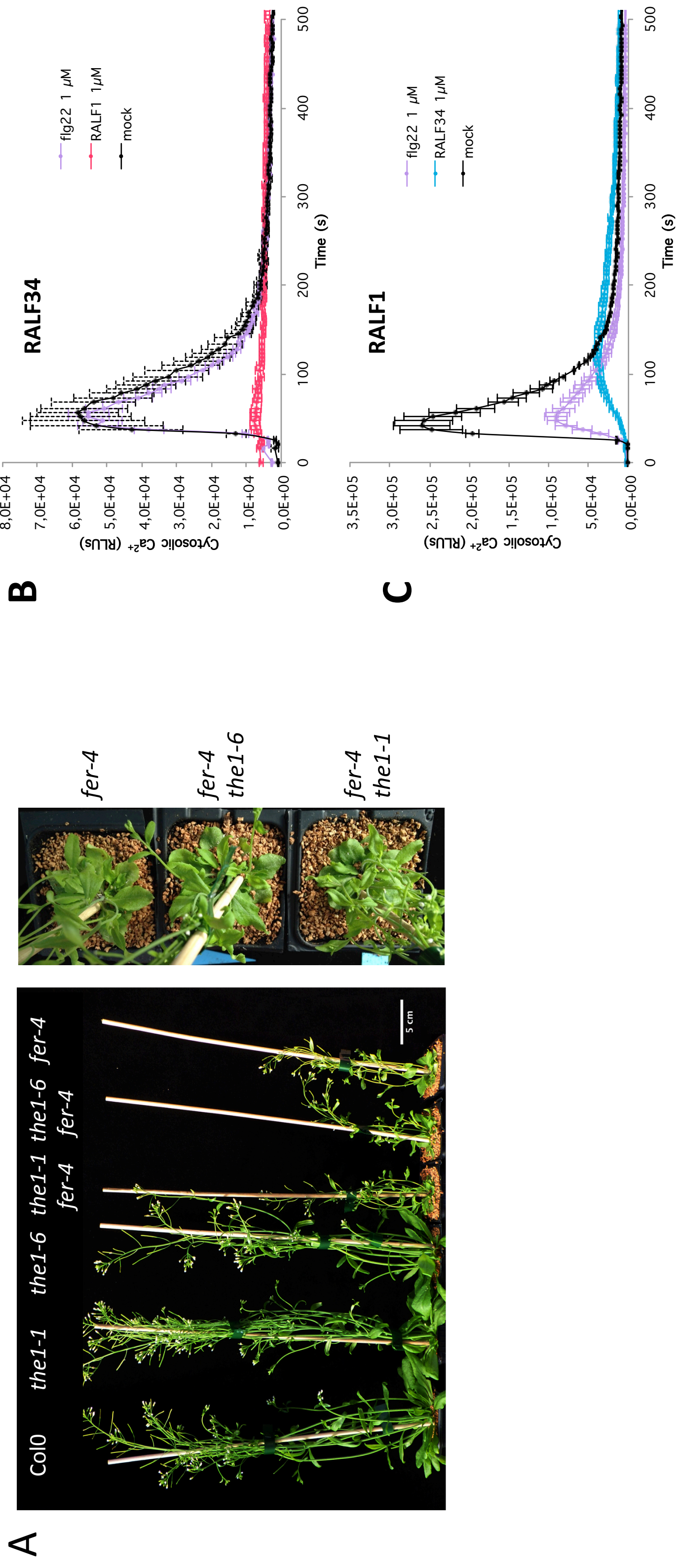


Figure S3, related to Figure 3. (A) Phenotype of 3-week-old greenhouse-grown plants of WT (Col0), *the1-1*, *the1-6*, *the1-1/fer-4* and *the1-6/fer-4*. **(B,C)** RALF34- (B) or RALF1- (C) induced cytosolic Ca²⁺ response after 10 min pretreatment with mock (black), RALF1 (red), RALF34 (blue) or fig22 (purple).

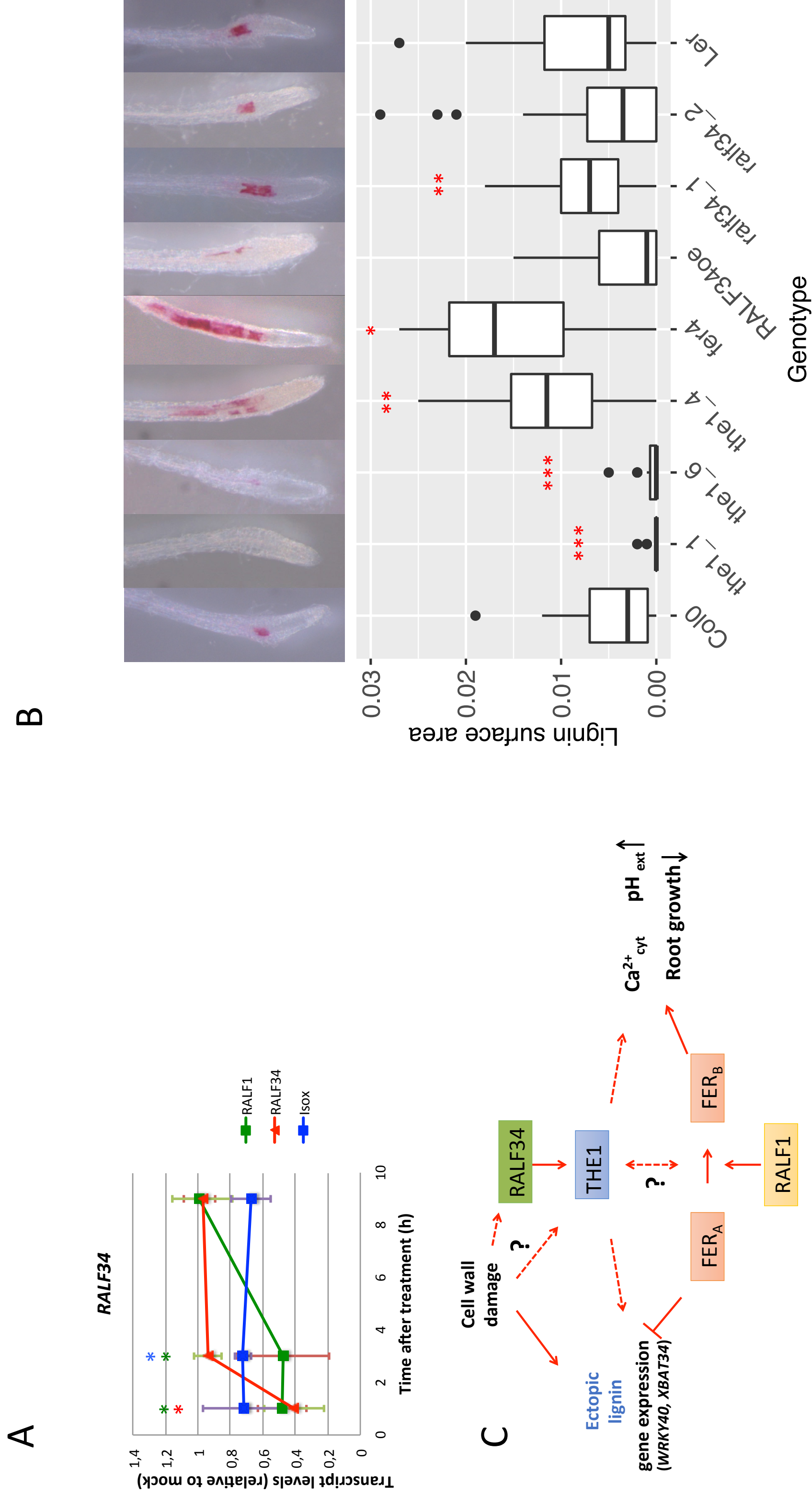


Figure S4, related to Figure 4: The role of THE1 and RALF34 in cell wall integrity signaling. (A): qRT-PCR analysis of RALF34 mRNA levels (relative to mock treatment) in seedlings upon treatment with RALF1, RALF34 or isoxaben (Isox), P -value < 0.05 , $n=3$. **(B):** Isoxaben-induced ectopic lignification in root tips. Representative images of phloroglucinol-stained root tips (upper panel) and quantification of the stained area (lower panel), Significant differences relative to the WT control (Col0 ($n=34$) for *the1-1* ($n=20$), *the1-6* ($n=26$), *the1-4* ($n=25$), *fer-4* ($n=14$), *RALF34oe* ($n=32$), *ral34-1* ($n=32$); and Ler ($n=37$) for *ral34-2* ($n=27$)), no phloroglucinol staining was in any of the mock-treated control roots. Wilcoxon test P -value = 10^{-6} (***) , 10^{-4} (**), 10^{-3} (*). **(C):** Scheme explaining a hypothetical scenario for the interaction between RALF34-THE1 and FER signalling. THE1 and FER are receptors for RALF34 and RALF1 respectively. FER can exist in two versions. One version (FER_A) represses the expression of a set of genes, including *WRKY40* and *XBAT34*, and the accumulation of ectopic lignin upon isoxaben-induced cell wall damage. RALF1 would promote conversion of FER_A into FER_B, thus promoting other functions (cytosolic Ca²⁺ transients, extracellular pH increase and growth inhibition). RALF34, through THE1, elicits the same responses as RALF1. THE1 may act upstream of FER or in parallel in a FER-dependent way (dotted bidirectional arrow). Ectopic lignin (in blue) requires another signal related to cell wall damage besides the derepression of FER_A. It is not known whether RALF34 is involved or not in the sensing by THE1 of cell wall perturbation (dotted arrows).

Legends to Supplemental Figures:

Figure S1, related to Figure 1. (A): Impact of 4 indicated RALF peptides on root growth of WT and mutant (*the1-1*, *the1-4* and *fer-4*) seedlings. Error bars = SD, $n \geq 10$, representative experiment of 3 biological repeats. * and *** are as in Figure 1. **(B):** Control experiment on WT(Col0) and *the1-1* lines expressing calcium sensor G5A in which seedlings are flooded with 1 M CaCl₂. error bars = SD, $n \geq 4$, representative experiment of 3 biological repeats. **(C):** SDS-PAGE, Coomassie staining (two left lanes), immunoblots with anti-HIS (two middle lanes) and anti-ecto-THE1 (two right lanes) antibodies on purified Ecto-THE1-6xHis (1) and mutant Ecto-THE1^{the1-1}-6xHis (2). Molecular weight markers: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™. **(D)** Micro-Scale Thermophoresis (MST) curves showing pH- dependence of RALF34 and RALF1 binding to ectoTHE1. Error bars are as in Figure 1. **(E,F):** RALF34-induced alkalisation of the growth medium: time course of the pH of the growth medium of WT(Col0)(E) and *the1-1*(F) seedlings, after mock or RALF34 treatment (error bars = SD, $n \geq 4$, **: unpaired Student t-test, $P \leq 0.01$). **(G):** Fusicoccin treatment prevents RALF34- but not RALF1-induced root growth inhibition. Root length of seedlings treated with Fusicoccin (FUS), Mock, combined or not with RALF34 or RALF1. ***: unpaired Student t-test, P values $< 10^{-7}$ ($n > 65$), ns: non-significant. **(H):** RALF34 propeptide sequence showing secretory signal peptide, cleaved prodomain and mature peptide. Acidic amino acids (red), basic amino acids and histidines (green), cysteines (blue) and the conserved and essential YISY motif (bold) are highlighted.

Figure S2, related to Figure 2. (A): Clustering of expression profiles of *CrRLKIL* and *RALF* genes (ATGenExpress Plus Extended Tissue Series microarray datasets analysed using the Expression Browser from BAR Toronto (<http://www.bar.utoronto.ca/>) [18]. **(B-D):** Overlapping expression domains for *pRALF34:N:3xRFP* (C) and *pTHE1:N:3xVENUS* (D) in the hypocotyl of 4 day-old dark-grown seedlings. **(B):** Positions of regions of interest (ROIs) in the hypocotyl. **(C,D):** Optical sections along the Z-axis of the surface (1), 1/4th (2) and halfway (3) the seedling at the top (upper row), middle (middle row) and base (lower row) of the hypocotyl, with green signal marking the fluorescent nuclei. **(E):** Quantification of the percentage of the fluorescent nuclei in the epidermis relative to all the cell layers of the organ (upper panel, “below apical hook”=sum of “top” and “base”) and quantification of the ratio between *pTHE1:N:3xVENUS*-positive and *pRALF34:n3:mCherry*-positive nuclei in the epidermis (lower panel). *pTHE1:N:3xVENUS* expression is 22-fold higher below the apical hook than within the apical hook. Bars = 40 μ m (lower panels) and 100 μ m (upper panel). **(F):** Relative *RALFL34* mRNA levels in independent *35S::RALFL34* lines. qRT-PCR values are averages of 1 biological sample and 2 technical replicates. Standard error is indicated.

Figure S3, related to Figure 3: (A) Phenotype of 3-week-old greenhouse-grown plants of WT (Col0), *the1-1*, *the1-6*, *the1-1/fer-4* and *the1-6/fer-4*. **(B,C)** RALF34- (B) or RALF1- (C) induced cytosolic Ca²⁺ response after 10 min pretreatment with mock (black), RALF1 (red), RALF34 (blue) or flg22 (purple).

Figure S4, related to Figure 4: (A): qRT-PCR analysis of RALF34 mRNA levels (relative to mock treatment) in seedlings upon treatment with RALF1, RALF34 or isoxaben (isox), *: Wilcoxon test, P-value < 0.05, n=3. **(B):** Isoxaben-induced (16h) ectopic lignification in root tips. Representative images of phloroglucinol-stained root tips (upper panel) and quantification of the stained area (lower panel), Significant differences relative to the WT control (Col0 (n= 34) for *the1-1* (n=20), *the1-6* (n=26), *the1-4* (n=25), *fer-4* (n=14), *RALF34oe* (n=32), *ralf34-1* (n=32); and Ler (n=37) for *ralf34-2* (n=27)), no phloroglucinol staining was observed in any of the mock- or RALF treated control roots. Wilcoxon test P-value = 10⁻⁶ (***), 10⁻⁴(**), 10⁻³(*). **(C):** Scheme explaining a hypothetical scenario for the interaction between RALF34-THE1 and FER signalling. THE1 and FER are receptors for RALF34 and RALF1 respectively. FER can exist in two versions. One version (FER_A) represses the expression of a set of genes, including *WRKY40* and *XBAT34*, and the accumulation of ectopic lignin upon isoxaben-induced cell wall damage. RALF1 would promote conversion of FER_A into FER_B, thus promoting other functions (cytosolic Ca²⁺ transients, extracellular pH increase and root growth inhibition). RALF34, through THE1, elicits the same responses as RALF1. THE1 may act upstream of FER or in parallel in a FER-dependent way (dotted bidirectional arrow). Ectopic lignin (in blue) requires another signal related to cell wall damage besides the derepression of FER_A. It is not known whether RALF34 is involved or not in the sensing by THE1 of cell wall perturbation (dotted arrows).

ANNEXE 3 :

Tableau des amorces utilisées dans le cadre de la thèse

- Amorces pour les mutagénèses dirigées sur les ADNc de *CESA1* et *CESA3*

Nom de l'amorce	Gène concerné	Séquence	Commentaire
cesa1_20C1comp	<i>CESA1</i>	ACTGGTAGCCACTGTTTACAGCAT	Amorce complémentaire à cesa1_20C1mut
cesa1_20C1mut	<i>CESA1</i>	CGTGGGGTCTGCTTTTCG	Amorce permettant la mutation 20C1 de <i>CESA1</i>
cesa1_ixr1-1comp	<i>CESA1</i>	GACCCACGACTGGTAGC	Amorce complémentaire à cesa1_ixr1-1like
cesa1_ixr1-1like	<i>CESA1</i>	CGCTTTTCGATAAGCTCTTC	Amorce permettant la mutation <i>ixr1-1-like</i> de <i>CESA1</i>
cesa1_ixr1-2comp	<i>CESA1</i>	TGGTGTCGATACCAGCAAGAA	Amorce complémentaire à cesa1_ixr1-2like
cesa1_ixr1-2like	<i>CESA1</i>	ACTTCACCGTTATCTAAAGCCAC	Amorce permettant la mutation <i>ixr1-2-like</i> de <i>CESA1</i>
cesa3_20C1comp	<i>CESA3</i>	GGTATCCACTGTTGATAGCATAAG	Amorce complémentaire à cesa3_20C1like
cesa3_20C1like	<i>CESA3</i>	AATCATGGGGACTACTCTTTG	Amorce permettant la mutation 20C1-like de <i>CESA3</i>
cesa3_ixr1-1comp	<i>CESA3</i>	CCCATGATTGGTATCCACTGT	Amorce complémentaire à cesa3_ixr1-1mut
cesa3_ixr1-1mut	<i>CESA3</i>	GACCACTCTTTGATAAGTTGTTCT	Amorce permettant la mutation <i>ixr1-1-like</i> de <i>CESA3</i>
cesa3_ixr1-2comp	<i>CESA3</i>	GTTTGTGTCAATACCGCAAGG	Amorce complémentaire à cesa3_ixr1-2mut
cesa3_ixr1-2mut	<i>CESA3</i>	TTCACAGTTATCTCAAAGCTTCA	Amorce permettant la mutation <i>ixr1-2-like</i> de <i>CESA3</i>

Les couples d'amorces permettant de mutagéniser les ADNc de *CESA1* ou *CESA3*, contenus dans les vecteurs Gateway™ sont indiqués. Les nucléotides modifiés par rapport à la séquence originelle sont indiqués en rouge.

- Amorces utilisées pour le séquençage des plasmides contenant *CESA3* ou *CESA1*

Nom de l'amorce	Gène ou vecteur concerné	Séquence	Orientation
CESA3_Fw3393	<i>CESA3</i>	AATGTGGAATCAACTGTTGA	Sens (5'→3')
CESA1_Rv357	<i>CESA1</i>	CCGCCATCAGATTCATGTCTG	Anti-sens (3'→5')
CESA1_Fw3488	<i>CESA1</i>	GCCAACAACCTCAATGGCAA	Sens (5'→3')
CESA3_Rv237	<i>CESA3</i>	GCGTTTCTCCTTCGGATTC	Anti-sens (3'→5')

PCesA3-Up1	<i>CESA3</i>	ACTCATTGCAACGGTGAAGA	Sens (5'->3')
PCesA1-Low1	<i>CESA1</i>	TGTCGTTGTTCTAAAGTTGGTG	Anti-sens (3'->5')
PCesA3-Low1	<i>CESA3</i>	CCTCCTCTTTGTCGTCCCTT	Anti-sens (3'->5')
pGWB2-seqrev2	<i>pGWB2</i>	CGTCCAAGAGCAAGTCCT	Anti-sens (3'->5')
pGWB2-seq-F	<i>pGWB2</i>	CGATTCATTAATGCAGCTGG	Sens (5'->3')
PCesA1-Up1	<i>CESA1</i>	GCATTGTCTTTTGCATGTTTG	Sens (5'->3')
pCesA3endUp	<i>CESA3</i>	CACTCATGATCCATTCTCAG	Sens (5'->3')
pCesA1endUp	<i>CESA1</i>	AGAGGAGTGTGTGAACATCC	Sens (5'->3')
CESA3_Fw1911	<i>CESA3</i>	CAAACCTCGGAAGCAAGTT	Sens (5'->3')
CESA3_Fw1340	<i>CESA3</i>	GTTTCTGATGATGGTGCTGCT	Sens (5'->3')
CESA3_Rv3297	<i>CESA3</i>	ACAATGGTAGGAGTCCGGT	Anti-sens (3'->5')
CESA3_Fw2914	<i>CESA3</i>	AGGCATAGACGAATGGTGGA	Sens (5'->3')
CESA3_Fw919	<i>CESA3</i>	GCTGAATGACGAAGCGAGG	Sens (5'->3')
CESA1_Fw294	<i>CESA1</i>	GCTTGCTTGGATCCTAC	Sens (5'->3')
CESA1_Fw851	<i>CESA1</i>	AGAATCGTGGACCCGTCAA	Sens (5'->3')
CESA1_Fw1368	<i>CESA1</i>	TGAAAGAGCCTCCCCTTGTT	Sens (5'->3')
CESA1_Fw1858	<i>CESA1</i>	AAAGCGGCTGGATTTCAAC	Sens (5'->3')
CESA1_Fw2443	<i>CESA1</i>	TGGTCAGTCGCCGTATTTA	Sens (5'->3')
CESA1_Rv3404	<i>CESA1</i>	CGATGGTTGGTGTTCGGTTT	Anti-sens (3'->5')
CESA1_Fw2987	<i>CESA1</i>	GTGACTGGAATCCTGGAGCT	Sens (5'->3')
OL16	<i>CESA3</i>	TGCAACAACCTCCACTAAGT	Anti-sens (3'->5')
OL17	<i>CESA3</i>	GCATACTGACTCAACTGTTC	Sens (5'->3')

Les amorces utilisées permettent de séquencer l'intégralité de l'ADNc de CESA1 ou CESA3.

- **Amorces pour les expériences de RT-qPCR**

Nom du gène	Locus	Amorce sens (5'->3')	Amorce anti-sens (3'->5')
FRK1	At2g19190	ATCTTCGCTTGGAGCTTCTC	TGCAGCGCAAGGACTAGAG
-	At1g51890	CCAGTTTGTCTGTAATACTCAGG	CTAGCCGACTTTGGGCTATC
CYP81F2	At5g57220	AATGGAGAGAGCAACACAATG	ATACTGAGCATGAGCCCTTTG
LOX3	At1g17420	CACTGCTGGTGCATACGG	GAGGCCTTCCATGTCTGAAC
JOX3	At3g55970	GAACCAGCTCCTCATGCTTT	GGGTTACATCACTCTGTG
PR1	At2g14610	CGGAGCTACGCAGAACAAC	CTCGCTAACCACATGTTCA
PAD3	At3g26830	ACGAGCATCTTAAGCCTGGA	TCCGTCATTCCCATAGTGT
RBOHD	At5g47910	TCCAACGGCCTCTTACTCTC	TTCGTCTGAGATCTGTTCCCA
NPR1	At1g64280	AGGGGATATACGGTGCTTCA	ATGCACTTGACCTTTTTTCC
PDF1-2	At2g26020	TGATCCATGTTTGGCTCCTTCA	AAGCCAAGTGGGACATGGTCA
PME02	At1g53830	TACGACGACGCCGATAGGAAAG	ATGTGCTCCACGTGTACCTGAC
PME12	At2g26440	ACTTTCCGATCTGCTACTCTTGCG	TAGTGCAACCGCTTGGTGCTTC
PME18	At1g11580	TTTCCAATCGCTTCCCGTCGTG	TCGCGGTCACTTAAGTGTCTTG
PME25	At3g10720	TTCAGGTCCGGCTGTGTTTCTG	ACGTATAATTGCTCGAGCTTCGC
PME34	At3g49220	CTTTCCACACGGCGTCATTTGC	TAGATCACTGCGTGGTCAGCTC
PME41	At4g02330	TACATCGCCGAACCTTCGTTGCC	GCTTCTCTGGTCCAGCGGTATTTCC
PME61	At5g53370	TTTCCACACCGCCACTTTTCGC	TTCTCAAACGTCATGTCCCTCAC
PAE11	At5g45280	TTTAGTGCTAGCCGTGGTGG	ATTGTTCACTCCTGAGCCCG
AOS	At5g42650	TTTGAGGCATGTGTTGTGGT	ACGACGAGAAATTAACGGAGC

OPCL1	At1g20510	GCAACTTCCAACCTCCAAGCT	TCTGTGTTTTGGGACCACATG
DWF4	At3g50660	CAAGGCTATGTGCTGG	CGAGAAACCCTAATAGGC
LOX2	AT3G45140	GGACTCATGCCTGTACGGAGCC	TGGCGTGCACGAGCGTTGAT
AOS	AT5G42650	ATCGAAAGCCACGACGCGGC	GGCACAAACTCATCCGCCCCG
AOC2	AT3G25770	GGTGCCTACGGACAGGTCAAGC	GCGGTACCGGTGTTCCGGTG
ACX1	AT4G16760	TATGGGCCGGGCAGCACATCT	TGAGAGCCCTAGCTTCGAAAGCT
OPR3	AT2G06050	TGGTTGGCATGCTCAATAAG	GCCTTCCAGACTCTGTTTGC
OPCL1	AT1G20510	GGGTTATCAGGTTGCTCCAGCTGAG	CCCCACTTCTTTGTCCGGAAACGGG
IAA6	At1g52830	TGCCAAGGTACATCTCCGACGA	TAGGAGTGGCGAAGGAGGGTAAGA
IAA20	At2g46990	CGCATCCATTCTCTGGGCTGAAGA	TCTCCAACCATCATCCAGTCACCT
GH3.3	AT2G23170	ACAATTCCGCTCCACAGTTC	ACGAGTTCCTTGCTCTCCAA
PIF3	AT1G09530	GGATGCAACAACAACCAGTG	ATTGCCAATCGTCGAAGAAC
PIF4	AT2G43010	TAACGACCGTTGGACCTAGC	TGCGTTCGGATTAAGCTTTT
TIP41	At4g34270	GCTCATCGGTACGCTCTTTT	TCCATCAGTCAGAGGCTTCC

Titre : Étude du lien entre la biosynthèse de la cellulose et le contrôle de l'intégrité de la paroi végétale

Mots clés : Paroi, Cellulose, Récepteur kinase, Signalisation

Résumé : La paroi, qui est une structure dynamique entourant chaque cellule végétale, joue un rôle primordial dans le développement des plantes et la transduction de signaux en réponse à des changements environnementaux et à des attaques par des pathogènes. Un des composants majeurs de la paroi primaire est la cellulose qui y est enchevêtrée avec d'autres polysaccharides tels que les hémicelluloses et les pectines. L'objectif de la thèse était de comprendre comment la synthèse de cellulose est coordonnée avec l'assemblage et le remodelage de la paroi au cours de la croissance. Au cours de ces vingt dernières années, de nombreuses molécules inhibant la synthèse de la cellulose (CBI) ont été identifiées et représentent de très bons outils pour disséquer la biologie cellulaire du remodelage pariétale. Ces CBI présentent différentes structures ce qui suggère qu'il existe plusieurs cibles pour perturber la biosynthèse de la cellulose. En étudiant 5 d'entre eux et nous avons pu confirmer qu'ils provoquaient une disparition ou une immobilisation des complexes de cellulose synthase (CSC) à la membrane plasmique.

Par contre la caractérisation d'un nouveau CBI, l'Hypostuntine, a permis de montrer qu'il agissait différemment des CBI déjà décrits. L'Hypostuntine inhibe la croissance sans changement détectable des CSC au niveau de la membrane plasmique suggérant que l'Hypostuntine ne cible pas directement le CSC. Des études en microscopie électronique à transmission des parois de plantules traitées à l'HS ont permis de montrer que l'Hypostuntine interfère au niveau du mécanisme cellulaire qui coordonne la biosynthèse de la cellulose et l'assemblage d'une paroi extensible. Pour distinguer le rôle de ces six CBI étudiés, des tests de résistance croisés, des analyses de la composition pariétale et de voies de signalisation ont également été étudiées. Les résultats montrent que toutes ces réponses dépendent entre autres de THESEUS1, un récepteur like kinase de la famille des *Catharanthus roseus* récepteur kinases CrRLK1L mais suggèrent aussi la présence d'autres acteurs spécifiques induits par chaque CBI.

Title : Study of the link between the cellulose biosynthesis and the control of the integrity of the cell wall

Keywords : Cell wall, Cellulose, Receptor kinase, Signaling pathway

Abstract : The cell wall, which is a dynamic structure surrounding each plant cell, plays a fundamental role in the plant development and in the signalling pathways in response to environmental changes and pathogen attacks. One of the major component of the primary cell wall is the cellulose polymer which is embedded between hemicelluloses and pectins. The question of the PhD was how the synthesis of cellulose is coordinated with the assembly and remodelling of the cell wall during cell expansion? During these last twenty years, a multitude of molecules that inhibit cellulose synthesis (CBI) have been identified and they represent powerful tools to dissect the cell biology of cell wall assembly. The large variation in chemical composition of the CBI suggests the existence of multiple targets for these molecules for perturbing the cellulose biosynthesis. I studied five of these molecules and confirmed that they promote a clearance or an immobilisation of the cellulose synthase complex (CSC) from the plasma

membrane. The characterisation of the new molecule, named Hypostuntin, showed that its mode of action on CSC is different from the ones described for the other CBI. Hypostuntin inhibits cell growth without detectable changes in CSC activity. This suggests that the CSC is not the primary target of Hypostuntin. Transmission electron microscopy on developing cell walls suggests that Hypostuntin interferes with a process that coordinates cellulose synthesis with the assembly of an extensible wall. To ascertain the role of the six studied CBI, we performed tests of cross resistance, analysis of cell wall composition and signalling pathways. Our results show that the responses are THESEUS 1 dependent, a receptor belonging to the *Catharanthus roseus* receptor like kinase CrRLK1L but also suggest the presence of other actors specific of the molecules.