HAL
open science

La glycosyltransférase UGT76B1 d'Arabidopsis régule la signalisation hormonale lors de l'interaction avec l'oomycète Hyaloperonospora arabidopsidis

Allasia Valérie

To cite this version:

Allasia Valérie. La glycosyltransférase UGT76B1 d'Arabidopsis régule la signalisation hormonale lors de l'interaction avec l'oomycète Hyaloperonospora arabidopsidis. Biologie moléculaire. 2012. hal-01361035

HAL Id: hal-01361035

https://ephe.hal.science/hal-01361035

Submitted on 6 Sep 2016

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.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

La glycosyltransférase UGT76B1 d'Arabidopsis régule la signalisation hormonale lors de l'interaction avec l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis*

Allasia Valérie

Soutenu le 02 juillet 2012

Résumé

Les UDP-glycosyltransférases (UGTs) sont des enzymes présentes dans l'ensemble des organismes vivants. Elles catalysent le transfert d'un monosaccharide depuis un donneur activé vers un accepteur, formant ainsi une liaison glycosidique. Chez les plantes, des hormones végétales, des métabolites secondaires impliqués dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques, et des xénobiotiques tels que les herbicides sont des substrats pour les UGTs. La glycosylation peut activer ou inactiver ces composés, mais également augmenter leurs propriétés hydrophiles et ainsi réguler la compartimentalisation subcellulaire. Au cours des interactions entre plantes et agents pathogènes biotrophes, des UGTs assurent par exemple l'homéostasie cellulaire entre la forme active et cytoplasmique de l'acide salicylique (SA) et la forme inactive et vacuolaire de cette hormone de défense. Nos études sur l'interaction entre *Arabidopsis thaliana* et l'oomycète biotrophe obligatoire *Hyaloperonospora arabidopsidis* (*Hpa*) ont permis d'identifier une UGT qui est fortement activée de façon transcriptionnelle pendant l'infection. Une analyse fonctionnelle a été réalisée.

Mots clés :
Acide salicylique, défense, sensibilité, oomycète, glycosyltransferase

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté par ***Allasia Valérie***

pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

La glycosyltransférase UGT76B1 d'Arabidopsis régule la signalisation hormonale lors de l'interaction avec l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis*

Soutenu le 2 juillet 2012 devant le jury suivant :

Mme Rossel Mireille : Présidente
Mr Keller Harald: Tuteur scientifique
Mr Dupressoir Thierry: Tuteur pédagogique Mr Boscari Alexandre: Rapporteur
Mr Saindrenan Patrick: Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :
Mr Keller Harald: harald.keller@sophia.inra.fr
Laboratoire INRA Institut Sophia Agrobiotech
400 route des chappes BP 167 06903 Sophia antipolis

et de

Mr Dupressoir Thierry : thierry.dupressoir@univ-montp2.fr

Laboratoire EPHE de Pathologie Comparée des Invertébrés
EPHE (Science de la Vie et de la Terre)

Table des matières

Résumé 1

LISTE DES ABREVIATIONS 4

SITUATION DU SUJET 6

INTRODUCTION 8

CHAPITRE 1 : Les réactions de défense des plantes, de la perception du pathogène à la résistance 8

1. Reconnaissance de l'agent pathogène 8
2. Les mécanismes de défense chez les plantes 9

2.1 Renforcement de la paroi des cellules. 9
2.2 La synthèse de composés antimicrobiens. 10
2.3 Activation de l'expression des gènes de défense, synthèse de protéines PR 10
2.4 La réponse hypersensible. 11
2.5 La potentialisation des réactions de défense des plantes 11

3. Activation de la cascade de signalisation, transduction du signal 12
4. Voies de signalisation des défenses via les phytohormones 13

4.1 Implication de l'acide salicylique dans les réactions de défense et étude de la signalisation dépendante de ce composé. 13

4.1.1 Signalisation associée à l'acide salicylique: rôle de NPR1 14

4 2 Contribution de l'acide jasmonique et de l'éthylène aux réactions de défense. 15

4.3 Les interconnexions entre les différentes voies SA, JA et ET : complexité du réseau 16

5. Contribution dans les réactions de défense des phytohormones impliquées initialement dans la biologie du développement et la croissance 17

5.1 Les auxines 18
5.2 L'acide abscissique 18
5.3 Les gibbérellines 18

CHAPITRE 2 : La sensibilité des plantes à l'infection 20

CHAPITRE 3 : Les oomycètes 22

1. Oomycètes et champignons : des similitudes et des différences 22
2. Méthodes de lutte 23
3. Le modèle d'étude : l'interaction entre *Arabidopsis thaliana* et *Hyaloperonospora arabidopsidis* 24

3.1. Arabidopsis thaliana 24
3.2. Hyaloperonospora arabidopsidis 24

CHAPITRE 4 : Objectifs du travail développé dans ce mémoire 25

BIBLIOGRAPHIE 28

LISTE DES ABREVIATIONS

ACC: Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique

ADN: Acide Désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADN-T : ADN de transfert
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: ARN messager
BET: Bromure d'éthidium
Col-0: Ecotype Columbia d'*A. thaliana*
dNTP: Désoxyribonucléotide triphosphate
ET: Ethylène
EtOH: Ethanol
GFP: *Green Fluorescent Protein*
GT : Glycosyltransferase
GUS: _-glucuronidase
Hpa: *Hyaloperonospora arabidopsidis*
HPLC: Chromatographie liquide haute performance
JA: acide jasmonique
jpi: jours post-inoculation
M: molaire (mol/l)
MSO: Methionine Sulfoximine
NadhUBQ: *NADH Ubiquinone Oxidoréductase*
NptII: *Néomycine Phosphotransferase* II
OXA1: *Oxidase assembly 1*
p35S: promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
PR: *Pathogenesis Related*
PCR : Polymerase chain réaction
Q-RT-PCR: RT-PCR quantitative
RH: Réaction hypersensible
RT: Reverse Transcription
UBP22: *Ubiquitin protease 22*
UGT: *UDP-glycosyltransférase*
Ws: Ecotype Wassilewskija d'*A. thaliana*

Nomenclature:

***ugt76B1*: mutant**

***UGT76B1*: gène**

UGT76B1: protéine

SITUATION DU SUJET

Dans leur environnement, les plantes sont fréquemment soumises à des variations climatiques ou à des agressions causées par d'autres organismes, pouvant nuire à leur bon développement. Elles ont développé, au cours de l'évolution, des moyens efficaces et adaptés pour mieux répondre à ces stress dits abiotiques ou biotiques. Une première ligne de défense est formée par la cuticule et par la paroi végétale. Pourtant, ces barrières naturelles ne sont pas sans faille car elles peuvent être hydrolysées par des enzymes sécrétées par certains microorganismes ou percées par des pressions mécaniques comme celles exercées par les appressoria des champignons et oomycètes.

La plante peut aussi réagir aux variations de son environnement en mettant en place des mécanismes cellulaires spécifiques. De manière générale, la perception d'un agresseur conduit à la mise en place d'une cascade d'événements de signalisation cellulaire, qui déclenche des réponses spécifiques de défense afin de protéger la plante contre l'agresseur et des attaques ultérieures. Depuis une vingtaine d'années, les études menées principalement sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana (A. thaliana)* ont permis d'identifier les voies de signalisation qui conduisent à la résistance aux agents pathogènes (Glazebrook, 2005). Malgré l'efficacité des défenses induites suite à un stress biotique, la maladie est parfois observée et peut causer des pertes considérables. Contrairement aux voies de signalisation conduisant à la résistance de la plante, peu de connaissances existent sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement et le développement de la maladie. En effet, les agents pathogènes dérégulent des fonctions végétales pour contourner les défenses mises en place par la plante et manipulent d'autres fonctions pour créer un environnement favorable à leur développement (O'connell et Panstruga, 2006). Lorsque une des fonctions végétales nécessaire au déroulement de l'infection est inactivée, la plante présente un niveau de résistance accrue..

Parmi les microorganismes phytopathogènes, les oomycètes constituent un problème majeur pour l'agriculture mondiale. Au milieu du XIXème siècle, en Irlande, l'oomycète *Phytophthora infestans* fut à l'origine d'une épidémie de mildiou qui anéantit la production de pomme de terre, base alimentaire de la population, conduisant à une importante famine et un exode massif des Irlandais aux Etats Unis. A l'heure actuelle, peu de moyens de lutte existent contre ces microorganismes pour les agriculteurs. Les pertes causées par les oomycètes peuvent atteindre 10 à 60% selon les cultures (Stokstad, 2006). Dans ce contexte, il est essentiel de comprendre les mécanismes moléculaires qui s'établissent pendant l'interaction entre les plantes et les oomycètes pour identifier de nouvelles stratégies

de lutte phytosanitaire et assurer une protection durable des cultures.
Dans l'introduction de ce rapport, je développerai d'abord les réactions de défense des plantes en détaillant les différentes étapes : la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante, les différents mécanismes de défense, la mise en place des réactions de défenses par des cascades de signalisations impliquant les différentes voies hormonales et leurs interconnexions, les gènes responsables de l'activation de ces défenses. Le deuxième chapitre décrira quelques exemples sur la notion de « facteur de sensibilité » chez la plante vis-à-vis des oomycètes. Nous verrons le pathosystème étudié au laboratoire entre la plante modèle *A. thaliana* et l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis* (*Hpa*). A la fin de l'introduction générale, je présenterai les objectifs de ce travail, en introduisant l'importance des métabolites secondaires dans les réactions de défense, ainsi que le rôle des glycosyltransferases dans la gestion de ces métabolites. Je décrirai ensuite l'implication d'une glycosyltransferase végétale comme cible de l'agent pathogène. L'activité de cette glycosyltransferase étant détournée afin de déréguler les mécanismes de défense de la plante hôte.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 :
Les réactions de défense des plantes, de la perception du pathogène à la résistance

1. Reconnaissance de l'agent pathogène

Les plantes possèdent des barrières physico-chimiques naturelles souvent suffisantes pour les protéger des organismes pathogènes. Ces barrières incluent des structures cellulaires telles que la paroi pecto-cellulosique et la cuticule qui empêchent la pénétration du microorganisme. Cette résistance passive est souvent accompagnée par une accumulation de composés antimicrobiens produits constitutivement par la plante: les phytoanticipines. Parfois, l'agent pathogène réussit à contourner ces premières barrières et déclenche des mécanismes de défense au niveau de la plante**.** Si les mécanismes de défense sont contournés par l'agent pathogène, celui-ci se développe et la maladie est observée. La plante est dite **sensible**, et l'interaction qualifiée d'**interaction compatible**. Toutefois, dans la majorité des cas, la plante reconnaît l'agresseur et met rapidement en place des réactions de défense efficaces qui permettent aussi à la plante de se prémunir d'attaques ultérieures. Dans ce cas, **l'interaction est incompatible** et la plante est dite **résistante.**
Trois étapes caractérisent l'interaction entre une plante et un agent pathogène.
La première étape est celle de la **reconnaissance du parasite**. La reconnaissance des agents pathogènes chez les plantes fait intervenir deux types de perception. Le premier type de reconnaissance déclenche la mise en place de l'immunité innée. On regroupe sous ce terme différents types de résistance :

- la **résistance basale** qui limite l'étendue de la maladie par l'agent pathogène virulent. Elle réduit la sévérité des symptômes, mais ne suffit pas pour arrêter le développement de l'agent pathogène et de la maladie.

- la **résistance non-hôte** qui se distingue par le fait qu'elle est efficace en réponse à toutes les souches avirulentes d'un agent pathogène donné, met en jeu des molécules appelées éliciteurs généraux, ou des signaux moléculaires communs à plusieurs agents pathogènes appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Cette perception suffit à provoquer une réponse immunitaire efficace.

La coévolution entre les agents pathogènes et les plantes a mené respectivement à l'acquisition de systèmes de suppression des défenses par les pathogènes ou à

l'acquisition de systèmes de surveillance chez les végétaux. Le niveau de défense le plus fort alors acquis par la plante est la résistance spécifique qui constitue le deuxième type de reconnaissance. Ce concept indique que la présence simultanée et spécifique d'un **gène de résistance R** dans le génome de la plante et d'un **gène d'avirulence** correspondant dans celui du parasite **codant un effecteur**, conduit à une résistance spécifique (Flor, 1971). Ces deux mécanismes de reconnaissance constituent les deux branches du système d'immunité innée chez les plantes (Jones et Dangl, 2006)**.**

2. Les mécanismes de défense chez les plantes

Suite à la reconnaissance de l'agent pathogène, les plantes mettent en place divers mécanismes de défense qui visent à limiter ou bloquer la progression du parasite. Ces mécanismes incluent un renforcement ou la mise en place de barrières structurales et la production de molécules ayant des activités antimicrobiennes. Des nombreux gènes de défense sont activés, qui codent pour des protéines lytiques (comme certaines PR « pathogenesis-related » protéines) et des enzymes impliquées dans la synthèse des métabolites secondaires. L'ensemble des défenses mises en place par la plante conduit fréquemment à la mort programmée des cellules infectées, un phénomène connu sous le terme de réaction hypersensible (RH) (Mur *et al.,* 2008).

2.1 Renforcement de la paroi des cellules.

La paroi des cellules végétales constitue une barrière physique à la pénétration des agresseurs. Cependant, de nombreux champignons pathogènes développent une structure leur permettant d'adhérer aux surfaces cellulaires de l'hôte, l'appressorium, puis de les traverser par pression mécanique ou hydrolyse enzymatique. Pour répondre à cette agression les plantes ont mis en place des mécanismes visant à modifier et à renforcer la paroi. Ils se traduisent par la synthèse de nouvelles molécules incluant la callose (polymère de _-1,3 glucane) et des composés phénoliques tels que la lignine. Le dépôt rapide de certaines de ces molécules sous le point de pénétration du parasite forme une papille bloquant ainsi la progression de l'agent pathogène (Uma *et al.,* 2011).

2.2 La synthèse de composés antimicrobiens.

En réponse à une infection, la plante synthétise des phytoalexines en tant que composés antimicrobiens. La phytoalexine majoritaire d'*A. thaliana* est la camalexine.

Elle appartient à la classe des composés riches en soufre et le précurseur de sa synthèse est le tryptophane (Rauhut et Glawischnig, 2009). Le rôle de la camalexine dans la résistance a été décrit a travers l'utilisation de mutants **phytoalexin deficient (*pad)*** d'*A. thaliana* déficients en camalexine (Glazebrook et Ausubel, 1994; Glazebrook *et al.*, 1997). Le gène *PAD3* code pour la dernière enzyme impliquée dans la biosynthèse de la camalexine, un cytochrome P450, dont le mutant correspondant présente un taux indétectable de camalexine (Zhou *et al.*, 1999). Contrairement aux autres mutants (*pad1*, *pad2* et *pad4*), *pad3* est insensible aux souches virulentes et avirulentes de *P. syringae* (Glazebrook et Ausubel, 1994). Par contre, ce mutant est sensible à d'autres pathogènes comme *A. brassicicola* et *B. cinerea* (Ferrari *et al.*, 2003), suggérant que la camalexine sert à limiter l'infection par les bactéries au niveau foliaire. Les glucosinolates sont des métabolites riches en soufre, caractéristiques des Brassicacées. Ils jouent un rôle crucial dans la défense contre les herbivores en ayant un pouvoir toxique et de dissuasion (Halkier et Gershenzon, 2006).

2.3 Activation de l'expression des gènes de défense, synthèse de protéines PR

Les protéines PR possèdent des propriétés antimicrobiennes *in vitro* à travers une activité hydrolytique de la paroi cellulaire de l'agent pathogène et/ou une toxicité vis-à-vis du pathogène. Elles ont été classées sur la base de leurs propriétés biochimiques et biologiques (Van Loon *et al.*, 2006). Les _-1,3-glucanases (PR-2) et chitinases (PR-3, -4, -8 et -11) exercent leur fonction en dégradant la paroi des champignons. La famille des PR-7 regroupe des endoprotéases. Les PR-12 (défensines), PR-13 (thionines) et certaines protéines de transfert de lipides (PR-14) ont à la fois des propriétés antimicrobiennes et antifongiques (Sels *et al.,* 2008). Les protéines des familles PR-1 et PR-5 (thaumatin-like protein) semblent agir plutôt contre les oomycètes, et la famille des PR-10 (ribonucléase-like protein) serait plutôt impliquée dans la défense contre les virus. Les inhibiteurs de protéases (PR-6) aussi bien que les chitinases auraient pour cible les nématodes et insectes herbivores. PR-15 (oxalate oxidases) et PR-16 (oxalate oxidase-like protein) possèdent une activité superoxyde dismutase qui génère de l'H_2O_2. Cependant, certaines protéines PR semblent plutôt impliquées dans l'établissement de la résistance comme les PR-9 qui sont des peroxydases participant vraisemblablement au renforcement de la paroi cellulaire de la plante.

2.4 La réponse hypersensible.

La RH est une réponse de défense considérée par certains auteurs comme l'étape ultime du processus de mise en place de la résistance (Mur *et al.*, 2008). Elle

apparaît dans de nombreuses interactions plante-pathogène, mais peut également être déclenchée par des éliciteurs généraux (Jones et Dangl, 2006). La RH est définie comme une mort cellulaire localisée au niveau du site d'infection du pathogène, qui entraîne l'apparition de nécroses tissulaires. Cette résistance locale est plutôt visible en réponse aux agents biotrophes qui vivent au dépend de cellules vivantes. Elle limite le développement du pathogène en réduisant l'accès aux nutriments. A l'inverse, la RH n'empêche pas, mais facilite le développement des champignons nécrotrophes, qui se nourrissent exclusivement de tissus morts.

2.5 La potentialisation des réactions de défense des plantes

Au-delà de la nature des mécanismes de défenses, la résistance de la plante dépend aussi de la rapidité et de l'intensité de leur mise en place. L'accélération et le renforcement des réponses de défense basales confèrent alors à la plante une résistance accrue aux stress biotiques. Quand les plantes sont capables de **mobiliser les réponses de défense plus rapidement et/ou plus intensément** on parle de « potentialisation » ou « priming », par analogie avec un phénomène existant chez les monocytes et macrophages. Lors de ce processus, l'application d'un premier stimulus permet aux cellules de répondre plus rapidement et plus intensément à une attaque parasitaire ou un second stress abiotique. Dans le processus de potentialisation chez les plantes, l'état de pré-activation produit par le premier stimulus ne peut être mis en évidence qu'après l'application du second stress et se manifeste par la transcription plus rapide et/ou plus intense de gènes de défense. La potentialisation des réactions de défense peut être induite par des agents pathogènes, par des organismes bénéfiques tels que les rhizobactéries (Pieterse *et al.*, 1996), par les herbivores ou la blessure (Ton *et al.*, 2007), ou par des composés naturels comme l'acide _-aminobutyrique (BABA) (Zimmerli *et al.*, 2000)**.** Bien que les mécanismes et les bases génétiques de la potentialisation restent majoritairement inconnus, il a été proposé que la pré-sensibilisation de la plante par un potentialisateur puisse être associée à une accumulation de protéines sous forme inactives. Puis, sous l'effet d'un stress biotique ou abiotique, ces protéines seraient activées, amplifiant ainsi la transduction du signal conduisant à une induction des réponses de défense plus rapides et/ou plus intenses (Goellner et Conrath, 2008).

3. Activation de la cascade de signalisation, transduction du signal

La reconnaissance de l'agent pathogène par les cellules végétales conduit à l'activation **des signaux en cascades**. Parmi ces signaux, on distingue des signaux

précoces et des signaux secondaires. Parmi les **signaux précoces** figurent des modifications de la perméabilité de la membrane plasmique manifestées par des influx de Ca^{2+}, des efflux de K^+ et d'anions, en particulier de Cl^- ou NO^{3-}. Les **flux calciques et anioniques** déclenchent une dépolarisation de la membrane plasmique. Ces flux d'ions peuvent agir en amont d'autres événements cellulaires, en particulier la production de monoxyde d'azote (NO) et des formes actives de l'oxygène (FAO), telles qu'O^{2-} et H_2O_2. Ils précèdent souvent une **cascade de phosphorylation** impliquant des protéines kinases de type MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Pedley et Martin, 2005)**.**

Parmi **les signaux secondaires** figurent les phytohormones. De nombreuses études ont permis d'identifier le rôle indispensable que jouent l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) dans les réponses de défense aux stress biotiques (Bari et Jones, 2009). Ces molécules constituent le lien entre les événements précoces de signalisation et l'activation des réponses de défense tardives. De plus, elles assurent la transmission de l'information de cellule à cellule induisant ainsi une résistance systémique acquise (SAR), une forme de résistance qui s'établit à distance du site d'infection et qui permet à la plante de protéger les organes qui sont encore sains contre des attaques secondaires par des parasites (Durrant et Dong, 2004). Plus récemment, l'implication d'autres phytohormones, initialement étudiées dans le développement et la croissance, tels que les auxines (Navarro *et al.*, 2006), l'acide gibbérellique (Navarro *et al.*, 2008), ou l'acide abscissique (ABA) (Asselbergh *et al.*, 2008) a été révélé. Ces dernières molécules semblent jouer un rôle clé dans l'interaction avec les microorganismes pathogènes qui restent encore à éclaircir (Pieterse *et al.*, 2009). Depuis une dizaine d'années, il est clairement établi que le système de défense des plantes est régulé par des voies de signalisation interconnectées dont la balance hormonale déterminera la spécificité de réponse en fonction du microorganisme rencontré. C'est l'utilisation de mutants disponibles chez *A. thaliana* qui a permis d'établir ce lien entre la nature du stress et la (ou les) voie(s) dominant(es) dans la mise en place de la résistance des plantes. On sait maintenant que les hormones jouent un rôle positif ou négatif en fonction de la nature du pathogène**.**

Dans le cas de pathogènes biotrophes, c'est-à-dire capables de se nourrir et de se développer uniquement sur des tissus végétaux vivants, on observe une modulation de la défense hormonale en faveur du SA. Dans le cas de pathogènes nécrotrophes qui tuent les cellules hôtes et se nourrissent des matières mortes, on observe une modulation des voies hormonales vers la voie jasmonate/éthylène (Glazebrook, 2005). Bien que certaines étapes et certaines connections soient encore inconnues, des connaissances actuelles sur les interactions entre les diverses voies de signalisation hormonale se dégagent.

4. Voies de signalisation des défenses via les phytohormones

4.1 Implication de l'acide salicylique dans les réactions de défense et étude de la signalisation dépendante de ce composé.

Les travaux effectués sur le rôle physiologique de SA ont mis en évidence que ce composé pouvait influencer différents processus développementaux ou réponses physiologiques comme la capacité de germination, la croissance cellulaire, la floraison ou la thermo-tolérance (Vlot *et al*., 2009). Cette molécule a aussi un rôle clef dans la mise en place de la résistance basale, dans l'exécution de la RH. et dans la mise en place de la SAR.

Le SA est un composé phénolique considéré comme un métabolite secondaire. La **biosynthèse du SA** s'initie chez les plantes au niveau des chloroplastes où **deux voies enzymatiques utilisant le chorismate** comme précurseur ont été identifiées (Vlot *et al*., 2009)**.** Les travaux sur le tabac ont suggéré que le SA dérivait de la voie des phénylpropanoïdes initiée par la phénylalanine ammonia lyase (PAL); il serait synthétisé à partir de l'acide transcinnamique et de l'acide benzoïque (Métraux, 2002 ; Shah, 2003) au niveau du cytoplasme. D'autres travaux ont montré que la voie de l'isochorismate est une source majeure de SA lors de la SAR chez *A. thaliana* (Wildermuth *et al.,* 2001). Chez les plantes, la majorité du SA produit est glucosylé ou methylé. La conjugaison avec le glucose sur le groupe hydroxyle du SA induit la formation de SA-o-_-glucoside (SAG). Chez A. *thaliana*, les glycosyltransférases UGT74F1 et UGT74F2 catalysent la formation de SAG et UGT74F2 catalyse la formation de SA en l'ester de glucose (SGE) (Dean et Delaney, 2008, Song *et al.,* 2006). Une fois synthétisé, cette forme inactive de SA est transportée du cytosol vers la vacuole où elle est stockée comme source de SA. L'acide salicylique peut également être converti en forme methylée (MeSA) volatile, par l'action de la salicylic acid carboxymethyltransferase (AtBSMT) pour agir comme molécule signal intra- et inter-plantes. Le MESA peut également être glucosylé pour produire le MESA 2-o-_-glucoside (MESAG) mais ce conjugué n'est pas stocké dans la vacuole (Dean *et al*., 2005)**.**

Un grand nombre de mutants ou des plantes transgéniques relatifs à cette voie de défense ont été caractérisés. Les plantes transgéniques *NahG*, incapables d'accumuler le SA, puisqu'elles expriment une hydroxylase bactérienne qui convertit le SA en catéchol (Heck *et al*., 2003), montrent une perte de résistance aux agents pathogènes biotrophes tel que l'oomycète *Hpa* (Thomma *et al.,* 1998). Des mutants d'*Arabidopsis* ont permis d'identifier des protéines impliquées dans la voie de signalisation SA dépendante. Le gène ***SID1*** (également nommé *EDS5*–**enhanced disease succeptibilty**) code une protéine membranaire de type MATE (Multidrug And Toxin Extrusion) qui permet le transport du SA du chloroplaste vers le cytosol (Nawrath *et al.,* 2002, Volt *et al*., 2009). Le gène ***SID2*** (*EDS 16*) code pour **une isochorismate synthase** impliquée dans la biosynthèse du SA**.** Ces mutations respectives réduisent fortement la production de SA normalement observée après l'inoculation par *Hpa* et conduisent à une sensibilité plus importante à l'infection (Nawrath et Metraux, 1999).

4.1.1 Signalisation associée à l'acide salicylique: rôle de NPR1

NPR1 (Non expressor of PR-1 ou Non-inducible immunity 1) est une composante de la voie de signalisation SA dépendante (Pieterse et Van Loon, 2004). Des analyses du mutant *npr1* ont montré que *NPR1* est impliqué dans la mise en place de la RH, et dans la résistance basale (Dong, 2004). En absence d'agent pathogène, la protéine NPR1 se trouve dans le cytoplasme sous forme d'oligomères, liés par des ponts disulfures. En présence d'un pathogène, l'accumulation de SA conduit à un changement de l'état rédox de la cellule et à la réduction des résidus cystéines, puis à la monomérisation de NPR1(Mou *et al.*,2003). Les monomères de NPR1 sont ensuite transloqués dans le noyau, où ils interagissent avec un **facteur de transcription TGA** qui possède une structure de type basic leucin zipper (bZIP) (Johnson et *al.,* 2003). Le facteur de transcription TGA active alors la transcription de gènes de défense , tel que *PR1a* (Kesarwani *et al.,* 2007)**.** Les analyses fonctionnelles effectuées sur les facteurs de transcription de la famille TGA indiquent que le triple mutant *tga2-tga5-tga6* présente une expression réduite de *PR1a* tout comme le mutant *npr1* (Zhang *et al.,* 2003). Ce triple mutant ne semble pas être affecté dans la résistance basale puisqu'il n'est pas sensible aux agents pathogènes. Ces données suggèrent l'intervention d'autres facteurs interagissant avec NPR1.
Des études montrent qu'il pourrait s'agir de **facteurs de transcription de type WRKY** (possédant ce motif d'acides aminés conservé) (Li et *al.,* 2004). Plus particulièrement le facteur **WRKY70** semble jouer un rôle dans l'interconnexion entre la voie SA et JA. La surexpression du gène conduit à l'activation constitutive de SA, et une répression de WRKY70 se traduit par une induction des gènes de réponses jasmonate-dépendants. Cependant, la production de ces deux hormones n'est pas affectée dans ces lignées, indiquant que WRKY70 pourrait être un point d'intégration des signaux SA et JA en aval de la production de ces deux molécules**.**
Le **facteur de transcription WHIRLY** est nécessaire à la résistance basale et la SAR, **AtWHY1** est induit en réponse à une infection avec *Hpa* et contrôle l'expression de *PR1a* indépendamment de la présence de NPR1, ce qui signifie qu'il existe deux voies différentes permettant l'expression de *PR1a* en réponse à SA, l'une dépendante de NPR1 et l'autre indépendante (Desveaux *et al.*, 2004)**.**

4 2 Contribution de l'acide jasmonique et de l'éthylène aux réactions de défense.

Le JA et l'ET sont des hormones végétales impliquées dans de nombreux processus développementaux tels que la germination, la croissance racinaire, la maturation des fruits, l'abscision, et la sénescence (Bleecker et Kende, 2000 ; Turner *et al.,* 2002). Ces deux hormones agissent souvent de façon synergique lors de la mise en place de la résistance.

Le JA est une molécule signal de la famille des oxylipines cycliques dérivés de la voie des octadécanoïdes. Sa synthèse requiert l'action de plusieurs enzymes différentes telles que la **lipoxygénase (LOX), l'allène oxyde synthase (AOS) et l'allène oxyde cyclase (AOC**) (Stenzel *et al,.* 2003)**.** Les trois principaux composants de la voie du JA sont **coronatine insensitive 1 (COI1)**, **jasmonate resistant 1 (JAR1) et Jasmonate ZIM Domain 1 (JAZ1)** (Fonseca *et al*., 2009). COI1 est une protéine F-box d'un complexe SCF (Skip cullin F box) impliquée dans la dégradation des protéines via le protéasome 26S, et est nécessaire à quasiment toutes les réponses mises en place par le JA. JAR1 code une JA aminoacide synthétase impliquée dans la synthèse de l'isoleucine-JA (Ile-JA), considérée comme la molécule bioactive perçue par les plantes. Ile-JA peut diffuser de cellule à cellule et induire l'expression de gènes associés à la résistance aux pathogènes nécrotrophes et aux insectes. (Staswick et Tiryaki, 2004). L'Ile-JA favorise l'interaction entre COI1 et JAZ1. JAZ1 est un répresseur de la transcription des gènes répondant au JA (Thines *et al*., 2007), et l'interaction entre COI1 et JAZ1 conduit à la dégradation de JAZ1 et à la levée de l'inhibition des gènes de défense. Le JA peut aussi être métabolisé en méthyljasmonate (MeJA), qui est une molécule diffusible et volatile importante dans les communications intra- et inter-plantes. Des facteurs de transcription ont également été identifiés comme étant inductibles par le JA**,** comme **l'Ethylene Response Factor 1 (ERF1)** et **MYC2,** un facteur de transcription de type bZIP (Lorenzo *et al*., 2003 ; Lorenzo *et al*., 2004)**.**

L'éthylène est une hormone volatile impliquée dans divers processus de développement tels que la maturation des fruits, la sénescence des fleurs et la chute de feuilles. Il est également important dans des réponses à différents stress chez les plantes, comme les blessures mécaniques et l'infection par les agents pathogènes (Bleeker *et al.,* 2000 ; Guo et Ecker, 2004). L'éthylène est perçu par une famille de 5 récepteurs membranaires du réticulum endoplasmique. En l'absence de signal, ces récepteurs activent la Raf-like kinase **CTR1** qui régule négativement les voies de signalisation à l'éthylène situé en aval de celle-ci. La protéine nucléaire **EIN3** est un facteur de transcription qui régule l'expression d'un autre facteur de transcription, **ERF1 (Ethylene response factor 1)** appartenant à la famille APETALA 2 régulant ainsi l'expression des gènes ET dépendant (Yoo *et al.,* 2009).

4.3 Les interconnexions entre les différentes voies SA, JA et ET : complexité du réseau

Les réponses de défense sont modelées par des interconnexions complexes entre les différentes voies de signalisation qui impliquent le SA, le JA et l'ET (Kunkel et Brooks, 2002)**.** Il a été montré que le JA et l'ET activent le même gène de défense, la **plante defensin 1.2** (*PDF1.2)* (Penninckx *et al.,* 1998). De plus, les voies de signalisation faisant intervenir ces deux hormones sont impliquées dans la résistance contre les mêmes agents pathogènes nécrotrophes (Glazebrook, 2005).

Les protéines **EDS1 (Enhanced disease succeptibility 1) et PAD4 (Phytoalexin deficient 4**) sont au cœur de la régulation de l'activation des différentes voies de défense, en transmettant le signal redox induit en réponse à certains stress biotique et abiotique, activant ainsi la voie du SA, et réprimant d'autre part la voie JA/ET (Wiermer *et al.,* 2005). La protéine **MPK4 (MAP Kinase 4)** constitue aussi un acteur majeur, car en régulant négativement les activités de EDS1 et PAD4, elle favorise la voie du JA et régule négativement l'accumulation du SA et les défenses systémiques associées (Petersen *et al.,* 2000 ; Brodersen *et al.*, 2006). Ainsi, MPK4 joue un rôle capital dans la modulation des effets croisés d'inhibition des voies JA et SA. Un autre régulateur intervenant entre la voie SA et JA est la protéine **Glutaredoxine GRX480**. La glutaredoxine réduit les ponts disulfures des protéines impliquées dans la régulation du système redox, et interagit avec le facteur de transcription TGA. L'expression de GRX480 est induit par SA et nécessite la présence d'un facteur **TGA** et la protéine **NPR1** (Ndamukong et *al.,* 2007). De plus la transcription de *PDF1-2* est inhibée par GRX480. **ERF1 (Ethylene Response Factor 1)** intègre les signaux provenant des voies JA et ET et sa surexpression induit l'activation de plusieurs gènes de défense, se traduisant par une augmentation de la résistance à plusieurs champignons hémi-biotrophes et nécrotrophes comme *Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporum* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002 ; Lorenzo *et al.*, 2003).

Ces trois voies de signalisation régulent l'expression des gènes de défense propres à chacune (Pieterse *et al.*, 2009). Ainsi, le **gène marqueur** de la voie dépendante du **SA est le gène *PR1a*** dont l'expression est activée par NPR1 (Durrant et Dong, 2004). Les voies dépendantes du **JA et de l'ET** conduisent toutes deux à l'expression du gène ***PDF1.2*** (Guo et Ecker, 2004). L'activation du gène ***VSP2*** **(Vegetative storage protein2)** est observée seulement dans le cas de la **voie JA** en réponse à la blessure mécanique ou dû aux insectes (Pieterse *et al.*, 2009)

5. Contribution dans les réactions de défense des phytohormones impliquées initialement dans la biologie du développement et la croissance

L'intervention d'autres phytohormones dans la régulation des défenses a été décrite, avec des rôles importants pour les auxines, l'acide gibbérellique (GA), ou encore de l'acide abscissique (ABA) (Bari et Jones, 2009).

5.1 Les auxines

L'indole-3-acetic acid (IAA), est une auxine essentielle dans la régulation de croissance des plantes et le développement, et est impliquée dans la sensibilité des plantes. Chez la plante *A. thaliana***,** les gènes GH3 codent pour des IAA-amido synthétases qui sont impliquées dans l'homéostasie de l'auxine en régulant la conjugaison de l'IAA à des acides aminées (Staswick *et al.,* 2005). Des études ont montré l'implication de tels gènes lors d'interaction biotrophe. Par exemple, la surexpression du gène *GH3*.5 chez *A. thaliana* conduit à une accumulation importante de SA et une augmentation de l'expression du gène *PR1a* en réponse à l'agent pathogène *Pseudomonas syringae (P.syringae).* Un mutant de *gh3.5* montre des niveaux élevés de l'IAA libre après infection par *P.syringae* et une augmentation de la sensibilité des plantes aux bactéries. Il a ainsi été démontré que la protéine GH3.5 agit comme un modulateur bifonctionnel dans la signalisation SA et auxine (Zhang *et al.,*2007).

5.2 L'acide abscissique

L'ABA est impliqué dans de nombreux processus développementaux tels que la germination, l'inhibition de l'élongation, la sénescence, ainsi que dans la réponse aux stress abiotiques. Cette hormone est surtout impliquée dans des processus d'adaptation au stress hydrique en régulant la fermeture des stomates. Plus récemment des travaux ont mis en évidence le rôle de l'ABA dans la défense contre les microorganismes pathogènes (Bari et Jones, 2009). Dans le cas de la bactérie *P.syringae*, l'ABA joue un rôle positif dans la fermeture des stomates, on parle d'immunité dans la phase pré-invasive, puis une fois la bactérie dans la plante, l'augmentation d'ABA provoquerait une diminution dès l'activation des voies de défense liées au SA. Cette augmentation du niveau de l'ABA serait provoquée par le pathogène pour diminuer les défenses de la plante par une réduction de l'activation des voies SA (de Torres-Zabala *et al.,* 2007).

5.3 Les gibbérellines

Les GA sont des hormones clé dans la levée de dormance et du contrôle de l'élongation des entres nœuds. Les GA permettent la croissance des plantes en stimulant la dégradation des protéines DELLA. Ces protéines sont donc des répresseurs de la croissance. Une analyse basée sur des quadruples mutants de gènes codants des protéines DELLA a montré que la levée de la répression partielle de la voie GA conduit à une sensibilité accrue au champignon nécrotrophe pathogène *Alternaria brassicicola,* mais une résistance aux pathogènes biotrophes *P.syringae et Hpa*. Chez le quadruple mutant DELLA l'infection par la bactérie *P. syringae* provoque une activation des marqueurs de défense SA-dépendants (*PR1a*) et un retard dans l'expression des marqueurs de la voie JA/ET (*PDF1-2*) (Navarro *et*

al., 2008). Les GA contrôlent ainsi les réponses immunitaires des plantes en modulant les réponses de défense SA et JA, au travers une régulation des protéines DELLA.

CHAPITRE 2 :
La sensibilité des plantes à l'infection

Une majorité d'études a porté durant les dernières décennies sur la caractérisation des mécanismes immunitaires permettant à la plante hôte de résister à l'attaque par des agents pathogènes. Ce n'est que récemment que les recherches prennent en compte une théorie selon laquelle les agents pathogènes, pour se développer, auraient besoin de l'action de protéines végétales. Ces protéines sont en fait nécessaires au bon développement de la plante, ce qui conduit à la notion de manipulation de la cellule végétale par l'agent pathogène, et de détournement de fonctions végétales. Certaines situations montrent que la plante contribue à l'attraction des agents pathogènes. Par exemple, les zoospores d'oomycètes ou les bactéries du sol munies d'un flagelle s'orientent grâce aux exsudats racinaires émis par la plante (Yao et Allen, 2006). En absence de ces exsudats, les agents pathogènes seraient incapables de s'orienter pour se diriger vers leur hôte.

Les protéines végétales sont la cible de facteurs de pathogénicité ou de virulence sécrétés par l'agent pathogène au contact des cellules végétales. Ces facteurs de virulence ont principalement pour but de contourner les défenses constitutives ou induites. Ces facteurs interagissent soit directement ou indirectement avec une protéine de l'hôte. Si cette protéine est absente, l'inhibition des défenses ne peut plus se faire. Les cibles de ces facteurs sont donc considérées comme des facteurs de sensibilité.

Des microorganismes sont capables de provoquer des modulations de la production endogène d'un composé hormonal pour perturber l'équilibre existant. Certains microorganismes produisent eux-mêmes des composés hormonaux ou des analogues structuraux. La bactérie phytopathogène ***Ralstonia solanacearum*** (*R. solanacearum*) peut stimuler directement la signalisation par l'auxine en stimulant la synthèse de l'hormone. La bactérie *P.syringae* produit la **phytotoxine coronatine (COR),** qui est un analogue structural de ile-JA capable de moduler l'expression des gènes JA-dépendants dans la plante (da Cunha *et al.,* 2007). L'effet de COR est de stimuler la voie jasmonate et la suppression des défenses SA-dépendantes, permettant à la bactérie d'infecter la plante.

Des facteurs de sensibilité aux oomycètes ont été mis en évidence par des approches génétiques. Les mutants ***dmr*, (Downy Mildew Resistant)** d'*A. thaliana* montrent une résistance à l'infection par l'oomycète *Hpa*, indépendamment de l'activation des voies de défense (Van Damme *et al.*, 2005). Cette résistance est évaluée sur le niveau de sporulation des mutants. Par rapport aux plantes sauvages, la sporulation est réduite considérablement. Des études par microscopie montrent qu'il y a tout de même développement d'hyphes intercellulaires chez certains mutants *dmr*, mais fortement limité. En revanche, la croissance semble stoppée chez le mutant *dmr2* dès la formation du premier site nourricier à l'intérieur de la cellule végétale (que l'on nomme haustorie). Chez le mutant *dmr6*, les

haustories peuvent prendre des formes aberrantes, globuleuses, et le développement des hyphes est rapidement arrêté. Le gène ***DMR6*** code pour une **2oG-Fe(II) oxygénase** de fonction inconnue (Van Damme et *al.*, 2008). Chez le mutant *dmr1*, des appositions de callose sont observées autour des haustories, souvent malformées. Le gène ***DMR1*** code pour une protéine **homosérine kinase (HSK),** une enzyme clé dans le métabolisme primaire des acides aminés (Van Damme *et al.*, 2009). La protéine HSK transforme l'homosérine en O-phospho-homosérine, composé en amont de la synthèse de la méthionine, de la thréonine, et de l'isoleucine, et serait localisé dans les chloroplastes. Cependant, aucune différence de concentration en méthionine, thréonine et isoleucine, n'est observée chez le mutant *dmr1*. Ainsi, ce n'est pas le déficit en acides aminés qui conduit à l'échec de l'infection. Les haustories semblent être piégées par des appositions de callose, et leur structure laisse penser qu'elles sont non fonctionnelles.
Autre exemple, l'accumulation dans la plante d'un composé nocif pour l'oomycète peut en effet être la cause d'une résistance accrue. L'enzyme **caffeate O-methyltransferase (COMT)** est impliquée dans une voie de biosynthèse de la lignine chez les plantes, et l'expression de *COMT* est fortement induite lors de l'infection par *Hpa* (Quentin *et al.*, 2009). Les mutants *comt* présentent une importante diminution du nombre de spores asexuées produites, mais aussi une augmentation de la production d'oospores issues de la reproduction sexuée. Or la reproduction sexuée est engagée par les oomycètes en cas de stress, permettant la formation de spores extrêmement résistantes et capables de survivre dans des conditions environnementales défavorables. L'absence de l'enzyme COMT conduit en fait à l'accumulation dans les tissus du composé toxique hydroxyferuloylmalate (OH-FM). Ce composé à lui seul stimule la reproduction sexuée et la formation des oospores *in vitro*. Ainsi, les oomycètes stimuleraient l'expression de *COMT* afin de réduire la teneur en OH-FM.

CHAPITRE 3 :
Les oomycètes

Les oomycètes constituent un groupe de microorganismes filamenteux d'environ 600 espèces, comprenant des saprophytes, ainsi que des parasites de plantes et d'animaux. Les oomycètes les plus étudiés sont les parasites de plantes, responsables d'importants dégâts sur les cultures agricoles et horticoles. Les oomycètes les mieux connus sont *Phytophthora infestans,* pathogène foliaire responsable de dégâts sur les cultures de pomme de terre, et *Plasmopara viticola,* pathogène de la vigne. Les dernières études phytosanitaires mondiales estiment à 5 milliards d'euros par an les pertes économiques occasionnées, réduisant par exemple de 30% la production de pommes de terre (Stokstad *et al.*, 2006).

1. Oomycètes et champignons : des similitudes et des différences

Parmi les oomycètes phytopathogènes, on peut trouver des **agents biotrophes**, comme *Bremia lactucae* pathogène sur la laitue, *Hyaloperonospora parasitica* sur les choux, et *Plasmopara viticola* sur la vigne. *Phytophthora infestans* ainsi que *Phytophthora sojae* pathogène du soja sont nommés **hémibiotrophes** car leur mode de développement passe d'abord par une phase biotrophe où l'oomycète développe des structures nourricières puis s'en suit la mort des cellules infectées qui accompagne la phase nécrotrophe. Les oomycètes sont des organismes eucaryotes se développant au sein des tissus végétaux sous forme de mycélium, formant des hyphes non cloisonnés, composés de cellules multi-nucléées. Les champignons phytopathogènes ont des cycles de vie très semblables, avec notamment une germination des spores qui s'accompagne d'une formation d'appressorium pour percer la cuticule des feuilles. D'un point de vue macroscopique, les plantes infectées par les oomycètes présentent sur leurs feuilles des taches brunes ou des moisissures blanches et cotonneuses, et arborent un flétrissement de la feuille ou de la plante entière. Ces symptômes peuvent également être causés par des infections à champignons. Bien qu'ils aient des modes d'infection et de développement proches de ceux des champignons (Latijnhouwers *et al.*, 2003), la phylogénie basée sur les données moléculaires classe les oomycètes dans le phylum des Straménopiles très éloigné de celui des champignons vrais (Govers, 2001). Ainsi, les analyses phylogénétiques ont mis en évidence le fait que les oomycètes possèdent des caractéristiques physiologiques et génétiques particulières, qui les différencient des champignons supérieurs. Contrairement aux champignons, les oomycètes possèdent notamment des cellules

diploïdes et des hyphes non-cloisonnés, et ils divergent dans la composition de la paroi cellulaire. Par exemple, les parois des oomycètes sont essentiellement composées de _-1,3-glucane et de _-1,6-glucane, ainsi que de cellulose (_-1,4-glucane), contrairement aux parois des champignons vrais, composées de chitine, un polymère de N-acétylglucosamine. De même, les membranes d'oomycètes ne contiennent pas d'ergostérol, contrairement à celles des champignons. Ainsi, la plupart des fongicides utilisés en agriculture, qui visent des fonctions métaboliques propres aux champignons telles que la synthèse des ergostérols ou de la chitine, sont inefficaces contre les oomycètes.

2. Méthodes de lutte

Au 19ème siècle, des vignerons bordelais ont observé que leurs vignes traitées avec de la « bouillie bordelaise », un mélange de sulfate de cuivre et de chaux éteinte (dihydroxide de calcium), étaient bien mieux protégées contre les attaques de mildiou. Cependant, l'utilisation massive de « bouillie bordelaise » a aussi laissé des traces dans l'environnement, le cuivre s'accumulant de façon persistante dans les sols. En terme de lutte chimique, les produits phytosanitaires de type fongicides/oomycides utilisés dans le cadre de la lutte contre le mildiou représentent 25% des dépenses en fongicides à l'échelle mondiale toutes cultures confondues. Les fongicides de type phénylamide (Metalaxyl) sont les plus utilisés, et ce depuis plusieurs dizaines d'années. Ce type de molécule interfère avec la biosynthèse des ARN (Davidse *et al.*, 1983), en ciblant les ARN polymérases, enzymes présentes dans tous les organismes vivants. Ces molécules à large spectre d'action sont donc hautement toxiques et leur utilisation est aujourd'hui restreinte. Conscients de l'importance des problèmes observés, les autorités françaises ont proposé de nouvelles normes depuis 2007 à la suite du Grenelle de l'Environnement, en particulier dans le programme Ecophyto 2018 qui vise à diminuer de 50 % l'utilisation des pesticides et à supprimer les substances les plus toxiques (http://agriculture.gouv.fr/ecophyto). Pour répondre à ces exigences, des méthodes alternatives de phytoprotection doivent être développés. Une meilleure compréhension des mécanismes régissant l'installation et le maintien de l'agent pathogène au sein de la plante peut conduire à des nouvelles stratégies de lutte. L'un des objectifs est notamment d'identifier les fonctions végétales qui sont manipulées par les agents pathogènes aboutissant à la maladie. La caractérisation de ces fonctions permettra probablement d'identifier des cibles potentielles pour l'élaboration de nouveaux traitements spécifiques contre les oomycètes. Les fonctions végétales ciblées par les oomycètes pourraient également intégrer la sélection variétale, par la recherche d'allèles codant des formes non-fonctionnelles, ou dépourvues des gènes codant des cibles fonctionnelles.

3. Le modèle d'étude : l'interaction entre *Arabidopsis thaliana* et *Hyaloperonospora arabidopsidis*

3.1. Arabidopsis thaliana

A. thaliana appartient à la famille des *Brassicaceae*, qui comprend également des espèces cultivées telles que le colza et le radis. Cette plante présente d'importants avantages pour les recherches en génétique et en biologie moléculaire : elle possède un petit génome (125 Mb), elle est autogame avec un cycle de reproduction rapide et une production importante de graines. Sa culture est facile en espaces restreints et la transformation des ovules en utilisant *Agrobacterium tumefaciens* est possible. Enfin, le génome d'*A.thaliana* est entièrement séquencé et publiquement accessible (http://www.arabidopsis.org/).

3.2. Hyaloperonospora arabidopsidis

Hpa est un oomycète foliaire biotrophe obligatoire qui garde en vie sa plante hôte pour poursuivre l'infection et terminer son cycle de reproduction. Après la germination d'une conidiospore à la surface d'une feuille, l'oomycète pénètre à l'aide d'un appressorium. Des hyphes intercellulaires qui se développent ensuite puisent leurs nutriments dans les cellules végétales, grâce aux haustories. Lorsque le niveau hygrométrique augmente, les hyphes ressortent de la feuille par les stomates et forment des conidiospores**.** Plusieurs souches naturelles ont été identifiées, possédant des profils de compatibilité différents sur les écotypes *d'A.thaliana***.**

CHAPITRE 4 :
Objectifs du travail développé dans ce mémoire

Pour identifier des gènes de la plante ayant un rôle dans la sensibilité aux oomycètes, mon laboratoire d'accueil a développé une approche de « génétique inverse ». Une analyse du transcriptome d'*A. thaliana* à l'aide de puces à ADN (microarrays) contenant la quasi-totalité du génome de la plante en interaction avec *Hpa* en phases précoces et tardives a été menée, afin de déterminer les gènes de la plante dérégulés lors d'une infection (Hok *et al.*, 2011). Au cours de ma formation continue, mon projet de recherche a consisté en l'analyse fonctionnelle d'un gène candidat identifié par cette approche. Il s'agit d'un gène surexprimée en phase précoce et tardive de l'infection et

codant une glycosyltransférase. Les glycosyltransférases sont des enzymes impliquées dans le métabolisme secondaire des plantes. Différentes voies de biosynthèse des métabolites secondaires (MS) ont été montrées comme jouant un rôle important dans les réactions de défense de la plante face à des stress biotiques ou abiotiques. Il s'agit par exemple de la voie des phénylpropanoïdes, de la voie des terpénoïdes, et celle des indoles. (D'Auria et Gershenzon, 2005). Certains MS ont un rôle prépondérant lors de l'infection de la plante. En effet, des monolignols sont généralement responsables du processus de lignification et sont impliqués dans le renforcement des parois, mais certains sont aussi impliqués dans la voie de synthèse des hormones. La plupart des métabolites secondaires sont des molécules de faible poids moléculaire que les plantes synthétisent à partir des produits du métabolisme primaire. Les MS ne s'accumulent pas sous forme libre dans la plante, mais sous forme conjuguée, notamment à des sucres pour former des glycosides.

Les **glycosyltransférases (GT)**, sont des enzymes responsables du transfert d'un sucre simple sur un métabolite secondaire. Elles régulent ainsi la synthèse, l'accumulation, le transport au sein de la cellule et l'activité biologique du composé (Bowles *et al*, 2005 ; Bowles *et al.*, 2006). Les GT sont regroupées dans un schéma de classification qui comprend actuellement 94 familles (base de données CAZy; http://www.cazy.org; Novembre 2011). Ces familles comprennent des enzymes très divergentes des plantes, animaux, champignons, bactéries, et aussi des virus. Le motif PSPG (plant secondary product glycosyltransferase) proche de la partie C-terminale est l'une des rares régions de leurs séquences comportant des similitudes significatives. Ce motif comprend 44 résidus et représente le site de liaison du sucre donneur activé (Gachon *et al.,* 2005 ; Caputi *et al.,* 2012)

Le séquençage du génome d'*A. thaliana* a révélé l'existence d'une extraordinaire abondance de GT, qui se regroupe en 41 familles composées de 454 gènes (http://www.cazy.org/geno/3702.html). La famille 1, la plus abondante, est constituée par les UDP-glycosyltransferases (UGTs) organisées en 14 sous -familles dont l'ensemble est codé par 120 gènes putatifs (Ross *et al.,* 2001 ; Gachon *et al.,* 2005). A l'heure actuelle, seulement 15 % des fonctions de ces UGT sont connus *in planta*.

Les glycosyltransferases de la famille 1 peuvent catalyser le transfert d'une molécule de glucose, ou galactose, rhamnose, xylose, fucose sur un métabolite accepteur (Bowles *et al.,* 2005). Les UGT impliquées dans le métabolisme secondaire des plantes présentent souvent une spécificité de substrat large, du moins dans les expériences *in vitro* avec des protéines recombinantes. Elles reconnaissent une large gamme de produits naturels comme molécules acceptrices. Toutefois, les UGT peuvent aussi être sélectives et les spécificités de substrat de certaines enzymes sont définies par le type d'aglycone, cible de la glycosylation et aussi par la position des fonctions hydroxyles disponibles sur cette aglycone (Lim *et al.,* 2003). Les UGT peuvent glycosyler une gamme de composés très large comme des molécules impliquées dans les réactions de défense. Par exemple les **benzoates** qui sont des acides carboxyliques aromatiques, comme le SA (Lim *et al.,* 2002). Les **phénylpropanoïdes** qui sont multiples (Lanot *et al.,* 2008) sont entre autre des précurseurs de la lignine. Les **glucosinolates** (Grubb et *al.,* 2004) et les **hormones végétales** (Dean et Delaney, 2008) sont régulés également par la

glycosylation. D'autres molécules impliquées dans la physiologie de la plante, comme les **terpénoïdes** (Caputi *et al.,* 2008) et les **flavonoïdes** (Jones *et al.,* 2003) sont également la cible de glycosylation. De plus, les UGT jouent un rôle essentiel dans la détoxication des pesticides (Loutre *et al.,* 2003 ; Brazier-Hicks *et al.,* 2005)**.** Toutefois, ces activités n'ont pu être confirmées *in vivo* que dans quelques cas, probablement à cause du large spectre de substrats de certaines UGT, ou à une quantité limitée en terme de disponibilité du substrat *in vivo* (Gachon *et al.,* 2005; Bowles *et al.,* 2005).

L'*UGT76B1* (locus At3g11340) sélectionné dans notre approche est au premier rang parmi les gènes réagissant au stress (Von Saint Paul *et al.,* 2011). L'objectif a été de mieux comprendre le rôle de ce gène dans le développement de la plante, et dans l'interaction avec l'oomycète pathogène, à travers une analyse phénotypique de mutant inactivé et une analyse spatio-temporelle de l'expression du gène. L'analyse fonctionnelle a permis de mettre en évidence le rôle de cette UGT dans l'établissement de la maladie. Le premier chapitre des résultats décrira les résultats obtenus pour le profil d'expression du gène, au cours du développement et en présence de l'oomycète. Puis je traiterai de l'analyse du mutant d'insertion dans le gène At3g11340, qui présente un phénotype de résistance à l'oomycète impliquant la voie de défense salicylate dépendante. L'analyse fonctionnelle est ensuite poursuivie par une analyse comparative du transcriptome du mutant en interaction. Cette analyse permettra de mieux cibler les gènes dérégulés par cette GT dans la voie salicylate-dépendante. Les résultats seront discutés par rapport aux connaissances actuelles sur les mécanismes de défense des plantes impliquant les différentes voies hormonales.

BIBLIOGRAPHIE

Asselbergh, B , De Vleesschauwer, D et Hofte, M. (2008) Global Switches and Fine-Tuning ABA Modulates Plant Pathogen Defense Molecular Plant-Microbe Interaction **21** (6): 709-719.

Bari, R. et Jones, J. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Molecular Biology **69**(4): 473-488.

Berrocal-Lobo, M. et Molina, **A.** (2004). Ethylene response factor 1 mediates Arabidopsis resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. Molecular Plant-Microbe Interactions **17**(7): 763-770.

Bittner-Eddy, PD, Allen, RL, Rehmany, AP, Birch, P, Beynon, JL. (2003). Use of suppression subtractive hybridization to identify downy mildew genes expressed during infection of *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant Pathology **4**(6): 501-507.

Bleecker, A. B. et Kende, H. (2000). Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. Annual Review of Cell and Developmental Biology **16**: 1-18

Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E. K. et Poppenberger, B. (2005). Glycosyltransferases: managers of small molecules. Current Opinion in Plant Biology **8**(3): 254-263.

Bowles, D., Lim, E. K., Poppenberger, B. et Vaistij, F. E. (2006). Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. Annual Review of Plant Biology **57**: 567-597.

Brazier-Hicks, M. et Edwards, R. (2005). Functional importance of the family 1 glucosyltransferase UGT72B1 in the metabolism of xenobiotics in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal **42**(4): 556-566.

Brodersen, P., Petersen, M., Nielsen, H. B., Zhu, S. J., Newman, M. A., Shokat, K. M., Rietz, S., Parker, J. et Mundy, J. (2006). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. The Plant Journal **47**(4): 532-546.

Caputi, L., Lim, E. K. et Bowles, D. J. (2008). Discovery of new biocatalysts for the glycosylation of terpenoid scaffolds. Chemistry - A European Journal **14**(22): 6656-6662.

Caputi, L., Malnoy, M., Goremykin, V., Nikiforova, S. et Martens, S. (2012). A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land. The Plant Journal **69**(6): 1030–1042

Clough, S. J. et Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal **16**(6): 735-743.

Da Cunha, L., Sreerekha, M. V. et Mackey, D. (2007). Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens. Current Opinion in Plant Biology **10**(4): 349-357.

D'Auria, J. et Gershenzon J. (2005). The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. Current Opinion in Plant Biology **8**(3): 308–316

Davidse, L. C., Hofman, A. E. et Velthuis, G. C. M. (1983). Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from *Phytophtothora megasperma* f. sp. *medicaginis*. Experimental Mycology **7**(4): 344-361.

de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M. H., Lafforgue, G., Mansfield, J. W., Egea, P. R., Bogre, L. et Grant, M. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. EMBO Journal **26**(5): 1434-1443.

Dean, J. V. et Delaney S. P. (2008). Metabolism of salicylic acid in wild-type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*. Physiologia Plantarum **132**(4): 417-425.

Dean, J. V., Mohammed, L. A. et Fitzpatrick, T. (2005). The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. Planta **221**(2): 287-296.

Deslandes, L., Pileur, F., Liaubet, L., Camut, S., Can, C., Williams, K., Holub, E., Beynon, J., Arlat, M. et Marco, Y. (1998). Genetic characterization of *RRS1*, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. Molecular Plant-Microbe Interactions **11**(7): 659-667.

Desveaux, D., Subramaniam, R., Despres, C., Mess, J. N., Levesque, C., Fobert, P. R., Dangl, J. L. et Brisson, N. (2004). A whirly transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. Developmental Cell **6**(2): 229-240.

Dong, X. N. (2004). NPR1, all things considered. Current Opinion in Plant Biology **7**(5): 547-552.

Doyle, J. J. et Doyle, J. L. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus **12**:13-15

Durrant, W. E. et Dong X. (2004). Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology **42**: 185-209.

Ferrari, S., Plotnikova, J. M., De Lorenzo, G. et Ausubel, F. M. (2003). Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. The Plant Journal **35**(2): 193-205.

Fickers, P., Destain, J. et Thonart, P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement **12**(2): 119-130.

Flor, H. H. (1971). Current status of gene for gene. Annual Review of Phytopathology **9**: 275-296

Fonseca, S., Chico, J. M. et Solano, R. (2009). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. Current Opinion in Plant Biology **12**(5): 539-547.

Gachon, C. M. M., Langlois-Meurinne, M. et Saindrenan, P. (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. Trends in Plant Science **10**(11): 542-549.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. et Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research **50**(1): 151-158.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology **43**: 205-227.

Glazebrook, J. et Ausubel, F. M. (1994). Isolation of phytoalexin deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(19): 8955-8959.

Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E. E., Crute, I. R., Holub, E. B. , Hammerschmidt, R. et Ausubel, F. M. (1997). Phytoalexin-deficient mutants of Arabidopsis reveal that *PAD4* encodes a regulatory factor and that four *PAD* genes contribute to downy mildew resistance. Genetics **146**(1): 381-392.

Goellner, K. et Conrath, U. (2008). Priming : It's all the world to induced disease resistance. European Journal of Plant Pathology **121**(3): 233-242.

Gou, M. Y., Su, N., Zheng, J., Huai, J. L., Wu, G. H., Zhao, J. F., He, J. G., Tang, D. Z., Yang, S. H. et Wang, G. Y. (2009). An F-box gene, *CPR30*, functions as a negative regulator of the defense response in Arabidopsis. The Plant Journal **60**(5): 757-770.

Govers, F. (2001). Misclassification of pest as 'fungus' puts vital research on wrong track. Nature **411**(6838): 633-633.

Grubb, C. D., Zipp, B. J., Ludwig-Muller, J., Masuno, M. N., Molinski, T. F. et Abel, S. (2004). Arabidopsis glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. The Plant Journal **40**(6): 893-908.

Guo, H. W. et Ecker, J. R. (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. Current Opinion in Plant Biology **7**(1): 40-49.

Halkier, B. A. et Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. Annual Review of Plant Biology **57**: 303-333.

Heck, S., Grau, T., Buchala, A., Metraux, J. P. et Nawrath, C. (2003). Genetic evidence that expression of *NahG* modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the Arabidopsis-*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* interaction. The Plant Journal **36**(3): 342-352.

Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. et Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome Biology **8**(2): R19.

Hills, M. J. et Mukherjee, K. D. (1990). Triacylglycerol lipase from rape (*Brassica napus* L) suitable for biotechnogical purposes. Applied Biochemistry and Biotechnology **26**(1): 1-10.

Hirsch, J., Deslandes, L., Feng, D. X., Balague, C. et Marco, Y. (2002). Delayed symptom development in *ein2-1*, an Arabidopsis ethylene-insensitive mutant, in response to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology **92**(10): 1142-1148.

Hok, S. (2010). Identification d'un récepteur *d'Arabidopsis thaliana* de type LRR-RLK et caractérisation de son rôle pour le développement des oomycètes phytopathogènes. Thèse de doctorat de l'Université de Nice, 141 pages.

Hok, S., Danchin, E., Allasia, V., Panabières, F., Attard, A. et Keller, H. (2011). An Arabidopsis (malectin-like) leucine-rich repeat receptor-like kinase contributes to downy mildew disease. Plant, Cell and Environement **34**(11): 1944-1957.

Hong, Z., Zhang, Z., Olson, J. M. et Verma, D. P. (2001). A novel UDP-glucose transferase is part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate. Plant Cell **13**(4): 769-780.

Hou, B., Lim, E. K., Higgins, G. S. et Bowles, D. J. (2004). N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Biological Chemistry **279**(46): 47822-47832.

Jackson, R. G., Lim, E. K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford D. A., et Bowles, D. J. (2001). Identification and biochemical characterization of an Arabidopsis indole-3-acetic acid glucosyltransferase. Journal of Biological Chemistry **276**(6): 4350-4356.

Johnson, C., Boden, E. et Arias, J. (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. The Plant Cell **15**(8): 1846-1858.

Jones, J. D. G. et Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. Nature **444**(7117): 323-329.

Jones, P., Messner, B., Nakajima, J., Schäffner, A. R. et Saito, K. (2003). UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Biological Chemistry **278**(45): 43910-43918.

Karimi, M., De Meyer, B. et Hilson, P. (2005). Modular cloning in plant cells. Trends in Plant Science **10**(3): 103-105.

Kesarwani, M., Yoo, J. et Dong, X. (2007). Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. Plant Physiology **144**(1): 336-346.

Koornneef, A. et Pieterse, C. M. J. (2008). Cross talk in defense signaling. Plant Physiology **146**(3): 839-844.

Kumar, D. et Klessig, **D. F.** (2003). High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(26): 16101-16106.

Kunkel, B. N. et Brooks, D. M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Current Opinion in Plant Biology **5**(4): 325-331.

Kwon, S. J., Jin, H. C., Lee, S., Nam, M. H., Chung, J. H., Il Kwon, S., Ryu, C. M. et Park, O. K. (2009). GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in Arabidopsis. The Plant Journal **58**(2): 235-245.

Lanot, A., Hodge, D., Lim, E. K., Vaistij, F. E. et Bowles, D. J. (2008). Redirection of flux through the phenylpropanoid pathway by increased glucosylation of soluble intermediates. Planta **228**(4): 609-616.

Laroche, M., Aspart, L., Delseny, M. et Penon, P. (1984). Characterization of radish (*Raphanus sativus*) storage proteins. Plant Physiology **74**(3): 487-493.

Latijnhouwers, M., de Wit, P. J. G. M. et Govers, F. (2003). Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. Trends in Microbiology **11**(10): 462-469.

Lee, D. S., Kim, B. K., Kwon, S. J., Jin, H. C. et Park, O. K. (2009). Arabidopsis GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling. Biochemical and Biophysical Research Communications **379**(4): 1038-1042.

Li, J., Brader, G. et Palva, E. T. (2004). The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. The Plant Cell **16**(2): 319-331.

Lim, E. K., Doucet, C. J., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S. P., Ross, J. et Bowles, D. J. (2002). The activity of Arabidopsis glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. Journal of Biological Chemistry **277**(1): 586-592.

Lim, E. K., Baldauf, S., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S. P., Jackson, R. G., Taguchi, G., Ross, J. et Bowles, D. J. (2003). Evolution of substrate recognition across a multigene family of glycosyltransferases in Arabidopsis. Glycobiology **13**(3): 139-145.

Lim, E. K. et Bowles, D. J. (2004). A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. Embo Journal **23**(15): 2915-2922.

Lorenzo, O., Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Serrano, J. J. S. et Solano, R. (2003). Role of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in the response to pathogens in Arabidopsis. In: Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene III; Nato Science Series, Sub-Series I: Life and Behavioural Sciences **349**: 158-163.

Lorenzo, O., Chico, J. M., Sanchez-Serrano, J. J. et Solano, R. (2004). Jasmonate-insensitive1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. The Plant Cell **16**(7): 1938-1950.

Loutre, C., Dixon, D. P., Brazier, M., Slater, M., Cole, D. J. et Edwards, R. (2003). Isolation of a glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* active in the metabolism of the persistent pollutant 3,4-dichloroaniline. The Plant Journal **34**(4): 485-493.

Metraux, J. P. (2002). Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. Trends in Plant Science **7**(8): 332-334.

Meuwly, P. et Metraux, J. P. (1993). Ortho-anisic as internal standard for the simultaneous quantification of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. Analytical Biochemistry **214**(2): 500-505.

Mou, Z., Fan, W. H. et Dong, X. N. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. Cell **113**(7): 935-944.

Mur, L. A. J., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H. et Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? Journal of Experimental Botany **59**(3): 501-520.

Navarro, L, Dunoyer, P, Jay, F, Arnold, B, Dharmasiri, N, Estelle, M, Voinnet, O et Jones , J. D. G (2006) A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling Science **312** (5772): 436-439

Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N. P. et Jones, J. D. G (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance and salicylic acid signaling. Current Biology **18**(9): 650-655.

Nawrath, C. et Metraux, J. P. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. The Plant Cell **11**(8): 1393-1404.

Nawrath, C., Heck, S., Parinthawong, N. et Metraux, J. P. (2002). EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. The Plant Cell **14**(1): 275-286.

Ndamukong, I., Al Abdallat, A., Thurow, C., Fode, B., Zander, M., Weigel, R. et Gatz, C. (2007). SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive *PDF1.2* transcription. The Plant Journal **50**(1): 128-139.

O'Connell, R. J. et Panstruga, R. (2006). Tete-à-tete inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. New Phytologist **171**(4): 699-718.

Pedley, K. F. et Martin, G. B. (2005). Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. Current Opinion in Plant Biology **8**(5): 541-547.

Penninckx, I. A. M. A., Thomma, B. P. H. J., Buchala, A., Metraux, J. P. et Broekaert, W. F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. The Plant Cell **10**(12): 2103-2113.

Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H. B., Lacy, M., Austin, M. J., Parker, J. E., Sharma, S. B., Klessig, D. F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A. B. et Mundy, J (2000). Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. Cell **103**(7): 1111-1120.

Pieterse, C. M. J., vanWees, S. C. M., Hoffland, E., vanPelt, J. A. et vanLoon, L. C. (1996). Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. The Plant Cell **8**(8): 1225-1237.

Pieterse, C. M. J et van Loon, L. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology **7**(4): 456-464.

Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. et Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nature Chemical Biology **5**(5): 308-316.

Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschnig, C. et Adam, G. (2003). Detoxification of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. Journal of Biological Chemistry **278**(48): 47905-47914.

Quentin, M., Allasia, V., Pegard, A., Allais, F., Ducrot, P. H., Favery, B., Levis, C., Martinet, S., Masur, C., Ponchet, M., Roby, D., Schlaich, N. L., Jouanin, L. et Keller, H. (2009). Imbalanced lignin biosynthesis promotes the sexual reproduction of homothallic oomycete pathogens. PLoS Pathogens **5**(1): e1000264

Rauhut, T. et Glawischnig E. (2009). Evolution of camalexin and structurally related indolic compounds. Phytochemistry **70**(15-16): 1638-1644.

Ross, J., Li, Y., Lim, E. et Bowles, D. J. (2001). Higher plant glycosyltransferases. Genome Biology **2**(2): 3004.

Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M. A., Cammue, B. P. A. et De Bolle, M. F. C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry **46**(11): 941-950.

Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. Current Opinion in Plant Biology **6**(4): 365-371.

Song, J. T. (2006). Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, AtSGT1, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. Molecules and Cells **22**(2): 233-238.

Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Metraux, J. P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L. C., Dong, X. N. et Pieterse, C. M. J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. The Plant Cell **15**(3): 760-770.

Staswick, P. E. et Tiryaki I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated

by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. The Plant Cell **16**(8): 2117-2127.

Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C. et Suza, W. (2005). Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. The Plant Cell **17**(2): 616-627.

Stelmach, B. A., Muller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavecz, M. et Weiler, E.W.(2001) A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. Journal of Biological Chemistry **276**(16): 12832-12838.

Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I. et Wasternack, C. (2003). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology **51**(6): 895-911.

Stokstad, E. (2006). Genomes highlight plant pathogens' powerful arsenal. Science **313**(5791): 1217.

Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G. H., Nomura, K., He, S. Y., Howe, G. A. et Browse, J (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. Nature **448**(7154): 661-662.

Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A. et Broekaert, W. F (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(25): 15107-15111.

Tohge,T., Nishiyama, Y., Hirai, M Y., Yano, M., Nakajima, J., Awazuhara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M. et Saito, K. (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. The Plant Journal **42**(2): 218-235.

Ton, J., D'Alessandro, M., Jourdie, V., Jakab, G., Karlen, D., Held, M., Mauch-Mani, B. et Turlings, T. C. J (2007). Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. The Plant Journal **49**(1): 16-26.

Turner, J. G., Ellis, C. et Devoto, A. (2002). The jasmonate signal pathway. The Plant Cell **14**: S153-S164.

Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. et Ryals, J. (1992). Acquired resistance in Arabidopsis. The Plant Cell **4**(6): 645-656.

Uma, B., Rani, T. S. et Podile, A. R. (2011). Warriors at the gate that never sleep: Non-host resistance in plants. Journal of Plant Physiology **168**(18): 2141-2152.

van Damme, M., Andel, A., Huibers, R. P., Panstruga, R., Weisbeek, P. J. et van den Ackerveken, G (2005). Identification of Arabidopsis loci required for susceptibility to the downy mildew pathogen *Hyaloperonospora parasitica*. Molecular Plant-Microbe Interactions **18**(6): 583-592.

van Damme, M., Huibers, R. P., Elberse, J. et van den Ackerveken, G (2008). Arabidopsis *DMR6* encodes a putative 2OG-Fe(II) oxygenase that is defense-associated but required for susceptibility to downy mildew. The Plant Journal **54**(5): 785-793.

van Damme, M., Zeilmaker, T., Elberse, J., Andel, A., de Sain-van der Velden, M. et van den Ackerveken, G (2009). Downy mildew resistance in Arabidopsis by mutation of homoserine kinase. The Plant Cell **21**(7): 2179-2189.

van Loon, L. C., Rep, M. et Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology **44**: 135-162.

Vlot, A. C., Dempsey, D. A. et Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. Annual Review of Phytopathology **47**: 177-206.

von Saint Paul, V., Zhang, W., Kanawati, B., Geist, B., Faus-Kessler, T., Schmitt-Kopplin, P. et Schaffner, A. R. (2011). The Arabidopsis glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. The Plant Cell **23**(11): 4124-4145.

Wang, D., Amornsiripanitch, N. et Dong, X. N. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. PLoS Pathogens **2**(11): e123.

Wiermer, M., Feys, B. J. et Parker, J. E. (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. Current Opinion in Plant Biology **8**(4): 383-389.

Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. et Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature **414**(6863): 562-565.

Yao, J. et Allen, C. (2006). Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. Journal of Bacteriology **188**(10): 3697-3708.

Yoo, S. D., Cho, Y. H. et Sheen, J. (2009). Emerging connections in the ethylene signaling network. Trends in Plant Science **14**(5): 270-279.

Zhang, Y. L., Tessaro, M. J., Lassner, M. et Li, X. (2003). Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. The Plant Cell **15**(11): 2647-2653.

Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P. E., Wang, M., Zhu, Y. et He, Z. (2007). Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during Arabidopsis-*Pseudomonas syringae* interaction. Plant Physiology **145**(2): 450-464.

Zhou, N., Tootle, T. L. et Glazebrook, J. (1999). Arabidopsis PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. The Plant Cell **11**(12): 2419-2428.

Zimmerli, L., Jakab, C., Metraux, J. P. et Mauch-Mani, B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta-aminobutyric acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(23): 12920-12925.