

Caractérisation des cellules bordantes et du mucilage chez la pomme de terre (Solanum tuberosum): rôle dans la défense racinaire?

Abdoul Salam Koroney

► To cite this version:

Abdoul Salam Koroney. Caractérisation des cellules bordantes et du mucilage chez la pomme de terre (Solanum tuberosum): rôle dans la défense racinaire?. Biologie végétale. Université de Rouen; Université de Niamey, 2015. Français. NNT: . tel-02053677

HAL Id: tel-02053677 https://normandie-univ.hal.science/tel-02053677

Submitted on 1 Mar 2019 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE EN CO-TUTELLE INTERNATIONALE

Pour obtenir le grade de Docteur

Opéré par l'Université de Rouen et l'Université Niamey (Niger)

Spécialité Biologie Végétale

Caractérisation des cellules bordantes et du mucilage chez la pomme de terre (Solanum tuberosum) : rôle dans la défense racinaire ?

Présentée et soutenue publiquement par **Abdoul Salam Koroney**

Thèse soutenue publiquement le 17 Septembre 2015 devant le jury composé de			
Mr Jean-Louis Hilbert	Professeur, Université de Lille 1	Rapporteur	
Mme Catherine Rayon	Maitre de conférences HDR, Université de Picardie Jules Verne	Rapporteur	
Mr Azeddine Driouich	Professeur, Université de Rouen	Examinateur	
Mr Hassan Oulyadi	Professeur, Université de Rouen	Examinateur	
Mr Eric Nguema-Ona	Docteur, Chef de projet Timac Agro-Roullier International	Examinateur	

Thèse dirigée par : Maïté Vicré-Gibouin, laboratoire Glyco-MEV, Université de Rouen Laurence Menu-Bouaouiche, laboratoire Glyco-MEV, Université de Rouen Ramatou Sidikou, laboratoire Biotechnologie Végétale, Université de Niamey











REMERCIEMENTS

Tous mes remerciements

A Jean-Louis Hilbert de l'Université de Lille 1 et Catherine Rayon de l'Université de Picardie Jules Verne d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Mes remerciements s'adressent également à tous les membres du jury.

A Patrice LEROUGE et Azzedine DRIOUICH pour m'avoir ouvert les portes du Laboratoire Glyco-MEV EA-4358 pendant mes stages de Master et tout le long de cette thèse. Il fait bon de travailler à Glyco-MEV et on vous doit cette atmosphère si particulière au laboratoire qui entraine l'esprit à l'apprentissage de la science dans la bonne humeur. Un grand merci à Azzedine pour son soutien mais aussi pour l'initiation au culte de la rigueur scientifique.

A mes Directrices de thèse au sein de Glyco-MEV, Maité Vicré-Gibouin et Laurence Menu-Bouaouiche pour tout le temps qu'elles m'ont accordé dans la réalisation de ce projet de thèse. Merci à Laurence de m'avoir accueilli tout petit déjà au laboratoire et de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche en étant dans mon encadrement du Master 1 jusqu'à ce jour. Merci à Maité pour les discussions scientifiques soutenues ainsi que pour mon initiation au monde de l'enseignement à travers mon contrat d'ATER signé avec l'Université de Rouen.

Au Pr Sidikou Ramatou, ma codirectrice de l'Université Abdou Moumouni de Niamey de m'avoir accepté comme thésard sur une cotutelle et avoir cru en ce projet de thèse. Merci également pour les conseils avisés et le soutien au vu de mon insertion dans le corps des enseignants-chercheurs du Niger.

A Virginie Gobert-Deveaux de m'avoir ouvert les portes du monde de la pomme de terre en France. En effet, mon projet de thèse a pris son véritable envol suite à votre invitation au comité scientifique de la SIPRE à Achicourt dans votre cathédrale de la pomme de terre comme le dirait Mr Aublé. Un grand merci également pour les kilos de tubercules et de vitroplants mis à ma disposition durant tout ce projet.

A Florence Val, votre rencontre m'a fait prendre confiance dans la démarche choisie pour ce projet de thèse. Comme vous l'avez souligné, parler de la racine de pomme de terre suscite une grande interrogation alors j'ose à peine imaginer le fait de parler des cellules frontières.

A Martine et Jacques Aublé pour m'avoir fourni les fameuses graines de pomme de terre si difficile à trouver. Vous faites un travail remarquable au sein de l'association Agro Sans Frontière Normandie, je vous souhaite beaucoup de succès.

A Caroline Bérard, pour son aide précieuse en informatique et dans l'écriture du script en R. J'espère arriver à coder aussi facilement que vous.

Aux membres permanents du laboratoire Glyco-MEV, c'était un réel plaisir de passer toutes ces années à vos côtés.

A Sophie Bernard et Carole Burel, pour votre aide dans la rédaction de ce manuscrit, mais aussi pour vos conseils avisés. Merci à Marie-Laure Follet-Gueye pour sa disponibilité et les relectures de dernière minute.

A nos deux super Post-doctorant, Eric alias Mr Sucre (sucre dans le sens biochimique bien sûr) et Abder alias Merci pour les discussions sympa au-delà du monde scientifique.

Au « Quite office » anciennement « Boring office » puis nouvellement baptisé « Wonderful office ». Maxime, Barbara, Raj, Alexis et Johnny, ce fut un réel plaisir de partager le bureau avec vous. Un grand merci à Maxime pour son expertise en microscopie mais aussi pour les discussions autour du devenir du monde (eh oui, on est ambitieux).

Au «Coolest office » (Christelle, François, Romain et Youssef) et au «South Park office » (Marie, Rim, Clément et Gaëtan). Merci pour le partage de la bonne humeur et pour l'organisation des déjeuners, dîners, et autres soirées scientifiques qui sont importantes pour la cohésion des doctorants et des stagiaires au sein du labo. Merci à notre 007, devenu récemment Dr François pour son aide précieuse en chromatographie.

A mes chers parents et à l'ensemble de la famille Koroney qui m'ont accordé un soutien sans faille dans mes études même s'ils commencent à trouver que c'est un peu long quand même. Je tiens également à remercier ma belle-sœur Saadatou pour son soutien et ses conseils. J'espère que tu passeras devant le jury dans les prochaines semaines pour ta soutenance de Doctorat.

Et enfin à Katia, la femme avec laquelle j'ai signé un CDI pour le restant de ma vie. Merci pour les encouragements, le soutien, et surtout la patience car ce n'est pas évident pour une économiste du pétrole d'entendre parler de cellules bordantes à longueur de journée.

SOMMAIRE GENERAL

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE GENERAL

SOMMAIRE DÉTAILLÉ

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CHAPITRE I. Introduction Bibliographique

CHAPITRE II. Matériels et Méthodes

CHAPITRE III. Résultats

- CHAPITRE IV. Discussion
- CHAPITRE V. Conclusion et perspectives

BIBLIOGRAPHIE

NETOGRAPHIE

ANNEXES

RÉSUMÉ

SOMMAIRE DÉTAILLÉ

CHAPITRE I.	Introduction Bibliographique2
I.1. La por	nme de terre et ses maladies6
I.1.1. Le	es solanacées
I.1.2. Bo	otanique et cycle végétatif de la pomme de terre
I.1.2.1.	Le système aérien
I.1.2.2.	L'appareil souterrain
I.1.2.3.	Le tubercule
I.1.2.4.	Le cycle végétatif10
I.1.3. La	a pomme de terre en France12
I.1.4. Le	es pathogènes de la pomme de terre16
I.1.4.1.	Phytophthora infestans16
I.1.4.2.	Ralstonia solanacearum18
I.1.4.3.	Pectobacterium
I.2. Interac	ction plantes-pathogènes
I.2.1. De	étection du pathogène26
I.2.2. Le	e système immunitaire des plantes
I.2.2.1.	L'immunité induite par les pathogènes (PTI)26
I.2.2.2.	Immunité induite par les effecteurs (ETI)
I.3. La par	oi végétale : Ligne de défense N°1
I.3.1. Le	es polysaccharides de la paroi
I.3.1.1.	La cellulose
I.3.1.2.	Les hémicelluloses
I.3.1.3.	Les Pectines
I.3.2. Le	es protéines riches en hydroxyproline (HRGPs)
I.3.2.1.	Les protéines riches en proline (PRPs)

I.3.2.2.	Les Extensines	
I.3.2.3.	Les Arabinogalactane-protéines (AGP)	
I.4. Identifie	cation in silico des HRGPS	
I.5. La racir	ne : ligne de défense cachée	
I.5.1. Les	s cellules bordantes (BC)	
I.5.1.1.	Origine et production des cellules bordantes (BC)	
I.5.1.2.	Fonction des BC dans la protection racinaire	
I.5.2. Les	s exsudats racinaires	54
I.5.2.1.	Les exsudats racinaires impliqués dans la défense	56
I.5.2.2.	Les ADN extracellulaires	64
I.6. Le Root	t Extracellular Trap (RET)	68
I.7. Objecti	fs du projet de thèse	69
CHAPITRE II.	Matériels et Méthodes	72
II.1. Matérie	l végétal	72
II.2. Culture	<i>in vitro</i> de « semence vraie » de pomme de terre	72
II.3. Culture	végétative d'explants de pomme de terre	72
II.4. Mise en	n évidence des dépôts de callose	73
II.5. Mise en	n évidence des espèces réactives d'oxygènes (ROS)	73
II.6. Mise en	n évidence des ADN extracellulaires (ADNex)	74
II.7. Mise en	n évidence du chimiotactisme	76
II.8. Effet de	es exsudats racinaires sur la croissance de P. atrosepticum	76
CHAPITRE III.	Résultats	78
III.1. Carac	ctérisation des Cellules Bordantes de pomme de terre	78
III.1.1. C	Culture <i>in vitro</i> de pomme de terre	78
III.1.1.1.	Plantules issues de graines ou « semences vraies »	78
III.1.1.2.	Culture <i>in vitro</i> d'explants de pomme de terre	
III.1.2. H	Etude des BC de plantules issues de graines ou de vitroplants	

III.1.2.1. Mise en évidence des cellules bordantes (BC)	. 82
III.1.2.2. Viabilité des cellules bordantes (BC)	. 84
III.1.2.3. Analyse des polysaccharides pariétaux des BC	. 84
III.2. Implication du système racinaire dans la défense de la pomme de terre	. 86
III.2.1. Production des espèces réactives d'oxygènes (ROS)	. 86
III.2.2. Présence d'ADN extracellulaire dans les sécrétions racinaires	. 88
III.2.3. Chimiotactisme des exsudats racinaires de pomme de terre vis-à-vis de	: Р.
atrosepticum	. 90
III.3. Caractérisation du mucilage de la racine de pomme de terre et effet sur	: la
croissance de Pectobacterium atrosepticum	. 91
III.3.1. Article 1, soumis à Journal of Experimental Botany	. 92
III.3.2. Données supplémentaires	132
III.3.3. J. Exp. Botany : Decision letter	135
III.3.4. Commentaires des reviewers et réponses apportées	135
III.4. Analyse bioinformatique : identification des séquences des HRGPs	144
III.4.1. Elaboration des scripts en langage R	146
III.4.1.1. Script AGP (Annexe 1)	146
III.4.1.2. Script EXT (Annexe 1)	148
III.4.1.3. Script PRPs (Annexe 1)	150
III.4.2. Validation des Scripts	152
III.4.2.1. Application des scripts sur les séquences protéiques d'A. thaliana	152
III.4.2.2. Analyse comparée des séquences identifiées	154
III.4.3. Impact du glycomodule sur la recherche des HRGPs	156
III.4.4. Application à Solanum tuberosum	158
CHAPITRE IV. Discussion	160
CHAPITRE V. Conclusion et perspectives	168

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Production mondiale de pommes de terre 1991-2007 en millions de tonnes (FAO, 2008)
Figure I.2 : Principaux pays producteurs de la pomme de terre en 2012 (FAO, 2012)
Figure I.3 : Valeurs nutritionnelles pour 100 g de pommes de terre cuites avec leur peau et épluchées avant consommation (FAO, 2008)
Figure I.4 : La famille des solanacées5
Figure I.5 : Description générale d'un plant de pomme de terre (Vanderhofstadt et Jouan, 2009)
Figure I.6 : Structure externe d'un tubercule de pomme de terre (Vanderhofstadt et Jouan, 2009)
Figure I.7 : Cycle végétatif et stades de développement de la pomme de terre (Kotchi et Olivier, 2004)
Figure 1.8 : Les différents organismes producteurs de plants en France.(www.plantdepommedeterre.org)11
Figure I.9 : Schéma de la production de plants de pomme de terre en France
Figure I.10 : Etiquette de certification attribuée à un lot
Figure I.11 : Cycle infectieux de <i>Phythophtora infestans</i> (Schumann et D'Arcy. 2000) 15
Figure I.12 : Symptômes foliaires du développement des sporangiophores de P. infestans 15
Figure I.13 : Cycle de vie de la bactérie <i>R. solanacearum</i>
Figure I.14 : Symptôme d'une infection de <i>R. solanacearum</i> sur des tubercules
Figure I.15 : Symptôme de la jambe noire sur des plantes de pomme de terre
Figure I.16 : Symptôme de pourriture molle sur le tubercule de pomme de terre
Figure I.17 : Stratégies d'invasion employées par les pathogènes pour pénétrer la plante 23
Figure I.18 : Schéma récapitulatif présentant les divers éliciteurs
Figure I.19 : Schéma Simplifié de la PTI (Pamp Triggered Immunity)
Figure I.20 : Induction de la production des espèces réactives d'oxygènes (ROS)

Figure I.21 : Induction de dépôt de callose au niveau de la racine et des cellules apparentées
aux cellules de bordure du lin
Figure I.22 : Modèle en Zigzag (adapté de Jones et Dangl, 2006)
Figure I.23 : La paroi primaire végétale de type 1 chez les plantes eudicotylédones
Figure I.24 : Structure et synthèse de la cellulose
Figure I.25 : Représentation schématique des quatre principaux polysaccharides pectiques33
Figure I.26 : Représentation du renforcement pariétal par les HRGPs
Figure I.27 : Les trois classes de PRPs (Rose, 2003)
Figure I.28 : Structure des extensines
Figure I.29 : Localisation des épitopes d'extensines sur des cellules apparentées aux cellules de bordure (BLC) de lin
Figure I.30 : Structure des arabinogalactanes protéines (AGP)
Figure I.31 : Représentation schématique des structures putatives de différentes classes d'AGP chez <i>A. thaliana</i> (d'après Schultz <i>et al.</i> , 2000 et Showalter <i>et al.</i> , 2010)
Figure I.32 : Structure chimique du réactif de Yariv (Showalter, 2001)
Figure I.33 : Stratégie générale de l'analyse bioinformatique des séquences pour la classification des HRGPs (AGP, EXTs, et PRPs) chez Arabidopsis
Figure I.34 : Mise en évidence des cellules bordantes chez plusieurs espèces végétales 49
Figure I.35 : Organisation de l'apex racinaire des plantes angiospermes eudicotylédones 49
Figure I.36 : Organisation des cellules apparentées aux cellules bordantes (BLC)51
Figure I.37 : Attraction et immobilisation des nématodes par les BC du pois51
Figure I.38 : Infection de l'apex racinaire de pois par le champignon pathogène <i>Nectria haematococca</i>
Figure I.39 : Localisation de l'oomycète pathogène A. euteiches sur la racine de pois
Figure I.40 : Représentation de la complexité des interactions entre la rhizosphère et le
système racinaire de la plante, sous la médiation des exsudats racinaires55
Figure I.41 : Cinétique de production d'exsudats racinaire d'orge, de <i>Fusarium graminearum</i>
et de leur interaction

Figure I.42 : Dégradation protéolytique des protéines du « sécrétome », augmentant le degré d'infection de l'apex racinaire de pois
Figure I.43 : Résumé des rôles possible des AGP dans les interactions entre la racine et les microorganismes
Figure I.44 : ADN extracellulaire (ADNex)
Figure I.45 : Perte de la résistance de l'apex racinaire du pois inoculé avec le champignon <i>N</i> . <i>haematococca</i> (N. h.) et traité ensuite avec de la DNase I
Figure I.46 : Observation au microscope confocal de l'interaction entre <i>N. haematococca</i> et l'apex racinaire
Figure I.47 : Root Extracellular Trap (RET)
Figure I.48 : Modèle de fonctionnement du RET (Root Extracellular Trap)67
Figure II.1 : Préparation de la gélose pour le test de chimiotactisme
Figure III.1 : Graine de pomme de terre de variété Touareg
Figure III.2 : Morphologie d'une plantule de pomme de terre de variété Touareg
Figure III.3 : Culture <i>in vitro</i> d'explant de pomme de terre sur milieu gélosé
Figure III.4 : Micropropagation des vitroplants de pomme de terre
Figure III.5 : Détachement des BC de la coiffe racinaire d'une plantule
Figure III.6 : Différents morphotypes des cellules bordantes
Figure III.7 : Viabilité des cellules bordantes (BC) issues d'explants
Figure III.8 : Caractérisation de la paroi cellulaire des cellules bordantes (BC) par approche immunocytochimique
Figure III.9 : Cinétique de production des (ROS) mise en évidence par la sonde CMH2CDFDA au niveau de la racine et les cellules bordantes
Figure III.10 : Contrôle négatif de la production des espèces réactives d'oxygènes (ROS) sur des racines élicitées avec de l'eau stérile
Figure III.11 : ADNex dans le mucilage racinaire des plantules pomme de terre par coloration au Sytox Orange
Figure III.12 : Dispositif expérimental pour la mise en évidence du chimiotactisme des exsudats racinaire de pomme de terre sur <i>P. atrosepticum</i>

I	Figure III.13 : Mise en évidence du chimiotactisme des exsudats racinaire de pomme de terre
S	sur P. atrosepticum
ł	Figure III.14 : Effet des exsudats racinaires de plantules non élicitées de S. tuberosum sur l
C	croissance de <i>P. atrosepticum</i> 14
ł	Figure III.15 : Effet des exsudats racinaires de plantules élicitées de S. tuberosum sur l
0	croissance de <i>P. atrosepticum</i>
ł	Figure III.16 : Stratégie générale de recherche des glycoprotéines de <i>S. tuberosum</i>
I	Figure III.17 : Stratégie de recherche des agrabinogalactanes protéines (AGPs)
ł	Figure III.18 : Stratégie de recherche des Extensines
ł	Figure III.19 : Stratégie de recherche des PRPs14
ł	Figure III.19 : Répartition des 570 HRGPs identifiées chez <i>S. tuberosum</i> avec l'utilisation de
S	Scripts AGP, EXIs et PKPs 15

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Dynamique de production de protéines lors d'une induction de séparation des
BC
Tableau I.2 : Chronologie de la mise en évidence des ADNex dans la défense chez les
animaux et les végétaux (adapté de Driouich et al., 2013)
Tableau III.1 : Séquences putatives d'AGPs
Tableau III.2 : Séquences putatives d'Extensines
Tableau III.3 : Séquences putatives de PRPs 151
Tableau III.4 : Séquences putatives d'AGP non identifiées par le « Script AGPs » 153
Tableau III.5 : Séquences putatives d'EXT non identifiées par le « Script EXT » 153
Tableau III.6 : Séquences putatives de PRPs non identifiées par le « Script PRPs »
Tableau III.7 : Séquences putatives d'AGPs identifiées par le « Script AGPs » avec ou sans le
glycomodule
Tableau III.8 : Séquences putatives d'Extensines identifiées par le « Script EXT » avec ou
sans le glycomodule
Tableau III.9 : Séquences putatives de PRPs identifiés par le « Script PRPs » avec ou sans le
glycomodule
Tableau A2.3 : Identification des Proline-rich Proteins (PRPs) d'A. thaliana à travers le
pourcentage des acides aminés P-V-K-C-Y-T ainsi que des motifs répétés KKCPP et
PPVX[K,T] et PPV

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNex : ADN extracellulaire

AGP : Arabinogalactane-protéines

A

Ara : Arabinose

B

 $\boldsymbol{B}\boldsymbol{C}$: Les cellules bordantes

BLC : Les cellules apparentées aux cellules bordantes

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

C

CIP : Comité International de la pomme de terre

CNRS : Centre national de la recherche scientifique

D

DAMP: Damage-Associated Molecular Patterns

E

eBLC : elongated Border Lice Cells

EPPO : European and Mediterranean Plant Protection Organization

ET3 : Effecteurs de type III

ETI : Effector triggered Immunity

ETS : Effector triggered Susceptibility

EXT : Extensines

FAO: Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

F

Flg22 : flagelline 22

FN3PT : La Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre

G

Fuc : Fucose

Gal : Galactose

GalA : Acide Galacturonique

GlucA : Acide Glucuronique

GPI : GlycosylPhosphatidylInositol

GRR : grand Réseau de Recherche

Η

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HG : Homogalacturonanes

HR : Réponse Hypersensible

HRGPs : Hydroxyproline-rich glycoproteines

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

K

KOH : Hydroxyde de potassium

Μ

MAMPs : Microbes-Associated Molecular Patterns

Ν

Man : Mannose

NET : Neutrophil Extracellular Traps

NO• : Oxyde nitrique

0

¹**O**₂ : Oxygène singulet

O₂ : Dioxygène

 O_2 -- : Anion superoxyde

OH• : Radical hydroxyle

ONG : Organisation Non Gouvernementale

ONU : Organisation des Nations Unies

P

P4Hs : Prolyl 4 hydroxylases

PAMPs : Pathogens-Associated Molecular Patterns

PGN : peptidoglycane

PNUD : Programme des Nations Unies pour le Développement

PRP : Protéines riches en proline

PRR : Pathogens Recognition Receptor

PTI : Pathogen Triggered Immunity

R		
RAM : Méristème Apical Racinaire		T3S
RET : Root Extracellular Trap		VAC
RGI : Rhamnogalacturonane I		VAS Inno
RGII : Rhamnogalacturonane II		VOO
ROS : Les espèces réactives d'oxygènes		
rpm : Rotations par minute		WT
S		
sBLC : small Border Lice Cells		X vl

sBLC : small Border Lice Cells

SE : Super Elite

SOC : Officiel de Contrôle et de Certification

T T255 - Sustème de géométion de tune III				
V				
VASI : Végétal, Agronomie, Sols, Innovation				
VOC : Composés Volatiles Organiques				
W				
WT : wild type				
X				

Xyl : Xylose

β-GlcY : β-D-glucosyl Yariv

Codes à 3 et 1 lettre des acides aminés

Nom	3 lettres	1 lettre
alanine	Ala	А
arginine	Arg	R
asparagine	Asn	Ν
aspartate ou acide aspartique	Asp	D
cystéine	Cys	С
glutamate ou acide glutamique	Glu	E
glutamine	Gln	Q
glycine	Gly	G
histidine	His	Н
isoleucine	Ile	Ι
leucine	Leu	L
lysine	Lys	K
méthionine	Met	М
phénylalanine	Phe	F
proline	Pro	Р
sérine	Ser	S
thréonine	Thr	Т
tryptophane	Trp	W
tyrosine	Tyr	Y
valine	Val	V



Figure I.1 : Production mondiale de pommes de terre 1991-2007 en millions de tonnes (FAO, 2008).

CHAPITRE I. Introduction Bibliographique

Changements climatiques, explosion démographique, épuisement des énergies fossiles, diminution de la biodiversité, vieillissement et santé, inégalités croissantes et déséquilibres socio-économiques, sont les principaux défis, complexes et interdépendants, auxquels le monde est actuellement confronté. De grands organismes comme les Nations Unies grâce à leur programme pour le développement (PNUD), s'attèlent à répondre de façon efficace et diversifiée à ces problématiques. Ainsi, l'un des huit objectifs du PNUD est de réduire l'extrême pauvreté et la faim dans le monde.

En 2050, l'humanité devrait dénombrer 9,6 milliards d'individus, soit une augmentation de près de 25% par rapport aux 7,2 milliards d'êtres humains peuplant la terre en 2013 (ONU, 2013). Cette importante croissance démographique, principalement localisée dans les régions les moins développées, va nécessiter un système agricole efficace en termes de production tout en ayant un faible impact sur l'environnement. Dans ce contexte, l'agriculture doit s'adapter et des stratégies coordonnées doivent être élaborées. Afin d'apporter une solution globale, plusieurs groupes de recherches travaillent de concert. Notamment, le centre international de la pomme de la terre (CIP - Pérou), par la voix de sa directrice Mme Pamela Anderson, affirma lors de l'année mondiale de la pomme de terre en 2008, que la culture de la pomme de terre peut contribuer grandement à réduire la faim dans le monde, ainsi que la pauvreté (FAO, 2008).

En effet, le secteur de la pomme de terre est en pleine expansion (**Figure I.1**). En 2007, sa culture est la quatrième plus importante après celle du maïs, du blé et du riz. Jusqu'au début des années 90, la plupart des pommes de terre étaient cultivées et consommées sur le continent européen et en Amérique du Nord. Depuis les années 60, la production cumulée en Asie, Afrique et Amérique latine a été multipliée par 6, de 30 millions de tonnes à plus de 165 millions de tonnes en 2007 (sur les 325 millions de tonnes de la production mondiale). En 2005, pour la première fois, la production de la pomme de terre des pays en développement a dépassé celle des pays développés (**Figure I.1**). Aujourd'hui, la production mondiale atteint 374 millions de tonnes.



Figure I.2 : Principaux pays producteurs de la pomme de terre en 2012 (FAO, 2012).



Figure I.3 : Valeurs nutritionnelles pour 100 g de pommes de terre cuites avec leur peau et épluchées avant consommation (FAO, 2008)

Si le rendement moyen est d'environ 17 tonnes à l'hectare, certains pays développés d'Amérique du Nord et d'Europe occidentale produisent entre 40 et 50 tonnes/ha. Actuellement, la Chine est le premier producteur mondial de pommes de terre (**Figure I.2**). L'Asie fournit environ 30% des tubercules mondiaux, et plus de 50% de la production est assurée par les pays du continent européen. D'un point de vue de la consommation, l'Asie utilise près de la moitié des pommes de terre produites dans le monde. Néanmoins, les plus gros consommateurs (en kg par habitant et par an) sont les Européens (FAO, 2012).

La pomme de terre reste encore sous-utilisée dans certains pays du Tiers Monde, notamment en Afrique sub-saharienne, mais globalement sa production et sa consommation progressent dans les pays en développement. En effet, la culture de la pomme de terre nécessite peu de surface et est adaptée à des conditions climatiques plus rudes que pour les autres grandes cultures. En l'espace de 100 jours, de par son cycle végétatif bref, les rendements sont élevés et des systèmes de double culture (avec le riz) ou de cultures intercalaires (maïs et soja) sont possibles. Ainsi, les récoltes constituent une source de revenus importante pour les petits producteurs en général (FAO, 2008) et pourraientt leur assurer une certaine sécurité alimentaire.

La grande valeur nutritionnelle de la pomme de terre (**Figure I.3**) est, de plus, un atout pour ces familles et la lutte contre la malnutrition. Une fois bouillie, une pomme de terre de taille moyenne fournit environ la moitié des besoins quotidiens d'un adulte en vitamine C, ainsi que d'importantes quantités de fer, de potassium et de zinc. La pomme de terre contient aussi des quantités importantes de vitamine B et apporte des oligo-éléments essentiels tels que le manganèse, le chrome, le sélénium et le molybdène.

Source de revenus et de nutrition, le développement de la culture de la pomme de terre dans les pays émergents pourrait répondre à l'objectif principal défini par l'ONU : diminuer de moitié la population victime de la pauvreté et de la faim.

Néanmoins, certaines maladies de la pomme de terre sont responsables de famines historiques. Par exemple, le mildiou est connu pour avoir provoqué, entre 1845 et 1848, la grande famine irlandaise qui a comptabilisé entre cinq cent mille et un million de mort (Abad et Abad, 1997). Cette crise a poussé les irlandais à immigrer en masse vers les Etats-Unis.

Une meilleure connaissance de la résistance naturelle de la pomme de terre à ses maladies pourra contribuer au développement de sa culture, en toute sécurité sanitaire.



Figure I.4 : La famille des solanacées.

Elle regroupe des plantes d'intérêt économiques et agronomiques tel que l*a* pomme de terre, l'aubergine, le tabac, la tomate, le piment (<u>http://www.exploratheque.net/</u>).

I.1. La pomme de terre et ses maladies

La pomme de terre est une angiosperme, appartenant à la famille des solanacées (*Solanaceae*). Elle a été nommée *Solanum tuberosum* en 1595 par Gaspar Bauhin, naturaliste suisse (1560-1624).

I.1.1. Les solanacées

Les espèces de la famille Solanacées sont extrêmement diverses : selon leur biologie - des herbes annuelles aux arbres pérennes, leur habitat - du désert aux forêts tropicales humides, ou leur morphologie - des fleurs et des fruits (Knapp, 2002). Les Solanacées sont originaires pour leur majorité d'Amérique du Sud et d'Amérique centrale (D'Arcy, 1991).

La famille comprend une centaine de genres et de l'ordre de 2500 espèces (Olmstead *et al.*, 2008), dont une moitié appartient au genre *Solanum* (Weese et Bohs, 2007). Depuis l'avènement des marqueurs moléculaires révélateurs du polymorphisme de l'ADN, la classification des membres de la famille des Solanacées a été réorientée dans une logique phylogénétique et a été assez fortement remaniée (Olmstead *et al.*, 2008). Par exemple le passage des genres *Lycopersicon* et *Cyphomandra* dans le genre *Solanum*.

Le genre *Solanum* regroupe environ 1300 espèces dont plus de 200 sont tubéreuses (Hawkes, 1990). Ces dernières sont regroupées dans la section Petota. L'ensemble de ces espèces forme un groupe ayant un nombre chromosomique de base égal à 12 et allant du niveau diploïde au niveau hexaploïde.

Considérée comme l'une des plus importantes pour l'alimentation humaine, la famille des solanacées représente le troisième taxon d'importance économique. Le genre Solanum inclut des plantes alimentaires (**Figure I.4**), telles que la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), l'aubergine (*S. melongena* L.), la pomme de terre (*S. tuberosum* L.), le piment (Capsicum sp.) et d'autres espèces moins connues comme le pépino (*S. muricatum* Ait.), la narangille (*S. quitoense* Lam) et le cocona (*S. sessiliflorum* Dunal). La famille Solanaceae comprend aussi le tabac (*Nicotiana tabacum* L.), ainsi que de nombreuses espèces utilisées à des fins pharmaceutiques ou ornementales (Olmstead *et al.*, 2008).



Figure I.5 : Description générale d'un plant de pomme de terre (Vanderhofstadt et Jouan, 2009).

I.1.2. Botanique et cycle végétatif de la pomme de terre

La pomme de terre est une plante vivace à multiplication végétative, c'est-à-dire une reproduction à partir des tubercules, mais est également capable de se reproduire par la voie sexuée (floraison et fructification). Elle présente deux types de tiges : des tiges aériennes qui portent les feuilles puis les fleurs et les fruits, et les tiges souterraines, rhizomes ou stolons, sur lesquelles apparaissent les tubercules à leur extrémité (**Figure I.5**).

I.1.2.1. Le système aérien

Le système aérien de la pomme de terre comporte de deux à dix tiges, plus ou moins dressées et à section irrégulière, d'un mètre de long au maximum (**Figure I.5**). Les tiges aériennes naissent à partir du tubercule germé lorsqu'il est utilisé comme semence (tubercule mère). Normalement de couleur verte, elles peuvent exceptionnellement présenter une coloration rouge pourpre. Les feuilles sont insérées sur la tige selon une phyllotaxie spiralée. Elles sont imparipennées et comptent de 7 à 9 folioles de forme lancéolée et de tailles hétérogènes. De plus petites folioles s'intercalent par paires entre les plus grandes. La floraison donne naissance à des inflorescences cymeuses. On compte généralement 7 à 15 fleurs, au maximum une trentaine. Les fleurs sont généralement autogames mais souvent stériles. Les fruits sont des baies sphériques de 1 à 3 cm de diamètre, contenant de nombreuses petites graines albuminées dont l'intérêt est nul en culture habituelle, mais essentiel en sélection variétale (Sidikou, 2002).

Les aspects et colorations des feuilles ainsi que le nombre d'inflorescences, le nombre de fleurs par inflorescence ainsi que la couleur des fleurs (blanche, mauve, bleutée, rouge violacé) caractérisent les différentes variétés de pomme de terre.

I.1.2.2. L'appareil souterrain

A partir du tubercule mère naissent les rhizomes ou stolons, tiges souterraines dont les extrémités renflées constitueront les nouveaux tubercules. Le système racinaire se développe à partir des stolons. Il se compose de racines fasciculées, nombreuses et fines (**Figure I.5**) pouvant pénétrer profondément les sols meubles, jusqu'à 80 cm sous le tubercule mère.



Figure I.6 : Structure externe d'un tubercule de pomme de terre (Vanderhofstadt et Jouan, 2009)



Figure I.7 : Cycle végétatif et stades de développement de la pomme de terre (<u>Kotchi</u> et Olivier, 2004)

I.1.2.3. Le tubercule

Le tubercule (**Figure I.6**), organe de conservation et de multiplication végétative, est formé près de la surface du sol. Il assure la fonction d'organe de stockage des substances de réserve produites par la photosynthèse, et la redistribution des réserves nécessaires au développement et à la croissance du jeune plant (Vanderhofstadt et Jouan, 2009).

Leur nombre (20 au maximum) dépend de la variété, de l'humidité du sol et de sa teneur en éléments nutritifs. Les tubercules sont de forme et de calibre variables et leur poids moyen ne dépasse pas 300 g (FAO, 2008). Le talon (**Figure I.6**) désigne la partie du tubercule du côté du stolon. L'extrémité apicale est à l'extrémité opposée au talon. Les bourgeons se développent à partir des yeux et deviendront un germe, puis un stolon ou une tige. Les lenticelles sont des pores assurant les échanges gazeux, répartis dans l'épiderme du tubercule. Sa structure (forme, couleur, peau, chair, germes) est différente selon les variétés cultivées.

I.1.2.4. Le cycle végétatif

Du cycle végétatif découlent les différents stades de développement (Figure 1.7; Sidikou, 2002).

La phase de croissance : A partir d'un tubercule planté, les germes émergent et se développent en tiges aériennes et en tiges souterraines munies de racines fasciculées. Pendant cette phase de croissance qui dure 30 à 40 jours, la plante vit pratiquement sur les réserves du tubercule mère. Les racines permettent l'apport en eau et en éléments nutritifs exogènes. Les besoins en eau de la plante augmentent avec la croissance foliaire et la tubérisation.

La tubérisation ou formation des tubercules : Après la phase de croissance, la tubérisation commence par un arrêt de l'élongation des stolons. Elle se poursuit pendant la floraison et la fructification, puis s'arrête au cours de la sénescence des feuilles (maturation des tubercules).

Repos végétatif et germination : Dès sa formation, le tubercule de pomme de terre entre en repos végétatif (ou dormance vraie). Il est incapable de germer, même s'il est placé dans des conditions favorables. La durée du repos végétatif est très variable (de 17 à 40 semaines) et dépend principalement de la variété, ou de la température.

La germination peut être provoquée par une blessure ou une meurtrissure, ou par une incubation à 10/15°C ou par la lumière. Les tubercules deviennent alors capables de germer, bouclant ainsi le cycle végétatif (Sidikou, 2002).



Figure 1.8 : Les différents organismes producteurs de plants en France. (www.plantdepommedeterre.org)

I.1.3. La pomme de terre en France

Depuis au moins 7000 ans, la pomme de terre est domestiquée, d'abord près du lac Titicaca dans la cordillère des Andes, puis en Europe vers la fin du XVI^{ème} siècle à la suite de la découverte de l'Amérique (FAO, 2008). Aujourd'hui elle est cultivée dans plus de 150 pays. En France, le pharmacien Parmentier (1737-1813) comprit le premier la nécessité de faire connaître et développer l'ensemble de la « filière pomme de terre », de la production à la consommation, après la famine de 1769-1770. De nos jours, la production pour la consommation oscille entre 4,5 et 5 millions de tonnes par an. La France se situe ainsi au second rang de l'Europe de l'Ouest, derrière l'Allemagne (7 millions de tonnes) et depuis peu devant le Royaume-Uni (4,6 millions de tonnes). Les surfaces cultivées ont nettement diminué dans les années 2000 pour se stabiliser aujourd'hui autour de 115 000 hectares. Dans le même temps, les rendements se sont améliorés, permettant de maintenir le niveau de récolte. La filière pomme de terre française est principalement gérée par la Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre (FN3PT). Créée en 1932, la FN3PT regroupe depuis l'origine les syndicats de producteurs de plants de pommes de terre, et depuis 1994, le Comité Nord, Bretagne Plants, et le Comité Centre & Sud (Figure I.8).

Ces différentes organisations ont pour missions :

- le contrôle et la certification des plants par délégation du Ministère de l'Agriculture

- la production de plants (boutures *in vitro*, mini tubercules)

- l'amélioration des techniques de production et l'appui technique aux producteurs de plants

- l'organisation économique du secteur

- la création variétale et la promotion de la filière aux niveaux national et international.

La sélection variétale est réalisée par 4 stations : Comité Nord, Bretagne Plants, GROCEP et GERMICOPA (structure privée). Ces stations collaborent avec de nombreux partenaires (producteurs, coopératives, négociants). Elles s'appuient sur un important réseau d'essais en Europe pour évaluer le comportement agronomique des nouvelles variétés, choisies pour leurs qualités culinaires, ainsi que pour leur résistance aux maladies.

Ainsi, chaque année sont créées de nouvelles variétés dans tous les créneaux d'utilisation : consommation en frais (primeur, chair ferme...), conservation, exportation, transformation (chips, frites, fécule...).



Figure I.9 : Schéma de la production de plants de pomme de terre en France.

(www.plantdepommedeterre.org)



Figure I.10 : Etiquette de certification attribuée à un lot

1 lot = 1 parcelle, 1 origine, 1 classement (<u>www.plantdepommedeterre.org</u>)

Pour obtenir un haut niveau de qualité des plants, en particulier sanitaire, et pour prendre en compte les besoins des agriculteurs ainsi que les exigences et l'évolution des marchés, les professionnels de la filière ont mis en place un schéma très strict et des méthodes très rigoureuses de production de plants (**Figure I.9**). La totalité du matériel de sélection est issue de culture *in vitro*. Puis, la première année de multiplication est réalisée à l'abri de toute contamination, sous tunnel anti-insecte et sur substrats désinfectés ou en culture hors sol. Ce schéma rigoureux conduit à un nombre limité de générations au champ pour l'obtention des classes Super Elite (SE), Elite (E) et Certifiée (A) (**Figure I.9**).

A la fin de ce processus de production, une étiquette de certification bleue (**Figure I.10**) est délivrée par le Service Officiel de Contrôle et de Certification (SOC). Cette étiquette constitue un justificatif du respect du processus de contrôle et de traçabilité. Elle n'est délivrée que si tous les résultats sont conformes aux normes du règlement technique français.

Le respect strict des normes sanitaires est nécessaire car la culture de la pomme de terre est sujette à de nombreuses maladies dévastatrices pour lesquelles il n'existe que peu de moyens de lutte hormis la destruction et la mise en jachère (quarantaine). Les dommages économiques sont alors très importants, de la destruction totale de la récolte, à la baisse de qualité qui peut conduire à des déclassements importants.

Parmi ces maladies, on peut citer le mildiou provoqué par l'oomycète *Phytophtora infestans* qui est chaque année responsable d'une perte de 5 milliards de dollars, répartie entre les moyens de contrôle utilisés et les pertes économiques engendrées (Haverkort *et al.*, 2009 ; Axel *et al.*, 2012), la pourriture brune provoquée par la bactérie *Ralstonia solanacearum* qui est sans aucun doute l'une des phytobactérioses les plus destructrices à travers le monde ou encore la maladie de la jambe noire provoquée par les bactéries *Pectobacterium atrosepticum* et *Pectobacterium carotovorum*.

Afin d'éviter pareilles situations, le CIP et plusieurs organismes de recherche sur la pomme de terre s'attèlent à étudier la résistance naturelle de la plante pour développer des variétés moins sensibles aux maladies tout en garantissant la qualité nutritionnelle du tubercule, ou en l'améliorant par biofortification.

En France, le FN3PT est partenaire de plusieurs projets de recherche en collaboration avec des centres de recherche publique tels que le CNRS, l'INRA ou encore les universités, telles que l'Université de Rouen au travers du GRR VASI et le laboratoire Glyco-MEV.



Figure I.11 : Cycle infectieux de Phythophtora infestans (Schumann et D'Arcy. 2000)



Figure I.12 : Symptômes foliaires du développement des sporangiophores de *P. infestans* (A). Développement de spots brunâtres sur un tubercule de pomme de terre infecté par *Phytophtora infestans* (adapté de Fry, 1998 ; 2008).

I.1.4. Les pathogènes de la pomme de terre

On dénombre une quarantaine de pathogènes de la pomme de terre à travers le monde : insectes, nématodes, virus, bactéries, oomycètes et champignons (Fiers et al., 2012). Qu'ils soient aériens ou telluriques, le développement de la maladie dépend non seulement des interactions compatibles, mais aussi, dans la majeure partie des cas, de facteurs externes qui vont directement affecter la plante ou le pathogène. Les conditions favorables au développement de la plante, à savoir une température située entre 10 et 25°C, un fort taux d'humidité et un pH intermédiaire, constituent également un environnement adéquat pour le développement des pathogènes telluriques (Fiers et al., 2012). En fonction des dommages provoqués, ceux-ci peuvent être classés en deux groupes suivant qu'ils affectent uniquement le tubercule ou les autres parties de la plante. Au niveau des tubercules, on distingue trois principaux symptômes à savoir la gale, la déformation et la pourriture du tubercule. Au niveau du système aérien, les symptômes correspondent souvent à un ramollissement de la tige avec ou sans formation de sclérotes, comme dans le cas de la jambe noire. On peut également observer des nécroses ou des chloroses qui s'accompagnent parfois de flétrissement. L'ensemble de ces symptômes peuvent être provoqués par les phytopathogènes P. infestans, R. solanacearum, P. atrosepticum et P. carotovorum.

I.1.4.1. Phytophthora infestans

P. infestans, responsable de la maladie du mildiou, est un oomycète. Ce phytopathogène infecte plusieurs espèces de la famille des Solanacées, la pomme de terre, principalement, puis la tomate. *P. infestans* infecte potentiellement n'importe quelle partie de la plante : les feuilles, la tige, les tubercules ou les fruits. Comme la plupart des pathogènes de ce genre, *P. infestans* produit des sporanges sur des sporangiophores. La structuration particulière des sporangiophores en forme de tige permet une dissémination facile des sporanges par le vent. La contamination est alors initiée par des zoospores contenues dans les sporanges qui vont être disséminés sur l'ensemble des plants en culture (**Figure I.11**).

Les premiers symptômes de l'infection correspondent à des petites lésions brunes sur les feuilles ou les tiges de la plante qui vont s'agrandir avec le développement du pathogène dans les tissus (**Figure I.12**) (Fry *et al.*, 2008 ; Axel *et al.*, 2012).



Figure I.13 : Cycle de vie de la bactérie R. solanacearum

Une fois au contact d'une plante hôte, la bactérie va pénétrer le système racinaire de la plante et coloniser son système vasculaire. Une forte multiplication bactérienne ainsi que la synthèse accrue d'exopolysaccharides engendrent le flétrissement de la plante allant jusqu'à la destruction totale. a) Photo de microscopie électronique de la souche GMI1000 de *R. solanacearum.* b) Point d'attache de la bactérie (en rouge) au niveau de la surface racinaire observée au microscope confocal à balayage laser. c) Observation des bactéries (points verts) exprimant la *Green Fluorescent Protein* (GFP) sur la surface racinaire de la tomate. d) Suintement des bactéries provenant d'une tige de tomate infectée dans l'eau. e) Suppuration d'exopolysaccharides produits par les bactéries sur une coupe transversale de tige (Genin, 2010).

Quant aux symptômes au niveau du tubercule, ils se manifestent par des spots brunâtres ou pourpres à la surface de ce dernier. L'infection du tubercule est majoritairement due à l'infiltration des sporanges provenant des tiges et des feuilles infectées entrainés par l'eau à travers le sol. *P. infestans* peut ainsi survivre dans le sol jusqu'à la prochaine saison, ce qui rend encore plus difficile son éradication. Malgré son apparition depuis plus de 160 ans, *P. infestans* constitue encore un problème majeur pour la production de la pomme de terre et son contrôle résulte essentiellement dans l'utilisation de fongicide. Depuis une dizaine d'années, le traitement par l'application de fongicide a augmenté dû à l'apparition de souches de *P. infestans* de plus de en plus agressives. Ces nouvelles souches proviennent des reproductions sexuées et développent petit à petit une résistance aux fongicides/biocides en même temps qu'une augmentation de leur virulence (Axel *et al.*, 2012).

I.1.4.2. Ralstonia solanacearum

En 2005, on a estimé à 1 milliard par an la perte économique due à *R. solanacearum* à travers le monde (Elphinstone, 2005). L'incidence de cette maladie pour laquelle il n'existe que des moyens prophylactiques est surtout dramatique pour les pays en voie de développement. En Europe, la bactérie *R. solanacearum* est considérée comme un organisme de quarantaine dont la présence n'est tolérée dans aucun lot de semences ou aucune parcelle de multiplication. La première détection de *R. solanacearum* en France remonte à septembre 2000 et son éradication a été confirmée dès janvier 2001 suite aux mesures mises en œuvre (EPPO, 2001). De par sa grande pathogénicité et sa répartition géographique, *R. solanacearum* est capable d'infecter un large spectre d'hôtes : environ 200 espèces dans plus de 50 familles différentes (Genin, 2010). Elle est responsable de la pourriture brune chez la pomme de terre, de la maladie de Moko chez le bananier, du flétrissement bactérien chez la tomate, le tabac, l'aubergine et chez certaines plantes ornementales.

R. solanacearum est une bactérie tellurique, elle infecte les plantes *via* des blessures, au niveau de l'apex racinaire, ou *via* les nœuds des racines secondaires, suivant la plante hôte. Elle colonise ensuite les cellules du cortex racinaire, puis envahit les vaisseaux du xylème avant d'atteindre la tige et les parties aériennes à travers le système vasculaire (**Figure I.13**). Dans le système vasculaire, la bactérie va se multiplier abondamment et synthétiser des exopolysaccharides qui vont bloquer la circulation de l'eau et des nutriments conduisant au flétrissement et à la mort de la plante (Genin, 2010).


Figure I.14 : Symptôme d'une infection de *R. solanacearum* sur des tubercules.

A, Suintement bactérien au niveau au niveau de l'anneau vasculaire (flèches noires) d'un tubercule de pomme de terre infecté par *R. solanacearum*. B, Observation des yeux (flèches rouge) du tubercule au niveau du talon qui peuvent laisser suinter la bactérie à l'extérieur du tubercule (www.plantdepommedeterre.org).

Les symptômes en végétation sont souvent latents ou peu apparents. Le flétrissement du feuillage, dépendant de la température et l'humidité, est d'abord limité aux périodes chaudes de la journée, puis finit par se généraliser. Dans le cas d'attaques sévères, il peut y avoir suintement d'un exsudat bactérien après une coupe transversale de la tige.

Les symptômes sur le tubercule se caractérisent par un brunissement rougeâtre des tissus vasculaires, visibles après avoir coupé le tubercule (**Figure I.14**). Une pourriture beige puis brune à l'origine du nom de cette phytobactériose se développe ensuite au niveau de l'anneau vasculaire situé à l'intérieur du tubercule. Une coupure ou une simple pression du tubercule provoque le suintement d'un exsudat bactérien blanchâtre.

Il a été démontré que, comme dans le cas de nombreuses bactéries, le chimiotactisme constitue un atout essentiel à la virulence de *R. solanacearum* (Yao et Allen, 2006). Par comparaison avec des plantes non hôtes, il s'avère que *R. solanacearum* est largement plus attirée vers les exsudats racinaires des plantes hôtes. Ainsi, les exsudats racinaires semblent jouer un rôle important dans l'infection de la plante hôte.

I.1.4.3. Pectobacterium

Les bactéries *P. atrosepticum* et *P. carotovorum* (anciennement *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica et E. *carotovora* subsp. *carotovora*) sont des pathogènes dits de qualité, car ils peuvent provoquer des pertes importantes au champ ou lors de la conservation des tubercules. Au champ, le pathogène va attaquer précocement le tubercule mère et va retarder ou empêcher la levée (Latour *et al.*, 2008). Lors du stockage, les tubercules initialement infectés peuvent ne présenter aucun symptôme visible. Ils deviennent alors des porteurs sains et disséminent la maladie en végétation lors des phases de multiplication des plants, ou quand ils sont utilisés comme semence. La température, l'humidité et l'espèce bactérienne influent fortement sur la nature des symptômes (Latour *et al.*, 2008 ; Hélias, 2008).

Des blessures ou des ouvertures naturelles telles que les lenticelles facilitent l'invasion de la plante hôte (Pérombelon, 2002). Les bactéries vont alors se multiplier jusqu'à une limite de population appelée *quorum*. Une fois ce *quorum* détecté, les bactéries vont sécréter de façon synchronisée les différents facteurs de virulence impliqués dans l'altération des composés de la paroi végétale (Mae *et al.*, 2001). Le *quorum sensing*, a été mis en évidence en 1994 par Fuqua *et al.*, et a été défini comme le déclencheur de l'expression des gènes de virulence des bactéries.



Figure I.15 : Symptôme de la jambe noire sur des plantes de pomme de terre

Phénomène de jambe noire (flèches blanches) sur un plan de pomme de terre dû à une dégradation de la paroi végétale par les enzymes pectinolytiques de *Pectobacterium* (<u>http://plantdepommedeterre.org</u>)



Figure I.16 : Symptôme de pourriture molle sur le tubercule de pomme de terre

Pourriture molle et humide provoquée par la dégradation des tissus du tubercule par *Pectobacterium* (http://plantdepommedeterre.org)

Parmi les facteurs de virulence de *Pectobacterium*, des enzymes dégradent les parois végétales comme des cellulases, des protéases et de nombreuses enzymes pectinolytiques : pectate lyases, pectate hydrolases et pectine méthylestérases (Smadja *et al.*, 2004a). La présence de ces enzymes explique l'ampleur des dégâts causés ainsi que leur vitesse d'apparition. L'apparition des symptômes sur la partie supérieure de la plante correspond à une colonisation du xylème, puis au passage des bactéries dans l'espace intercellulaire. Par la sécrétion d'une série de pectinases, la paroi mitoyenne des cellules est dégradée et le parenchyme déstabilisé, provoquant ainsi la macération des tissus. Le transport de l'eau et des éléments minéraux, vers le sommet de la plante est interrompu, provoquant le flétrissement et le jaunissement du feuillage (Hélias *et al.*, 2000).

L'infection induit ainsi le symptôme de la jambe noire : symptôme le plus connu et le plus tardif. La pourriture des organes, de coloration brune foncée à noire à la base des tiges (**Figure I.15**), est la conséquence de l'action de pectinases bactériennes hydrolysant la paroi cellulaire végétale (Pérombelon et Kelman, 1987). Au niveau des tubercules (**Figure I.16**), on peut observer des pourritures molles, petites tâches diffuses d'aspect graisseux, qui commencent généralement à apparaître autour des lenticelles, des blessures ou du talon et qui vont s'étendre rapidement à l'intérieur du tubercule. Par macération du parenchyme, la pourriture molle, de couleur claire, brunit jusqu'au noir. La production de poches gazeuses dans les tissus en macération, sont à l'origine d'une odeur nauséabonde très prononcée (Pérombelon et Kelman, 1980).

À ce jour, il n'existe pas de méthode de lutte efficace contre *P. atrosepticum* et *P. carotovorum*. Seules des mesures prophylactiques, basées sur une hygiène générale des exploitations et des semences, ainsi que sur l'utilisation de pratiques culturales raisonnées, peuvent limiter les pertes induites (Priou et Jouan, 1996).

Le point commun des trois phytopathologies de la pomme de terre décrites ici est le manque de traitement qui permettrait d'éviter les pertes agronomiques et économiques, et la mise en quarantaine des champs infectés. La seule option à la disposition des agriculteurs est l'application des mesures de prophylaxie et l'utilisation de plants certifiés, ayant fait l'objet de contrôles au champ et en laboratoire (cf. paragraphe chap. I - 1.3).

L'étude des mécanismes d'interaction plantes-pathogène, notamment au niveau racinaire, pourra apporter des éléments de compréhension afin d'élaborer des solutions concrètes pour lutter contre ces pathogènes.



Figure I.17 : Stratégies d'invasion employées par les pathogènes pour pénétrer la plante. a) Entrée des pathogènes dans les cellules à travers les stomates ouverts ou au niveau des blessures ; b) une pénétration directe abaxiale ou adaxiale dans la feuille ; c) ou dans la racine au niveau de l'épiderme. Développement d'un haustorium autour des membranes plasmiques de la plante pour les pathogènes filamenteux afin de faciliter le transfert des protéines effectrices (flèches rouges) mais aussi pour l'absorption des éléments nutritifs (flèches noires) (adapté de Faulkner et Robatzek, 2012).

I.2. Interaction plantes-pathogènes

Parce qu'elles sont immobiles et qu'elles subissent de nombreux stress biotiques et abiotiques, les plantes ont élaboré des mécanismes de défense, résultant de leur adaptation à leur environnement. Ainsi, malgré la biodiversité des micro-organismes présents dans l'air et les sols, un nombre limité de pathogènes parvient à infecter la plante. La présence de barrières physico-chimiques comme la cuticule ou la paroi végétale constitue une première ligne de défense qui empêche les micro-organismes de pénétrer dans les tissus (Garcia-Brugger *et al.,* 2006). Néanmoins, la plante présente des ouvertures soit naturelles comme les stomates, soit consécutives à des blessures infligées par des insectes ou des nématodes (**Figure I.17**). Ces ouvertures, conjointement à la sécrétion par les pathogènes d'enzymes hydrolytiques, favorisent l'entrée de pathogènes dans les organes de la plante (Jones et Dangl, 2006). Si un micro-organisme parvient à franchir ces barrières physiques constitutives et si les plantes sont capables de détecter sa présence, des réactions de défense sont induites empêchant la croissance du pathogène. Cette deuxième ligne de défense, induite, permet à la plante de lutter contre une majorité de micro-organismes.

L'ensemble des défenses, préformées et inductibles, constitue le système immunitaire des plantes.

La détection du pathogène, spécifique ou non, est primordiale car elle déclenche des réactions de défense qui peuvent être donc de deux types :

- Compatibles, lorsque la plante infectée par le pathogène développe des symptômes et la maladie. Dans ce cas le pathogène est dit virulent et la plante sensible.
- Incompatibles, lorsque la plante parvient à contenir l'infection et à résister au pathogène. Dans ce cas le pathogène est dit avirulent et la plante résistante.



Figure I.18 : Schéma récapitulatif présentant les divers éliciteurs.

Les éliciteurs peuvent provenir du pathogène, ce sont les Microbe- ou Pathogen-Associated Molecular Patterns (MAMP/PAMP) ou provenir de la plante hôte, ce sont les Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP). Ces derniers sont libérés de la paroi végétale sous l'action d'enzymes hydrolytiques produites par le pathogène ou en réponse au stress. Les éliciteurs perçus par les Pattern Recognition Receptor (PRR) déclenchent une cascade de réactions aboutissant à la réponse immunitaire de type PTI (PAMP-Triggered immunity) (Adapté de Henry et *al.*, 2012).



Figure I.19 : Schéma Simplifié de la PTI (Pamp Triggered Immunity)

La présence d'un pathogène ou d'un motif associé aux pathogènes (PAMPs) va permettre l'activation des récepteurs PRR (Pattern -Recognition Receptor) qui vont déclencher une signalisation cellulaire aboutissant à la mise en place de la PTI. (Adapté de Pieterse *et al.*, 2009).

I.2.1. Détection du pathogène

La reconnaissance des pathogènes est un élément clé permettant d'induire les réponses immunitaires. Cette reconnaissance se fait grâce à la détection des motifs associés aux microbes appelés MAMPs (Microbes-Associated Molecular Patterns) ou encore la reconnaissance des motifs associés au pathogènes appelés PAMPs (Pathogens-Associated Molecular Patterns) (Sanabria *et al.*, 2010, Wu *et al* 2014). Ces motifs moléculaires qui sont conservés, constituent une signature microbienne, et sont appelés des éliciteurs (**Figure I.18**) (Wu *et al.*, 2014). Ces derniers peuvent avoir une origine endogène, causés par les dommages provoqués sur les tissus végétaux (DAMP – Damage-Associated Molecular Patterns) ou exogène lorsqu'ils dérivent du microbe (MAMP) ou plus généralement du pathogène (PAMP, Garcia-Brugger *et al.*, 2006 ; Davidsson *et al.*, 2013). Parmi les éliciteurs les plus étudiés, on peut citer le peptidoglycane (PGN), la flagelline 22 (flg22) ou la chitine (Boller et Felix, 2009 ; Pel et Pieterse, 2013 ; Ao *et al.*, 2014 ; Wyrsch *et al.*, 2015 ; Schoonbeek *et al.*, 2015).

La reconnaissance de ces différents éliciteurs fait intervenir des récepteurs membranaires appelés Pattern Recognition Receptor (PRR) situés à la surface des cellules végétales (Trdà *et al.*, 2015). L'activation des PRR stimule le système immunitaire des plantes.

I.2.2. Le système immunitaire des plantes

I.2.2.1. L'immunité induite par les pathogènes (PTI)

L'immunité induite par les pathogènes ou PTI (PAMP Triggered Immunity) constitue, avec les barrières physico-chimiques, la première ligne de défense ou résistance basale (Jourdan *et al.*, 2008 ; Yazawa *et al.*, 2013). L'interaction des PAMPs avec les récepteurs membranaires PRR va entrainer une cascade d'évènements (**Figure I.19**) qui vont aboutir à la mise en place de mécanismes de défense. Parmi ces événements, on note l'entrée d'un important flux d'ions H⁺, K⁺, Cl₂ et Ca²⁺ au sein de la membrane plasmique deux minutes seulement après la perception de l'éliciteur (Muthamilarasan et Prasad, 2013).

L'entrée massive de Ca^{2+} dans le compartiment cytoplasmique est médié entre autres par l'activation des pompes à Ca^{2+} à travers la phosphorylation des PRR et l'activation des protéines G. Cette étape est cruciale pour la mise en place de la PTI, car l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire va permettre la production de l'acide salicylique ainsi que la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Muthamilarasan et Prasad, 2013).



Figure I.20 : Induction de la production des espèces réactives d'oxygènes (ROS)

La reconnaissance des PAMPs /MAMPs par la plante induit la réponse immunitaire de type PTI (PAMPs triggered immunity). Cette réponse immunitaire complexe est constituée d'une phase immédiate qui conduit à une surproduction des formes actives de l'oxygène (FAO ou ROS) et d'évènements plus tardifs aboutissant à la synthèse de molécules antimicrobiennes. La PTI contribue au renforcement de la paroi cellulaire végétale pour limiter la progression du pathogène dans la plante (Torres, 2010).



Figure I.21 : Induction de dépôt de callose au niveau de la racine et des cellules apparentées aux cellules de bordure du lin.

Dépôts de callose colorés à l'aniline blue correspondant aux spots bleu localisés sur la racine de lin (A) et sur les cellules apparentées aux cellules de bordure (B) 48 heures après élicitation par la flagelline 22. Echelle: A: 50 mm et B: 25 mm. sBLC: small Border Like Cells; eBLC: elongated Border Like Cells; R: Root; WT: wild type (Adapté de Plancot *et al.*, 2013).

La production de ROS, appelée burst oxydatif, constitue l'une des étapes précoces de la défense des plantes (Figure I.20). Le burst oxydatif déclenche plusieurs mécanismes complexes faisant intervenir la voie des MAP kinases, et conduisant, parmi d'autres évènements, au renforcement de la paroi végétale. Ainsi, on peut également observer l'accumulation de callose dans la paroi, limitant la pénétration du pathogène dans les tissus de la plante (Muthamilarasan et Prasad, 2013 ; Sreekanta *et al.*, 2015). Les dépôts de callose, polymères de β -(1-3)-glucanes, sont utilisés comme marqueurs de défense végétale dans de nombreuses études (Millet *et al.*, 2010 ; McCann *et al.*, 2012 ; Schoonbeek *et al.*, 2015 ; Sreekanta *et al.*, 2015). Récemment, des travaux ont mis en évidence la production de callose par des racines et des cellules apparentées aux cellules de bordure de lin, 48 heures après élicitation par la flagelline 22 ainsi qu'un renforcent pariétal suite à un stress biotique (Plancot *et al.*, 2013) (Figure I.21).

I.2.2.2. L'immunité induite par les effecteurs (ETI)

Même si la PTI est efficace pour un large spectre de pathogènes, elle peut être contournée par des mécanismes de virulence résultant de l'évolution des pathogènes.

En effet, la coévolution des mécanismes de résistance des plantes et de la virulence des pathogènes a résulté au développement, chez ces derniers, de systèmes de sécrétion efficaces. Par exemple, certains pathogènes tels que les bactéries Gram négatives (Gram-) se sont dotés d'un déterminant de pathogénicité majeur, en occurrence le système de sécrétion de type III (T3SS) (Lohou et al., 2013). Ainsi, certaines bactéries telles que *R. solanacearum* vont être capable d'injecter directement au travers de la paroi végétale entre 15 et 30 protéines effectrices ou effecteurs de type III (ET3). Dans le cas d'un oomycète tel que *P. infestans*, c'est la formation de l'haustorium (**Figure I.17**) qui permet la sécrétion des effecteurs, et leur pénétration par exocytose dans la matrice extrahaustoriale (Leborgne-Castel *et al.*, 2010).

L'action de ces effecteurs va annihiler la PTI mise en place par la plante, ce qui conduira à une susceptibilité de la plante induite par les effecteurs appelée ETS (Effector triggered Susceptibility).

En réponse au contournement de la PTI par les pathogènes, la plante déclenche à son tour une réaction de défense acquise dans le même processus de coévolution avec les pathogènes (Trdà *et al.*, 2015). Cette deuxième ligne de défense est appelée l'immunité induite par les effecteurs (ETI, Effector triggered immunity).



Figure I.22 : Modèle en Zigzag (adapté de Jones et Dangl, 2006)

Dans un premier temps, la plante détecte des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) *via* les récepteurs de reconnaissance des PAMPs (PRRs) ce qui déclenche chez la plante l'immunité induite par les PAMPs (PTI). Si le pathogène est capable d'injecter directement des effecteurs dans la cellule végétale, la résistance basale (PTI + barrière physico-chimique) est contournée, ce qui provoque la susceptibilité induite par les effecteurs (ETS) et le développement de la maladie. Cette deuxième attaque va être perçue par un récepteur cytosolique (R) qui va déclencher une deuxième ligne de défense appelée immunité induite par les effecteurs (ETI), résistance spécifique des effecteurs, et qui s'accompagne le plus souvent d'une réaction hypersensible (HR) qui provoque une nécrose du site d'infection. ETS: Effector triggered Susceptibility; ETI: Effector triggered Immunity; HR: Réponse Hypersensible PTI: Pathogen Triggered Immunity; PRR: Pathogens Recognition Receptor; R: Résistance gene.

L'ensemble des interactions entre les plantes et les pathogènes, résultant de leur coévolution, est résumé dans le modèle en Zigzag proposé par Jones et Dangl en 2006 (Figure I.22). Dans ce modèle, on observe que contrairement à la PTI, qui présente une intensité modérée, l'ETI présente une plus forte amplitude et conduit le plus souvent à la mise en place d'une réaction d'hypersensible (HR). L'HR correspond à une mort cellulaire programmée qui permet de confiner et de limiter la progression du pathogène.

L'ETI est une réponse de défense spécifique dirigée contre des effecteurs donnés, on parle alors du modèle de résistance « gène pour gène ». Ce modèle a été introduit par Flor en 1971 et correspond à la présence chez la plante d'une protéine de résistance R qui va reconnaitre spécifiquement les protéines effectrices du pathogène, telles que les ET3, à l'intérieur même de la cellule végétale. Dans ce modèle, les effecteurs sont appelés protéines d'avirulence (*Avr*), car leur reconnaissance par les protéines R rend la plante résistante et le pathogène avirulent (interaction incompatible). L'ETI résultant de cette interaction *R-avr* correspond à une forme accélérée et amplifiée de la PTI.

Cependant, comme dans le cas de l'interaction pectobactéries / pomme de terre, certains micro-organismes outrepassent ces défenses et prolifèrent, grâce notamment à la sécrétion d'enzymes de dégradation des parois végétales, premières lignes de défense.



Figure I.23 : La paroi primaire végétale de type 1 chez les plantes eudicotylédones.

La paroi végétale primaire est constituée d'un réseau de microfibrilles de cellulose, de polysaccharides complexes formés par les hémicelluloses et les pectines (Endler et Persson, 2011). PM : plasma membrane



Figure I.24 : Structure et synthèse de la cellulose

A - Représentation schématique d'une fibre de cellulose, composée de macrofibrilles, ellesmêmes constituées de microfibrilles formées à partir de chaînes glucaniques. B- Structure d'une « rosette », constituée d'un hexamère de complexes globulaires CesA. Chaque complexe est lui-même formé par 6 sous-unités catalytiques (les protéines CesA) au sein de la membrane plasmique. (TMD, domaine transmembranaire ; UDP-Glc, uridine diphosphate glucose) (Lerouxel *et al.*, 2006).

I.3. La paroi végétale : Ligne de défense N°1

La paroi, encore appelée matrice extracellulaire végétale constitue un élément essentiel qui caractérise les cellules des plantes. Cette paroi joue plusieurs rôles cruciaux notamment dans le contrôle de la croissance et le développement, et dans l'adaptation aux changements environnementaux (Oikawa *et al.*, 2013). La paroi cellulaire constitue la première barrière de défense de la plante et joue un rôle clé dans les interactions avec les microorganismes (Keegstra, 2010). Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons uniquement à la paroi primaire de type 1 présente chez les plantes eudicotylédones (**Figure I.23**) (Vorwerk *et al.*, 2004). Cette paroi est constituée essentiellement de polysaccharides et de glycoprotéines.

I.3.1. Les polysaccharides de la paroi

La paroi primaire est constituée de microfibrilles de cellulose enrobées dans une matrice de composition complexe et variable suivant les espèces végétales et le stade de développement des organes.

I.3.1.1. La cellulose

La cellulose (**Figure I.24**) est la molécule organique la plus abondante sur Terre. C'est une molécule stable, insoluble et élastique, représentant 40% des polysaccharides pariétaux. Ce polymère comporte 500 à 14000 résidus de β -(1,4) -D-glucopyranose (Somerville, 2006). Les fibres de cellulose sont constituées de macrofibrilles, constituées à leur tour d'un assemblage de microfibrilles (**Figure I.24-A**). La biosynthèse de la cellulose a lieu au niveau de la membrane plasmique (Brown *et al.*, 1996), grâce à des complexes protéiques formant des hexamères appelés « rosettes ». Ces dernières se présentent comme une structure d'environ 20 à 30 nm de diamètre constituée de 6 complexes globulaires dans lesquels se trouvent des cellulose synthases, nommées CesA (Kimura *et al.*, 1999) (**Figure 1.24-B**). Chez Arabidopsis, 10 gènes codant pour les protéines CesA ont été identifiés. Les protéines CesA1, -2, -3, -5, -6 et -9 sont impliquées dans la synthèse de la cellulose de la paroi primaire, tandis que les protéines CesA4, -7 et -8 interviennent pendant la synthèse de la paroi secondaire (Endler et Persson, 2011).



Figure I.25 : Représentation schématique des quatre principaux polysaccharides pectiques.

A) Rhamnogalacturonan II; B) Homogalacturonan; C) Xylogalacturonan; D)Rhamnogalacturonan I (Scheller *et al.*, 2007).

I.3.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont définies comme étant des polysaccharides insolubles dans l'eau, mais solubles dans une solution alcaline de KOH (1M ou 4M). Sur le plan structural, les hémicelluloses sont formées d'une chaîne principale de résidus β -D-pyranosyl (glucose, xylose ou mannose) liés en 1,4 (Scheller et Ulvskov, 2010). On distingue quatre principaux groupes d'hémicelluloses : les xyloglucanes, les xylanes, les mannanes et les β -(1,3 ; 1,4)-glucanes ou glucanes à liaisons mixtes. Les xyloglucanes représentent le composé hémicellulosique majeur des parties végétatives chez les plantes eudicotylédones. Les hémicelluloses jouent un rôle structural au niveau de la paroi primaire, et par conséquent régulent l'expansion cellulaire (Scheller et Ulvskov, 2010).

I.3.1.3. Les Pectines

Les pectines sont des polysaccharidiques complexes constitués de quatre classes : les homogalacturonanes (HG), le rhamnogalacturonane I (RGI), le rhamnogalacturonane II (RGII) et le xylogalacturonane (Cosgrove, 2005). Les pectines sont facilement extractibles avec un acide à chaud ou des chélateurs et contiennent une grande proportion de résidus d'acide galacturonique (GalA). (Figure I.25).

- Les HG (**Figure I.25-B**) consistent en une chaîne linéaire de résidus d'acide galacturonique liés en α -(1,4), avec un degré de polymérisation typique de 100/150, pouvant être méthylés et/ou acétylés (Caffall et Mohnen, 2009 ; Wolf *et al.*, 2009).

- Le RGI (Figure I.25-D) est composé d'un squelette de D-galacturonate et de L-rhamnose. Ses chaines latérales, fortement variables en composition et en abondance entre les espèces, sont majoritairement constituées de galactanes, d'arabinanes et d'arabinogalactanes (McNeil *et al.*, 1982, Vincken *et al.*, 2003; Mohnen, 2008).

- Le RG-II (**Figure I.25-A**) est le polysaccharide pectique le plus complexe d'un point de vue structural, puisqu'il est constitué d'au moins une douzaine de monosaccharides différents et de plus d'une vingtaine de liaisons (Ridley *et al.*, 2001). Il comprend un squelette principal de résidus de GalA auxquels sont accrochés quatre chaines latérales complexes (O'Neill *et al.* 2004). Ces chaines latérales sont constituées de monosaccharides particuliers, tels que le D-apiose (Api), le L-acerate (AceA), le 2-Omethyl L-fucose, le 2-O-méthyl-D-xylose, le L-galactose, l'acide 2-keto-3-deoxy-D-lyxoheptulosarique (Dha) et le 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonate (Kdo).





Le renforcement de la paroi est favorisé par la formation d'une réticulation permise des liaisons isodityrosines ou diisodityrosynes sous l'action des ROS et des peroxydases (Deepak *et al.*, 2010)

La structure du RGII est globalement très conservée chez les plantes (O'Neill *et al.* 2004). La caractéristique importante du RGII est sa capacité à former des dimères *via* une liaison esterborate. La formation de ce dimère est essentielle dans le rôle de la régulation de la porosité et des propriétés mécaniques de la paroi primaire (Ishii *et al.*, 2001 ; O'Neill *et al.*, 1996).

- Les xylogalacturonanes (**Figure I.25-C**) sont constitués d'une chaîne de résidus d'acide galacturonique liés en $\alpha(1,4)$, pouvant être acétylés et méthylés, et substitués en O-3 avec un β -D-xylose terminal ou de courtes chaînes de xylanes. Les courtes chaînes de xylanes peuvent varier dans leur type de liaison. Ainsi, chez les Rosidées, les chaînes de xylanes ont des liaisons $\beta(1,4)$ pour la pomme (Oechslin *et al.*, 2003), $\beta(1,4)$ et $\beta(1,2)$ pour le soja (Nakamura *et al.*, 2002), $\beta(1,2)$ et $\beta(1,3)$ pour le pois (LeGoff *et al.*, 2001). Chez les Astéridées, les liaisons sont de type $\beta(1,4)$ comme pour la pomme de terre (Zandleven *et al.*, 2007). Les xylogalacturonanes sont présents de façon abondante au niveau de la coiffe racinaire et des cellules de bordures (Willats *et al.*, 2004; Durand *et al.*, 2009). Bien que leur rôle dans ces tissus ne soit pas clairement défini, on leur attribue un hypothétique rôle dans la résistance de la paroi contre les enzymes de dégradations des pathogènes (Jensen *et al.*, 2008).

I.3.2. Les protéines riches en hydroxyproline (HRGPs)

Les protéines riches en hydroxyproline (HRGPs, Hydroxyproline-rich glycoproteines) constituent une classe majeure de protéines pariétales représentant un peu moins de 10% du poids sec total de la paroi primaire et se caractérisent par une composition très riche en proline (Pro) (Nguema-Ona *et al.*, 2014). Elles sont impliquées dans le renforcement de la paroi par la formation d'une réticulation *via* des liaisons covalentes entre les HRGPs (**Figure I.26**). Ce mécanisme est essentiel pour la résistance ou la sensibilité aux pathogènes (McNeil *et al.*, 1984; Deepak *et al.*, 2010).

Les HRGPs comprennent des glycoprotéines faiblement ou hautement glycosylées (PRP), des glycoprotéines moyennement glycosylées (EXT) et des arabinogalactane-protéines (AGP) (Hijazi *et al.*, 2014).

I.3.2.1. Les protéines riches en proline (PRPs)

Les PRPs sont des protéines dont les extrémités N-terminales possèdent un peptide signal suivi d'une séquence KPPVY(K) qui peut être répétée plus de 14 fois dans un seul polypeptide. La présence d'une lysine (K) avant les prolines (PP) serait responsable d'une faible glycosylation arabino-oligosaccharidique des PRPs (Kieliszewski *et al.*, 1995).



Figure I.27 : Les trois classes de PRPs (Rose, 2003).

A : Les PRPs de la classe A possèdent une répétition des domaines Pro-rich et semblent ne pas être fortement glycosylées. B : Les PRPs de la classe B possèdent un domaine Pro-rich en N-terminal, contrairement à la partie C-terminale, le plus souvent hydrophile et riche en cystéines et qui ne contient aucun motif répété. C : Les PRPs de la classe C sont également des PRP chimères avec un unique domaine N-terminal qui n'est pas répété, ainsi qu'une région PRP-like en C-terminal.





Figure I.28 : Structure des extensines.

Les hydroxyprolines sont fortement Oglycosylées par des chaines arabinanes et les serines par des galactoses (Lamport *et al.*, 1973).

Ara : Arabinose ; Gal : Galactose ; Hyp : Hydroxyproline ; Lys : Lysine ; Ser : Serine ; Tyr : Tyrosine ; Val : Valine.

Figure I.29 : Localisation des épitopes d'extensines sur des cellules apparentées aux cellules de bordure (BLC) de lin.

Les EXTs sont marquées avec l'anticorps monoclonal LM1 (Plancot *et al.*, 2013). BLC : Border Like Cells Les PRPs sont subdivisées en trois classes (Showalter, 1993; Fowler *et al.*, 1999), en fonction de leur structure primaire (**Figure I.27**). Elles sont soit constituées d'un seul domaine riche en prolines, PRP-domain (classe A), soit d'un domaine supplémentaire en C-ter (classe B) ou N-ter (classe C). Ces deux dernières classes sont ainsi constituées de PRPs Hybrides (HyPRPs) ou PRPs chimères (Josè-Estanyol et Puigdomènech, 1998).

Les PRPs de la classe A ont été identifiées pour la première fois chez la carotte (*Daucus carota*) comme des protéines qui s'accumulent dans la paroi en réponse à une blessure (Chen et Varner, 1985). De façon générale, les PRPs sont principalement exprimées chez les jeunes plants, les feuilles, la tige, les poils absorbants, pendant le développement de la graine et pendant les stages précoces de développement du pois (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001).

I.3.2.2. Les Extensines

Les extensines sont représentées aussi bien chez les gymnospermes (Kieliszewski *et al.*, 1992) que chez les angiospermes (Kieliszewski et Lamport, 1994). Chez les dicotylédones, les extensines sont des protéines basiques abondantes riches en hydroxyproline (Hyp) et sérine (Ser) ainsi qu'en résidus Val, Tyr, Lys et His. Elles sont caractérisées par la répétition du motif Ser-Hyp₄ [SP₄] (**Figure 1.28**). Les Hyp contiguës de ces motifs sont O-glycosylées par des résidus d'arabinose (1 à 4 résidus) et les Ser par un résidu unique de galactose. Les motifs répétés [SP₄] et la séquence (Tyr-Lys-Tyr) sont impliqués dans les conformations secondaires et tertiaires des extensines. Notamment, elles peuvent s'oligomériser en présence de peroxyde d'hydrogène et grâce à l'action des peroxydases apoplastiques, des liaisons isodityrosines ou diisodityrosines (**Figure 1.26**) contribuant ainsi à renforcer le maillage de la paroi cellulaire végétale (Kieliszewski et Shpak, 2001 ; Ribeiro *et al.*, 2006).

Les extensines sont impliquées dans les réponses de défense des plantes aux stress abiotiques et biotiques (Plancot *et al.*, 2013). En effet, l'expression des extensines est induite en réponse à l'ozone (Schneiderbauer *et al.*, 1995), aux blessures (Ahn *et al.*, 1998) et aux pathogènes (Garcìa-Muniz *et al.*, 1998 ; Deepak *et al.*, 2007). Egalement, une étude d'immunolocalisation utilisant les anticorps monoclonaux JIM 11 et JIM 20 dirigés contre des épitopes associés aux extensines montrent une importante présence de ces glycoprotéines au niveau de la paroi de la courge cireuse résistante à *Fusarium oxysporum* par rapport à la variété sensible (Xie *et al.*, 2011, Nguema Ona *et al.*, 2014).

Par ailleurs, en 2013, Plancot *et al* ont montré une redistribution des épitopes associés aux extensines reconnus par l'anticorps LM1 en réponse à une élicitation à la flagelline 22 au niveau des cellules frontières d'Arabidopsis (**Figure I.29**).



Figure I.30 : Structure des arabinogalactanes protéines (AGP).

Les principaux sucres constitutifs des AGP sont le galactose et l'arabinose. Présence de sucres mineurs tels que le rhamnose et l'acide glucuronique. Les AGP peuvent être ancrées à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) (Nguema-Ona *et al.*, 2013). CW: paroi cellulaire végétale, PM: membrane plasmique.



Figure I.31 : Représentation schématique des structures putatives de différentes classes d'AGP chez *A. thaliana* (d'après Schultz *et al.*, 2000 et Showalter *et al.*, 2010).

A gauche, la schématisation de la structure primaire, à droite celle de la glycosylation.

I.3.2.3. Les Arabinogalactane-protéines (AGP)

Les arabinogalactane-protéines (AGP) constituent l'une des classes les plus importantes d'HRGPs (Pareira *et al.*, 2014). Ce sont des glycoprotéines, ubiquistes et constituées d'un squelette protéique représentant 1 à 10% tandis que la partie glycannique représente entre 90 à 99% de la masse de la molécule. Les AGP, fortement glycosylées sont qualifiées de protéoglycanes. La partie glycannique est très complexe et variable suivant les espèces, les organes, les tissus et le stade de développement des plantes (Rumyantseva, 2005 ; Seifert et Roberts, 2007). Elle se compose principalement de β -D(1,3) galactanes ramifiés par des chaînes de galactoses liés en β -D(1,6). Sur ces chaînes de galactose, des résidus arabinose, rhamnose, acide glucuronique et fucose peuvent être présents en position terminale (**Figure I.30**) (Seifert et Roberts, 2007 ; Ellis *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2010, Knoch *et al.*, 2014).). Une ancre GPI et une hélice transmembranaire C-terminale permettent l'ancrage des AGP au niveau de la membrane plasmique (Sherrier *et al.*, 1999).

Structure des AGP

Le squelette protéique est riche en proline/hydroxyproline, sérine, alanine, thréonine. En 2002, Schultz *et al.*, ont défini deux principales classes d'AGP en fonction de la composition de la partie protéique : les AGP classiques et les AGP non classiques (**Figure I.31**). En complément de la classification effectuée par Schultz *et al.* (2002), Showalter *et al.*, en 2010, ont proposé une nouvelle classification des AGP sur la base des annotations du génome d'*A. thaliana* et de la composition en acides aminés biaisés, à l'aide d'analyses bioinformatiques (**Figure I.31**). Il a été ainsi identifié, en plus des AGP classiques et AGP non classiques, des arabinogalactane peptides (AG peptide), des fasciclines-like arabiogalactans proteins (FLAs), des nodulin-like proteins (ENODL) et des AGP chimériques (Showalter *et al.*, 2010). Les AGP classiques sont constitués d'un unique domaine riche en Hydroxyproline/Proline (Hyp/Pro) fortement glycosylé (AGP), puis de l'extrémité C-ter hydrophobe (GPI) (**Figure I.31**). Les autres classes d'AGP diffèrent par la présence d'autres domaines ou d'autres motifs comportant des Cys, Asn ou Lys en plus du domaine riche en Hyp/Pro ou par l'absence d'une ancre GPI (AGP non classiques). Les AG peptiques sont constituées d'au maximum 90 acides aminés et d'une ancre GPI.

Modifications post traductionnelles des AGP

Les AGP subissent trois modifications post-traductionnelles : l'hydroxylation des résidus proline, la glycosylation puis l'addition de l'ancre GPI. L'hydroxylation des résidus proline en résidus hydroxyproline débute dans le réticulum endoplasmique et continue dans l'appareil de Golgi (Nguema-Ona *et al.*, 2014). Cette hydroxylation, par les prolyl4-hydroxylases (P4Hs), est essentielle puisqu'elle permet les glycosylations ultérieures des résidus Hyp. Les P4Hs des plantes sont des enzymes membranaires appartenant à la famille des 2-oxoglutarate dépendant des dioxygénases (Hijazi *et al.*, 2014; Fragkostefanakis *et al.*, 2014). Une caractérisation partielle *in vivo* et *in vitro* des P4Hs a été réalisée dans de nombreuses plantes modèles. La majorité de ces P4Hs sont ainsi capables d'hydroxyler les prolines avec une affinité différente selon que le substrat est du collagène-like, des poly-prolines extensines-like ou encore des AGP-like (Hijazi *et al.*, 2014).

La glycosylation des AGP est réalisée au niveau de l'appareil de Golgi. Comme indiqué précédemment (**Figure I.30**), les chaines glycanniques attachées à l'Hyp se composent d'un squelette principal de $\beta(1,3)$ -galactane qui à son tour est décoré avec des chaines de $\beta(1,6)$ -galactose portant d'autres motifs sucres tels que l' α -arabinose, l'acide glucuronique, l' α -rhamnose, et l' α -fucose à de faibles pourcentages. L'ajout de ces différents sucres fait intervenir une ou plusieurs enzymes de type glycosyl-transférase (Knoch *et al.*, 2014). Récemment, une liste non exhaustive des enzymes intervenant dans la glycosylation des AGP, et de leur gène, a été établie (Basu *et al.*, 2015). Ainsi, deux α -1,2-fucosyltransferases (FUT4 et FUT6), une Hyp-O-galactosyltransferase (GALT2), une β -1,3-galactosyltransferase (At1g77810), une β -1,6-galactosyltransferase avec une activité d'élongation (GALT31A), une β -1,6-galactosyltransferase (GALT29A), et trois β -1,6-gluronosyltransferases (GlcAT14A, GlcAT14B, GlcAT14C) ont été identifiées et clonées. La perte d'activité d'élongation des chaines d'arabinogalactane protéine des glycosyltransferases entraine des phénotypes tissus-spécifiques (Ogawa-Ohnishi *et al.*, 2015).

Enfin, une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) est synthétisée et ajoutée en C-ter sur l'AGP au niveau du réticulum endoplasmique (Schultz 1998). Cependant, la majorité des AGP sont présentes sous une forme soluble plutôt que membranaire, ce qui laisse suggérer que les AGP se détachent facilement des surfaces cellulaires (Ogawa-Ohnishi et Matsubayashi, 2015).



Figure I.32 : Structure chimique du réactif de Yariv (Showalter, 2001).

Fonctions des AGP

Du fait de leur grande variété structurale, les AGP sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques. L'étude fonctionnelle des AGP est réalisée le plus souvent grâce à l'utilisation du réactif de Yariv (**Figure I.32**), ou encore par l'utilisation des anticorps monoclonaux qui permettent d'identifier essentiellement les épitopes associés aux parties glycosidique des AGP (Seifert *et* Roberts., 2007 ; Pareira *et al.*, 2014). En effet, les AGP ont la particularité de se lier de façon réversible au réactif β -D-glucosyl Yariv (β -GlcY) permettant ainsi leur localisation dans les tissus, leur isolement et l'étude de leurs fonctions (Yariv *et al.*, 1967 ; Cassab, 1998).

Les AGP sont impliquées dans plusieurs processus biologiques tels que la division cellulaire, les processus de mort cellulaire programmée, la différentiation cellulaire, l'expansion cellulaire et notamment du tube pollinique (Mollet *et al.*, 2002), ainsi que dans les interactions plantes-pathogènes (Marzec *et al.*, 2014).

Au niveau racinaire, il a été montré que les AGP interviennent dans le développement des poils absorbants de l'orge (Marzec *et al.*, 2015), mais aussi dans la reconnaissance et l'attachement des rhizobactéries sur la racine (Vicré *et al.*, 2005 ; Nguema-Ona *et al.*, 2013). De récents travaux réalisés sur les AGP issues de l'apex racinaire de pois (*Pisum sativum*) et de colza (*Brassica napus*) montrent que ces protéoglycannes induisent l'enkystement des zoospores d'*Aphanomyces euteiches* et empêchent leur germination. Ces données suggèrent que les AGP sont impliquées dans la lutte contre les infections précoces de la racine, et mettent en évidence leur possible nouveau rôle lors des interactions racines-oomycètes (Cannesan *et al.*, 2012).

En conclusion, les HRGPs jouent plusieurs rôles cruciaux dans le bon fonctionnement des plantes. En plus des HRGPs classiques (AGP, Extensines EXTs et PRPs), les HRGPs hybrides ou chimères présentent différents domaines dont un ou plusieurs modules HRGPs ainsi qu'une partie protéique appartenant à d'autres familles (Showalter 2010 ; Kieliszewski, 2001; Tan *et al.*, 2004; Estevez *et al.*, 2006).

En parallèle des outils tels que le réactif de Yariv et les anticorps monoclonaux, l'analyse bioinformatique des séquences protéiques (Showalter *et al.*, 2010), permettant d'identifier différents domaines, peut être utilisé comme un outil d'analyse fonctionnelle, pour l'identification et la classification des HRGPs chez les végétaux.



Figure I.33 : Stratégie générale de l'analyse bioinformatique des séquences pour la classification des HRGPs (AGP, EXTs, et PRPs) chez Arabidopsis.

Les AGP classiques sont composées de 50% d'acides aminés Pro, Ala, Ser, Thr (PAST). Les Lys-rich AGP correspondent aux AGP classiques contenant un domaine Lys-rich. Les AG peptides correspondent à des séquences de 50 à 90 acides aminés et contenant 35% de PAST. Les FLAs correspondent aux séquences contenant un domaine fasciclin. Pour ces quatre cas, la présence de motifs répétés de type AP, PA, SP et TP est recherchée. Les extensines contiennent un ou plusieurs motifs répétés de type SPPP ou SPPPP. Quant aux PRPs, elles correspondent aux séquences contenant plus de 45% d'acides aminés PVKCYT ou alors la présence de motifs KKPCPP ou PVX (K/T) avec ou sans motif de type PPV. De plus, une recherche de peptide signal et d'ancre GPI peut être effectuée (Showalter *et al.*, 2010).

I.4. Identification in silico des HRGPS

Une des particularités majeures de la superfamille des glycoprotéines HRGPs est leur richesse en résidus proline (Pro) qui sont, pour la plupart, hydroxylés en hydroxyprolines (Hyp) sous l'action de la prolyl4-hydroxylase. Ces résidus Hyp sont distribués en plusieurs blocs, et organisés en clusters appelés glycomodules (Faik *et al.*, 2006). Au cours de la O-glycosylation, des motifs glycanniques vont être greffés de façon covalente aux groupements hydroxyles (OH) des hydroxyprolines (P) mais aussi des serines (S) et des thréonines (T).

La composition en acides aminés va conditionner la classification de la glycoprotéine dans l'une des trois grandes familles d'HRGPs (AGP, EXTs ou PRPs) (**Figure I.33**). Ainsi, les séquences primaires contenant 50% ou plus de résidus de type P, A, S et T vont appartenir à la classe des AGP. La classe des AG peptides correspond aux séquences ayant au moins 35% de résidus PAST tout en ayant une courte séquence de 50 à 90 résidus au maximum. Les extensines, quant à elles, doivent renfermer au moins deux répétitions de motif de type SPPP. Enfin, les PRPs contiennent au moins 45% de P, V, K, C, Y ou T ou des motifs KKCPP ou PVX(K/T) où X peut être n'importe quel acide aminé (Showalter *et al.*, 2010). En se basant sur cette analyse (**Figure I.33**), le programme BIO-OHIO, écrit en langage PERL, a permis l'automatisation de la classification des HRGPs par la recherche des motifs d'acides aminés. Une liste la plus exhaustive possible des HRGPs d'*A. thaliana*, 166 HRGPs putatives ont été classées comme suit : 85 AGP, 59 EXTs et 18 PRPs (Showalter *et al.*, 2010).

En amont de la classification basée sur la recherche des motifs, un tri des séquences contenant un site potentiel de Hyp-O-glycosylation peut être effectué à l'aide d'un glycomodule spécifique. Ce glycomodule est défini en accord avec l'hypothèse des Hyp contiguës de Kieliszewski et Lamport (Gomord *et al.*, 2010). Cette hypothèse définie la règle générale pour la prédiction des sites d'hydroxylation des Pro et des sites de Hyp-O-glycosylation. Ce site correspond à la répétition d'au moins deux fois du motif [Ala/Ser/Thr/Val]–Hyp avec deux Hyp consécutives qui ne doivent pas être séparées de plus de 11 acides aminés. En se basant sur ces informations, le motif consensus suivant [Ala/Ser/Thr/Val]–Pro(1,4)–X(0,10)–[Ala/Ser/Thr/Val]-Pro(1,4), a été défini, X pouvant être n'importe quel acide aminé. Ce glycomodule peut être utilisé pour la prédiction d'addition des chaines d'arabinosyl et/ou d'arabinogalactane sur les résidus Hyp des plantes (Gomord *et al.*, 2010).

I.5. La racine : ligne de défense cachée

La racine, partie souterraine de la plante, est un organe vital assurant les fonctions d'ancrage, de nutrition minérale et d'absorption d'eau (Petricka *et al.*, 2012). Le système racinaire est en interaction permanente avec une multitude de microorganismes de l'ordre d'une dizaine de milliers d'espèces (Berendsen *et al.*, 2012). L'importance de cette communauté microbienne et son rôle crucial dans la santé de la plante lui ont valu d'être considérée comme le second génome de la plante (Berendsen *et al.*, 2012).

Aux côtés des microorganismes bénéfiques de la rhizosphère, les pathogènes telluriques vont constituer une menace pour la plante, acteurs majeurs de la limitation des productions agricoles. De plus, la position souterraine de cette interaction rend ces pathogènes plus difficile à contrôler par rapport à ceux qui s'attaquent aux parties aériennes de la plante (Raaijmakers *et al.*, 2008).

Le système immunitaire racinaire reste très peu étudié, comparé aux mécanismes moléculaires de défense des parties aériennes (Attard et al., 2010 ; Wyrsch et al., 2015). Néanmoins, son étude peut apporter des éléments de compréhension des interactions avec les pathogènes telluriques, d'autant que les mécanismes mis en jeu s'avèrent être différents de ceux mis en évidence dans les feuilles. Par exemple, Schlink *et al.*, en 2009, ont montré une différence de réponse immunitaire entre les feuilles et les racines du hêtre en réponse à l'oomycète *Phytophthora citrocola*. Ils ont également montré que les principaux gènes induits au niveau de la racine du hêtre ne sont pas exprimés ou ne disposent d'aucuns équivalents au niveau des gènes exprimés dans les feuilles (Attard et al., 2010).

En plus d'une différence de réponse immunitaire entre les feuilles et les racines (Attard *et al.*, 2010; Wyrsch *et al.*, 2015). En 2013, Balmer et Mauch-Mani ont montré que cette réponse racinaire est également organe-spécifique. Un autre exemple de cette défense organe-spécifique est la résistance de la partie supérieure d'*A. thaliana* à *Magnaporthe oryzae* comparée à la partie racinaire qui est sensible (Schreiber *et al.*, 2011). Egalement, une réponse tissu-spécifique a été observée dans des tissus racinaires vis-à-vis d'un MAMP (Millet *et al.*, 2010). Ces observations peuvent expliquer l'aptitude ou la capacité d'un pathogène à infecter une plante entière ou un organe particulier de la plante.



Figure I.34 : Mise en évidence des cellules bordantes chez plusieurs espèces végétales

Le nombre de cellules bordantes (BC) produites varie selon les espèces végétales. A) BC de Carotte, B) de Soja, C) de Maïs, D) du pois, E) le cotton et F) Arabidopsis (Hawes *et al.* 2003). « Number of cells » : nombre de cellules bordantes.





a) Coupe longitudinale d'un apex racinaire de *Linum grandiflorum* (lin). Le RAM présente une organisation fermée. b) Coupe longitudinale d'un apex racinaire de *Pisum sativum* (pois). Le RAM présente une organisation ouverte. c) Coupe longitudinale d'un apex racinaire de *Daucus carota* (carotte). Le RAM présente une organisation semi-ouverte (Groot *et al.*, 2004). C: cortex, R: rhizoderme, RAM: méristème apical racinaire, RC: coiffe racinaire, VC: cylindre vasculaire. Echelle 50 μm (a, b et c).

Au niveau racinaire, il a été démontré que la zone d'élongation constitue souvent la zone d'entrée privilégiée pour les pathogènes (Attard *et al.*, 2010 ; Cannesan *et al.*, 2012). La préférence de la zone d'élongation comme porte d'entrée des pathogènes par rapport aux autres parties racinaires notamment l'apex, peut être due à la présence de cellules bordantes (BC) à ce niveau. Les BC synthétisent des protéines et des métabolites spécifiques distincts de ceux produites par la coiffe racinaire (Brigham *et al.*, 1995 ; Wen *et al.*, 2007). Ces cellules sont reconnues pour participer activement à la protection racinaire (Hawes *et al.*, 2000 ; 2003 ; Cannesan *et al.*, 2012)

I.5.1. Les cellules bordantes (BC)

I.5.1.1. Origine et production des cellules bordantes (BC)

Les BC de racine sont définies comme des cellules se détachant de la coiffe en présence d'eau et se trouvant libérées individuellement dans la rhizosphère (Hawes *et al.*, 2003). Les BC ont longtemps été ignorées par le monde scientifique et considérées comme des cellules racinaires en desquamation. Le Pr Martha Hawes de l'université de Tucson aux USA est la première scientifique à s'être intéressée à ces cellules. La production et le détachement des BC sont finement régulés à la fois par des signaux endogènes et environnementaux (Brigham *et al.*, 1995; Gunawardena et Hawes, 2002 ; Driouich *et al.*, 2007). La production et la libération de ces cellules sont variables selon l'espèce (de zéro à plusieurs milliers par racine), mais restent constantes pour des espèces végétales apparentées au sein d'une même famille (Groot *et al.*, 2004; Hawes *et al.*, 2003 ; Hamamoto *et al.*, 2006) (**Figure I.34**). La production et le mode de détachement des BC sont corrélés au type de méristème racinaire appelé RAM (Root Apical Meristem) (Hamamoto et al., 2006).

Chez les angiospermes eudicotylédones trois types de RAM ont été observés : les RAM fermés, les RAM ouverts et les RAM intermédiaires (**Figure I.35**) (Groot *et al.*, 2004 ; Rost, 2010). Le nombre de cellules bordantes produites dépend du type de RAM. Il a ainsi été décrit que les plantes possédant un RAM ouvert produisaient un nombre plus important de BC (Groot *et al.*, 2004).

Contrairement aux RAM ouverts et aux RAM intermédiaires qui produisent et libèrent des BC, les RAM fermés rencontrés chez les brassicacées comme le colza, la moutarde ou encore Arabidopsis libèrent des cellules apparentées aux cellules bordantes (BLC) (Vicré *et al.*, 2005 ; Driouich *et al.*, 2007).



Figure I.36 : Organisation des cellules apparentées aux cellules bordantes (BLC)

A : Organisation des BLC d'*A. thaliana* (adapté de Plancot *et al.*, 2013 ; Driouich *et al.*, 2010) B : BLC de lin colorées au Calcofluor-white. Trois différents morphotypes sont observés : les BLC sphériques (sBLC), les BLC allongées (eBLC) et les BLC filamenteuses (fBLC). RC : Root Cap; BLC : Border Like Cells ; WT : Wild Type. Echelle : A : 20 mm; B : 20μm



Figure I.37 : Attraction et immobilisation des nématodes par les BC du pois.

a) Les nématodes ne sont pas attirés par les apex de pois dont les BC ont été ôtées b) contrairement aux apex sur lesquels les BC ont été gardées. c) Groupe de BC isolées après contact des nématodes mobiles depuis quelques secondes. d) Groupe de BC au contact depuis 30 minutes avec les nématodes. Ces derniers deviennent rigides et immobiles (Hawes *et al.*, 2000).

Ces cellules ont la particularité de rester attachées en files de cellules superposées, et d'adhérer à l'apex racinaire contrairement aux cellules bordantes qui sont libérées de façon individuelle (**Figure I.36**). En dehors des Brassicassées, la présence des BLC a également été mise en évidence chez des Angiospermes Eudicotylédones, ainsi que chez d'autres plantes appartenant à la famille des *Lamiaceae*, *Linaceae* et des *Solanaceae* (Driouich *et al.*, 2012). La présence de ces cellules a été également été mise en évidence chez les légumineuses, notamment chez l'*Accacia mangium* (Endo *et al.*, 2011).

I.5.1.2. Fonction des BC dans la protection racinaire

Le détachement des BC dans la rhizosphère s'accompagne de modifications dans l'activité métabolique et l'expression génique de ces cellules. En effet, les BC sont spécialisées dans la production de molécules antimicrobiennes telles que des anthocyanines aux propriétés anti-oxydantes, des phytoalexines aux propriétés antibiotiques, des enzymes destinées à « détruire » les pathogènes (Wen *et al.*, 2007; 2009 ; Cannesan *et al.*, 2011 ; 2012). Ainsi les BC jouent un rôle considérable dans la protection racinaire et contre les stress abiotiques et biotiques (Hawes *et al.*, 2000 ; 2003). Des études récentes soulignent l'importance de ces cellules dans les interactions avec les microorganismes bénéfiques et/ou pathogènes (Gunawardena *et al.*, 2005 ; Xie *et al.*, 2012 ; Cannesan *et al.*, 2012). Le type d'interaction varie suivant le génotype de la plante et du micro-organisme. Les BC peuvent attirer, refouler ou bien n'exercer aucun effet vis-à-vis du microorganisme considéré (Gunawardena *et al.*, 2005 ; Hawes *et al.*, 2003).

Les BC de pois ont été choisies comme modèle d'étude des interactions cellules bordantes / pathogènes (Hawes *et al.*, 2000). Comme exemple de mécanisme de défense lié aux BC, on peut citer l'effet d'attraction des pathogènes. En effet Martha Hawes (2000) démontre qu'une racine de pois, à laquelle les BC ont été ôtées de l'apex racinaire, perd sa capacité à attirer les nématodes. A l'inverse, les racines possédant leurs BC attirent très rapidement des nématodes autour de l'apex racinaire. Après trente minutes au contact des BC, les nématodes cessent tout mouvement et se figent (**Figure I.37**).

Zhao *et al.*, (2000) ont également mis en évidence un chimiotactisme positif entre le nématode *Meloidogyne incognita* et les BC de pois, générant un changement morphologique de ces cellules (Zhao *et al.*, 2000).



Figure I.38 : Infection de l'apex racinaire de pois par le champignon pathogène *Nectria haematococca*.

a) Après 3 jours d'inoculation, l'apex et les BC sont recouverts d'un manteau d'hyphes. b) Le détachement des BC laisse apparaître l'apex racinaire dépourvu d'infection. c) Observation des BC détachées et des mycelium (Hawes *et al.*, 1998).





a) Racine de pois observée en lumière transmise. b) Coloration du mycélium en utilisant la lectine WGA (Wheat Germ agglutinin) couplée au FITC. L'apex racinaire est dépourvu d'infection. (c) Cinétique de l'infection racinaire pour les différents tissus : la zone de maturation, la zone d'élongation et la coiffe racinaire. L'infection de la racine se fait au niveau de la zone d'élongation (Cannesan *et al.*, 2011, 2012). EZ: zone d'élongation, MZ: zone de maturation, RC: coiffe racinaire. Echelle 100 μm.

De même, lors de l'inoculation de l'apex racinaire de pois par le champignon pathogène *Nectaria haematocca*, les BC sont rapidement recouvertes d'un manteau d'hyphes tandis que l'apex racinaire se trouve épargné par l'infection (**Figure I.38**) (Gunawardena *et al.*, 2005 ; Gunawardena et Hawes, 2002 ; Hawes *et al.*, 2011 ; 2012). Les BC ainsi que les hyphes du champignon se retrouveront détachées du reste de la racine, laissant l'apex racinaire libre de toute infection. Ces observations suggèrent que les BC serviraient spécifiquement d'hôte pour inhiber *N. haematocca* et ainsi protéger la coiffe racinaire et le méristème racinaire contre l'infection.

Plus récemment des études ont révélé que les BC du pois sont impliquées, localement, dans la défense de l'apex racinaire contre l'oomycète pathogène *Aphanomyces euteiches* (**Figure 1.39**). Tandis que la zone d'élongation se trouve infectée par le mycélium d'A. *euteiches*, l'apex racinaire et les BC restent indemnes d'infection dans les étapes précoces de l'infection. En réponse à l'infection il a été montré une augmentation du nombre de BC produites ainsi qu'une production accrue de pisatine, un isoflavonoïde connu pour inhiber *in vitro* la croissance du pathogène (Cannesan *et al.*, 2011). Par ailleurs, les AGP des BC de pois interfèrent avec le cycle de développement d'A. *euteiches* (Cannesan *et al.*, 2012)

I.5.2. Les exsudats racinaires

Les exsudats racinaires sont essentiellement produits par l'apex racinaire et les BC. Ce sont des substances sécrétées dans l'environnement par une racine intacte et saine (Dundek *et al.*, 2011). Ces substances sécrétées vont affecter les communautés microbiennes au contact de la rhizosphère de la plante. Les exsudats racinaires sont composés de deux classes principales :

- les exsudats racinaires de faible poids moléculaire, tels que les acides aminés, les acides organiques, les sucres et autres métabolites secondaires qui représentent leur diversité (Badri et Vivanco, 2009)
- les exsudats racinaires contenant des molécules de hauts poids moléculaires tels que les polysaccharides et les protéines. Cette classe représente la plus abondante dans les exsudats en termes de masse (Badri et Vivanco, 2009)

Dans les exsudats, on retrouve également un élément clé de la défense : les ADN extracellulaires (Wen *et al.*, 2009).


Figure I.40 : Représentation de la complexité des interactions entre la rhizosphère et le système racinaire de la plante, sous la médiation des exsudats racinaires.

La plante produit des signaux chimiques qui vont attirer les bactéries par chimiotactisme. Les interactions positives de la plante, médiée par les exsudats racinaires, inclut une imitation des facteurs de croissance afin de faciliter le développement de la plante. L'interaction négative médiée par les exsudats correspond à une production de composés antimicrobiens tels que les phytoalexines, les nématicides et les insecticides. Les différentes flèches sur la figure indiquent les différents échanges chimiques entre les différents partenaires (Haichar *et al.*, 2014).

La quantité et la qualité des exsudats racinaires dépendent fortement de l'espèce végétale, de son âge et enfin des facteurs biotiques et abiotiques (Jones *et al.*, 2004). A travers l'exsudation de plusieurs types de composés, la plante régule la communauté microbienne du sol et se protège des herbivores. Hormis promouvoir les symbioses bénéfiques et les changements des propriétés physico-chimiques du sol, l'exsudation permet également d'inhiber la croissance des plantes environnantes, en compétition (Nardi *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2003). De façon générale, les exsudats racinaires jouent un rôle de médiateur dans la communication avec les tous les éléments de la rhizosphère (**Figure I.40**).

Comme résumé dans la **figure I.40**, les exsudats racinaires régulent plusieurs types d'interaction positivement ou négativement en fonction du sujet. Cependant nous nous focaliserons uniquement sur le rôle de ses exsudats racinaires dans la médiation de la défense racinaire (Berendsen *et al.*, 2012 ; Haichar *et al.*, 2014).

I.5.2.1. Les exsudats racinaires impliqués dans la défense

Les exsudats racinaires à faibles poids moléculaire

- Les phytoalexines

Les phytoalexines sont des composés antimicrobiens de faible poids moléculaire, inductibles lors d'un stress biotique dans les exsudats racinaires contrairement aux phytoancipines retrouvées chez les plantes et présents de façon constitutive. Le concept des phytoalexines a été introduit il y a plus de 70 ans par Müller et Börger (Jeandet *et al.*, 2014) après observation de l'infection de tubercules de pomme de terre avec une souche de *Phytophthora infestans*. Les auteurs ont constaté qu'une primo infection est capable d'initier une réaction hypersensible qui inhibe de façon significative l'effet d'une infection ultérieure avec une autre souche de *P. infestans*. Cette inhibition est liée à un composé produit par les cellules de la plante lors de la réaction hypersensible qui a été nommé « phytoalexine » (Jeandet *et al.*, 2014).

Les phytoalexines présentent des structures chimiques très diverses et leur nature varie en en fonction des plantes. Chez la plante modèle *A. thaliana*, la camalaxine est la phytoalexine majoritaire mais aussi l'une des les plus connue du monde végétal (Jeandet, *et al.*, 2014).



Figure I.41 : Cinétique de production d'exsudats racinaire d'orge, de *Fusarium graminearum* et de leur interaction.

Les exsudats sont récoltés à 0,25 ; 1 ; 3 et 7 jours après infection, puis analysés par HPLC. a) culture de l'orge seule; b) culture de *Fusarium graminearum* seule et c) interaction entre les deux. 1, 4-hydroxyphenylacetic acid; 2, vanillic acid; 3, syringic acid; 4, p-coumaric acid; 5, ferulic acid; 6, benzoic acid; 7, indoleacetic acid; 8, t-cinnamic acid (Lanoue *et al.*, 2010).

En analysant les composés aromatiques dérivant des exsudats chez l'orge (*Hordeum vulgare*), infecté par *Fusarium graminearum*, Lanoue *et al.*, ont montré l'induction d'une synthèse de cinq phenylpropanoides avec des activités antifongiques (Lanoue *et al.*, 2010). Parmi ces phenylpropanoides, des expériences de marquage ont montré la synthèse *de novo* de la sécrétion de l'acide *t*-cinnamique (**Figure I.41**).

- Les terpénoïdes

Les terpénoïdes forment une large classe de molécules de défense que l'on retrouve aussi bien dans les parties supérieures de la plante, qu'au niveau racinaire et dans les exsudats (Baetz et Martinoia., 2014). Il est bien connu que certains composés terpénoïdes phytochimiques non volatiles tels que les momilactones peuvent être sécrétés dans la rhizosphère. Néanmoins il a été récemment démontré que des composés volatiles organiques (VOCs) peuvent être émis par la racine pour jouer un rôle direct dans la défense (Baetz et Martinoia., 2014).

Les composés volatiles dérivés des plantes avaient été décrits dans des interactions tritrophiques c'est à dire en attirant directement les ennemis des herbivores et ainsi en assurant une défense indirecte. Au niveau racinaire on peut citer comme exemple le monoterpène 1,8-cineole qui est synthétisé en culture par des « hairy roots » d'*A. thaliana* lors d'une interaction avec un pathogène (Baetz et Martinoia., 2014).

Time	No. of Border Cells	Extracellular Protein
h		μg/root
0	0	0.0001
2	430 ± 57	0.16 ± 0.02
5	$1,000 \pm 94$	0.35 ± 0.05
10	$2,120 \pm 350$	0.62 ± 0.15
15	3,140 ± 380	0.84 ± 0.06
20	3,650 ± 420	1.0 ± 0.08
24	4,190 ± 450	1.3 ± 0.05
36	$4,285 \pm 395$	1.3 ± 0.09

Tableau I.1 : Dynamique de
production de protéines lors
d'une induction de
séparation des BC.

Pour collecter les protéines dans les exsudats, les BC sont culotées par centrifugation avant l'analyse du surnageant (Wen *et al.*, 2007)



Figure I.42 : Dégradation protéolytique des protéines du « sécrétome », augmentant le degré d'infection de l'apex racinaire de pois.

A) 94% \pm 4% des racines de pois résiste à une inoculation de 10⁵ spores du champignon *Nectaria haematococca*. Après 3 jours post-inoculation aucun signe n'est détecté et la racine croit normalement avec 2,5 cm/jour. B) Observation du développement du champignon sur la racine avec un manteau d'hyphes à travers les BC, aucune nécrose n'est observée. C) Développement d'une nécrose sur l'apex racinaire 2 à 3 jours après un traitement à la protéinase K et une inoculation avec le champignon. D) Nécrose visible localisée au niveau de l'apex racinaire. (Wen *et al.*, 2007).

Les exsudats racinaires à haut poids moléculaire

- Diversité protéique

L'analyse du « sécrétome », étude globale de l'ensemble des protéines sécrétées par une cellule, un tissu ou un organisme, qui correspond à l'ensemble des sécrétions de la coiffe et des BC a permis d'isoler plus de 100 protéines du pois (Wen *et al.*, 2007). De plus il a été montré que la quantité protéique est corrélée au nombre de cellule bordantes produites (**Tableau I.1**).

Les protéines identifiées dans le sécrétome incluent des protéines impliquées dans la défense telle que les extensines, des Hyp-pro glycoprotéines, des endoglucanes transférases, des invertases, des β -galactosidases, des cellulases, des α -manosidases, et des oligosaccharyl-transférases qui ont été auparavant identifiées comme appartenant à la paroi végétale chez Arabidopsis, et le maïs (Wen *et al.*; 2007).

Afin de vérifier le rôle de défense des protéines sécrétées, les racines de pois ont subi un traitement à la protéinase K ainsi qu'un traitement avec des spores de *Nectaria haematococca* (**Figure I.42**). En absence de protéinase K, l'incidence de la maladie n'est que de 4% ± 3 . Trois jours après le traitement, cet indice passe à 100%, témoignant ainsi du rôle de défense des protéines du sécrétome contre *N. haematococca* (Wen *et al.*, 2007).



Figure I.43 : Résumé des rôles possible des AGP dans les interactions entre la racine et les microorganismes.

A) les AGP sont capables d'attirer les microorganismes symbiotiques (bactéries, champignons), qui vont adhérer à la racine et développer des structures d'infection. Les AGP sont aussi capable de repousser ou d'inhiber le développement des pathogènes. B) les microorganismes du sol sont capables de dégrader les AGP et de libérer ainsi des oligosaccharides, ou des glycopeptides qui vont être considérés comme des DAMPs et déclencher des réactions de défense (flèches rouges). C) les AGP sécrétés favorisent la colonisation racinaire par des microorganismes bénéfiques (PGPR, agent de biocontrôle) qui vont aussi être capable de déclencher des réactions de défense telle que l'immunité systémique acquise (ISR, flèche bleue). Les flèches violettes indiquent une possible induction et/ou modulation des mécanismes de défense dans les parties supérieurs de la plante. (-) Inhibition du système immunitaire de la plante (A); (+) activation du système immunitaire (B, C) (Nguema-Ona *et al.*, 2013).

- Les arabinogalactans proteins (AGP)

La présence de résidus d'arabinose et de galactose de façon majoritaire dans les exsudats racinaires, suggèrent la présence de glycoprotéines de type AGP (Knee *et al.*, 2001 ; Elis *et al.*, 2010 ; Nguema-Ona *et al.*, 2013). La présence des AGP dans les exsudats racinaires a été confirmée en 2012 par Cannesan *et al.*

Au niveau de la rhizosphère, les AGP participent à la régulation des interactions plantespathogènes. Il a ainsi été montré que des AGP purifiées à partir de la coiffe racinaire du pois vont être capables d'attirer les zoospores d'*Aphanomyces euteiches* par chimiotactisme, et accélérer leur enkystement (Cannesan *et al.*, 2012). Les AGP ont également été mises en évidence dans les exsudats racinaires de plusieurs plantes comme le pois (Xie *et al.*, 2012 ; Knee *et al.*, 2001), le soja (*Glycine max* L.) (Timotiwu et Sakurai, 2002), Arabidopsis (Vicré *et al.*, 2005 ; Durand *et al.*, 2009) et le maïs (Ma *et al.*, 2010).

Pour coloniser la racine, les microorganismes doivent être capables d'utiliser les nutriments présents dans le sol. Ainsi il a été démontré que plusieurs microorganismes du sol dont des agents de biocontrôle, des pathogènes telluriques et plusieurs autres pathogènes produisent des enzymes de dégradation des AGP telle que des β -1,3-galactanases, β -1,6-galactanases, arabinofuranosidases et des β –glucuronidases. De plus, des études ont montré que les bactéries de la rhizosphère sont capables de se développer sur un milieu riche en AGP. Ceci suggère l'habilité des bactéries à hydrolyser et métaboliser les AGP, leur apportant ainsi une source de nutriments pour assurer leur croissance dans la rhizosphère (Knee *et al.*, 2001).

Au vu de l'ensemble de ces études, un modèle a été établi en 2013 par Nguema-Ona *et al.*, qui retrace le rôle hypothétique des AGP dans les interactions entre la plante et les microorganismes du sol (**Figure I.43**).



Figure I.44 : ADN extracellulaire (ADNex)

A) ADNex (jaune) provenant des Neutrophiles humains co-incubés avec le toxoplasma (un protozoaire) en présence de cytochalasine D afin de prévenir l'invasion. L'ensemble de ce complexe forme le NET (Neutrophil Extracellular Trap) (Abi Abdallah et Denkers, 2012). B) Marquage au DAPI (4-6-diamidino-2-phenylindole, Kubista *et al.*, 1987) d'ADNex dans les exsudats de pois (Wen *et al.*, 2007). Echelle : 0.1 mm

 Tableau I.2 : Chronologie de la mise en évidence des ADNex dans la défense chez les animaux et les végétaux (adapté de Driouich *et al.*, 2013)

Animaux	Végétaux
Brinkmann et al. (2004)	Wen <i>et al.</i> (2007)
Alghamdi et Foster (2005)	Wen <i>et al.</i> (2009)
Sumby et al. (2005) Buchanan <i>et al.</i> (2006)	Curlango-Rivera et Hawes (2011)
Urban et al. (2006) Guimaraes-Costa et al. (2009)	Cannesan et al. (2011)
Fuchs <i>et al.</i> (2010)	Cannesan et al. (2012)
Young <i>et al.</i> (2011)	Curlango-Rivera et al. (2013)
McDonald <i>et al.</i> (2012)	

I.5.2.2. Les ADN extracellulaires

L'ADN extracellulaire (ADNex, Figure I.44) a été identifié pour la première fois chez l'homme par Brinkmann *et al* en 2004. Les globules blancs du système immunitaire chez les humains, ainsi que chez d'autres espèces (ex le poisson), sont capables de déployer un système de défense complexe appelé NET (Neutrophil Extracellular Trap). Il est composé d'ADN, ainsi que d'enzymes en réponse à une infection (Young *et al.*, 2011). Le NET permet de neutraliser les bactéries, les champignons et les pathogènes de type protozoaire en les piégeant dans une matrice en présence de peptides antimicrobiens et de protéines (Urban *et al.*, 2006; Guimaraes-Costa *et al.*, 2009) (Figure 1.44-A). Les histones et les ADNex constituent les composants structuraux du NET et un traitement à la DNase va affecter l'intégrité de ce réseau et perturber sa fonction de protection. Chez les humains, les pathogènes de type *Streptococcus* du groupe A sont capables de contourner le NET en sécrétant de la DNase extracellulaire. En éliminant par mutagénèse dirigée la capacité de ces *Streptococcus* à synthétiser de la DNase, ces derniers perdent cette habilité et vont s'accumuler directement au niveau du site d'infection où ils vont être détruits (Sumby *et al.*, 2005; Buchanan *et al.*, 2006).

Récemment, des travaux de Wen *et al.* (2007) ont fait état de l'existence d'ADNex au niveau du système de sécrétion des plantes. La découverte de protéines de liaisons à l'ADN ainsi que des histones H4 au sein du « sécrétome » des cellules bordantes et de la coiffe racinaire a permis de faire un parallèle avec les ADN extracellulaires retrouvés de façon générale chez les mammifères. En 2007, Wen *et al.*, avaient mis en évidence pour la première fois la présence ADNex dans le mucilage du pois (**Figure 1.44-B**).

Afin de vérifier que l'ADNex identifié chez les plantes joue un rôle dans la défense comme ce qui a été mis en évidence au niveau du système immunitaire humain, un traitement avec de la DNase I est appliqué avant et après infection chez le pois. Dans la condition contrôle, seule 3% des racines sont infectées (Gunawardena et Hawes, 2002; Wen *et al.*, 2007). Des spores du champignon *N. haematococca* sont déposées sur les apex racinaires de pois après un traitement à la DNase I.





A) la plupart des racines infectées résistent aux champignons (Gunawardena et Hawes, 2002; Gunawardena *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2007) : aucune lésion constatée sur les racines qui restent saines et continuent de croître comme chez le contrôle B) Une fois co-traité avec de la DNase I et le champignon, 100% des racines développent un nécrose au bout de 48 à 72h. La croissance racinaire s'arrête et le champignon prolifère (flèches). C) Contrôle traité avec uniquement de la DNase I, aucune nécrose n'est observée. (Wen *et al.*, 2009)



Figure I.46 : Observation au microscope confocal de l'interaction entre *N. haematococca* et l'apex racinaire.

A) En absence de DNase I, les hyphes du champignon (en vert) n'adhèrent pas à l'apex racinaire (en rouge) et ne font que 100 μ m de longueur. B) En co-traitement DNase I et *N*. *haematococca*, les hyphes sont plus développés et arrivent à pénétrer l'apex racinaire. (Wen *et al.*, 2009). Echelle : 20 μ m

Chez ces plantes co-incubées avec de la DNase I (Figure I.45), 100% des racines développent une importante nécrose qui s'accompagne d'une induction de l'expression des gènes de défense ainsi qu'un arrêt de la croissance 48 à 72h après inoculation des spores (Wen *et al.*, 2009).

D'un point de vue microscopique, l'observation des racines de pois 36 heures après une incubation avec des spores de *N. haematococca* montre des hyphes faisant 100 μ m de longueur à proximité de l'apex racinaire (**Figure 46-A**). Une faible population de BC est également observée autour de l'apex racinaire. Une fois les racines traitées avec de la DNase I dans les mêmes conditions, les hyphes se développent de façon plus importante et pénètrent l'épiderme de l'apex racinaire. La population de BC autour de racine est également en nette augmentation (**Figure 46-B**) (Wen *et al.*, 2009)



Figure I.47 : Root Extracellular Trap (RET)

b) Mise en évidence du RET autour de la coiffe racinaire (délimité par les tirets) coloré à l'encre de chine. Induction du RET sur une cellule bordante isolée en réponse à *Pseudomonas aeruginosa* (a) et aux zoospores de *Fusarium solani f. sp. pisi* (c). BC : cellules bordantes; RC, coiffe racinaire; Echelle : 20 μm (Driouich *et al.*, 2013).



Figure I.48 : Modèle de fonctionnement du RET (Root Extracellular Trap)

Le RET est composé de BC, de protéines antimicrobiennes, des arabinogalactanes protéines, des ADN extracellulaires, etc. Des expériences ont montré que le RET est capable d'altérer les agressions des différents pathogènes (-), tout en favorisant des échanges avec les bactéries bénéfiques du sol (+) et de façon générale assure la protection de la racine (Driouich *et al.*, 2013). PR Protein: Pathogenesis-Related proteins; PGPR: plant growth promoting rhizobacteria; RC, root cap.

I.6. Le Root Extracellular Trap (RET)

La récente découverte des ADNex sécrétés par les cellules bordantes du pois, ainsi que la mise en évidence de leur rôle dans la défense a permis de faire un rapprochement avec le NET (Neutrophil Extracellular Traps) des cellules spécialisées des mammifères (Driouich *et al.*, 2013). La fonction principale du NET consiste en l'immobilisation des pathogènes puis leur destruction dans une matrice de peptides antimicrobiens et de protéines (Wen *et al.*, 2007). Par analogie chez les plantes, on trouve des ADNex sécrétés par les cellules bordantes ainsi qu'une batterie de protéines et de polysaccharides antimicrobiens à travers les exsudats racinaires en présence d'un pathogène (**Figure I.47**).

En se basant sur ces éléments, Driouich *et al.*, (2013) ont établi un modèle de défense en synergie incluant les ADNex, les cellules bordantes, les polysaccharides et autres protéines extracellulaire regroupés sous le nom de RET (Root Extracellar Trap). Le RET va ainsi réguler de façon générale les interactions positives et négatives autour de la racine (**Figure I.48**).

I.7. Objectifs du projet de thèse

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'une cotutelle internationale entre l'Université de Rouen et l'Université de Niamey au Niger. L'objectif est d'étudier le rôle du système racinaire de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) dans la protection contre les agents pathogènes telluriques.

De nombreuses études portent sur l'impact des conditions environnementales sur le développement et la qualité nutritionnelle des tubercules de pomme de terre (Vasquez-Robinet *et al.*, 2008 ; Gong *et al.*, 2015). Cependant aucune étude n'a encore porté intérêt à l'analyse du système racinaire de la pomme de terre, de ses cellules bordantes (BC) ainsi que de ses exsudats racinaires.

En effet, les cellules BC jouent un rôle crucial dans la protection racinaire et contribuent à façonner la microflore du sol (Hawes *et al.*, 2000 ; Gunawerdena et Hawes, 2002 ; Curlengo-Riveira *et al.*, 2010). Ainsi, notre hypothèse est que les cellules bordantes et les exsudats racinaires pourraient également intervenir pour contrôler l'environnement immédiat des tubercules de pomme de terre dans le sol. En effet, les BC et les exsudats interagissent avec les microorganismes telluriques en les attirant par chimiotactisme ou en les repoussant, régulant ainsi la microflore du sol. Toute fois le système racinaire de la pomme de terre reste à l'heure actuelle très peu étudié et méconnu.

Pour cela, la recherche et la caractérisation des BC et des exsudats racinaires chez la pomme de terre constituent l'un des objectifs de ces travaux de thèse.

Pour ce faire, il est nécessaire de mettre au point un système de culture de la pomme de terre qui permettra de préserver les BC et de collecter les exsudats racinaires. Cette étape constitue un prérequis indispensable et constitue le premier objectif de la thèse d'autant plus que la pomme de terre n'est pas une plante étudiée au laboratoire Glyco-MEV.

Les BC ainsi collectées seront caractérisées par une approche microscopique qui permettra de mettre en évidence leur morphologie, leur viabilité ainsi que la composition monosaccharidique de leur paroi.

L'ensemble de ces démarches s'inscrivent dans les axes de recherche du laboratoire Glyco-MEV sur les « Cellules bordantes et la protection des plantes » au travers de la caractérisation moléculaire de la réponse de ces cellules face à des pathogènes ou des éliciteurs.

Les bactéries *Ralstonia solanacearum* ou *Pectobacterium atrosepticum* sont des agents telluriques majeurs de la pomme de terre. Plus particulièrement, *R. solanacearum* est un agent responsable d'importants dégâts au niveau des cultures au Niger. Les données bibliographiques portant sur la tomate (*Lycopersicon Solanum*) révèlent que les exsudats racinaires jouent un rôle considérable dans les interactions avec les bactéries *R. solanacearum* (Yao et Allen, 2006). Une caractérisation détaillée des exsudats de pomme de terre sera réalisée sur des racines issues de plantes saines ou de plantes traitées par des éliciteurs bactériens.

La caractérisation de ces exsudats racinaires visait à analyser leur composition polysaccharidique, notamment la mise évidence de glycoprotéines appartenant à la famille des HRGPs telles que les arabinogalactans proteins et les extensines qui jouent un rôle dans la défense racinaire (Cannesan *et al.*, 2012 ; Driouich *et al.*, 2013 ; Plancot *et al.*, 2013).

Afin d'appréhender la fonction des BC et des exsudats dans la défense racinaire de la pomme de terre, une première approche consiste à tester l'impact des éliciteurs provenant de la bactérie *P. atrosepticum* sur les plantes de pomme de terre d'une part, et l'effet direct de exsudats de pomme de terre sur la croissance de cette bactérie.

Pour finir, au vu de l'importance des glycoprotéines de la superfamille des HRGPs et de leur implication dans les processus de défense chez les végétaux, nous avons initié le développement d'un outil bio-informatique capable d'identifier rapidement à travers la recherche de motifs connus et de glycomodules (Showalter *et al.*, 2010), l'ensemble de ces glycoprotéines dans le génome de la plante de pomme de terre. En effet, le génome de la pomme de terre, publié depuis 2010 (Visser *et al.*, 2009), reste faiblement annoté. Cet outil s'avère nécessaire pour l'identification et la classification des HRGPs de pomme de terre.

II.1. Matériel végétal

L'ensemble des expérimentations de ce projet de thèse a été réalisé à partir d'une culture d'explant certifié de pomme de terre cultivar Désirée mis à disposition par le Comité Nord Plant de Pomme de terre.

II.2. Culture in vitro de « semence vraie » de pomme de terre

La culture *in vitro* est effectuée avec des graines de pomme de terre de variété Touareg fournies par Jacques et Martine Aublé de l'association agro-sans frontière. La culture est réalisée en conditions stériles, sous une hôte à flux laminaire pour éviter toute contamination. Les milieux de cultures, ainsi que les différents outils (pinces, cônes de pipette etc.) servant à la manipulation, sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 110 bars. Les graines de pomme de terre sont stérilisées en surface en les immergeant pendant une minute dans l'éthanol à 70%, puis 5 minutes dans l'hypochlorite de sodium dilué au 1/3. Les graines sont ensuite rincées avec une série de sept lavages de trois minutes chacun dans de l'eau milliQ. Les graines sont par la suite semées sur un milieu nutritif gélosé contenant 4,8 g/L de milieu MS (Murashige et Skoog), 30g/L de saccharose et 0,5% d'agar à pH 5,7 (Vicré *et al.*, 2005).

Pour finir, les boites sont fermées avec un ruban adhésif millipore puis placées verticalement dans des armoires de cultures avec une photopériode de 16h/jour à 22°C et 8h/nuit à 18°C. Les boites de pétri sont placées verticalement afin de permettre à la racine de croître suivant le sens du gravitropisme mais aussi pour éviter à la racine de pénétrer dans la gélose, pour faciliter l'observation des cellules bordantes.

II.3. Culture végétative d'explants de pomme de terre

Comme pour la culture de graines de pomme de terre, l'ensemble du matériel végétal doit être stérilisé. Les germes sur le tubercule de pomme de terre sont soigneusement découpés et rincés abondamment à l'eau pour enlever le restant de terre. Ils sont ensuite stérilisés en les immergeant 3 min dans l'éthanol à 70%, puis pendant 15 à 20 min dans l'hypochlorite de sodium dilué au 1/3, rincé ensuite par 10 lavages de 5 min à l'eau milliQ stérile.

Une fois stériles, les germes vont être débarrassés de leurs ébauches foliaires, et découpés au scalpel au niveau des nœuds. Les explants ainsi obtenus sont déposés délicatement dans des boites de pétri carrées contenant un milieu nutritif gélosé composé de 4,8 g/L de milieu MS (Murashige et Skoog), 30 g/L de saccharose et 0,5% d'agar, pH 5,7 (Vicré *et al.*, 2005).

Les boites sont fermées avec un ruban adhésif millipore, puis placées verticalement, comme précédemment, dans des armoires de cultures avec une photopériode de 16h/jour à 25°C et 8h/nuit à 18°C.

II.4. Mise en évidence des dépôts de callose

La mise en évidence des dépôts de callose est effectuée sur des plantules d'une dizaine de jours avec une longueur racinaire de 4 à 6 cm de long.

Les plantules sont élicitées à l'aide d'une solution inactivée de *Pectobacterium atrosepticum* à 1 mg/mL. Pour l'élicitation, une goutte de cette solution est déposée sur l'apex racinaire de la plante incubée ensuite en chambre de culture. Après 48 h, les racines sont découpées au-dessus de la zone d'élongation et scellées entre lame et lamelle avec du vernis à ongle puis subissent une fixation dans 5 mL d'une solution éthanol : acide acétique (3 :1) pendant 1h30. Les lames sont ensuite transférées successivement dans une solution d'éthanol à 70%, puis à 50% et enfin à 25%. Après ces 3 incubations d'1h30, les lames sont conservées dans de l'eau milliRO toute la nuit. Ensuite, un bain de 5 mL NaOH 10% est réalisé 4h à 37°C. Après 3 lavages d'1h dans 5 mL d'eau milliRO, l'échantillon est incubé à l'obscurité sur la nuit dans une solution de 150 mM de tampon phosphate pH 12 contenant 0,1% d'aniline blue. La présence des dépôts de callose est observée en microscopie confocale inversée à balayage laser à une longueur d'onde d'excitation de 405 nm et d'émission de 460-480 nm. Le contrôle négatif est réalisé sur des plantules non élicitées.

II.5. Mise en évidence des espèces réactives d'oxygènes (ROS)

La sonde CM-H₂DCFDA est utilisée pour la mise en évidence des ROS. 50 μ g de CM-H₂DCFDA en poudre sont solubilisés dans 50 μ L de 100% DMSO (diméthylsulfoxyde). Les 50 μ L sont ensuite dilués dans 450 μ L d'eau MilliQ. Cette solution représente la solution de travail et est conservée à l'abri de la lumière.

Les plantules sont déposées dans des plaques 4 puits (Fischer, Référence 10766933) disposant d'un compartiment qui permet de les garder en milieu liquide pendant l'observation au microscope confocal à balayage laser. Les plantules sont placées délicatement sur les plaques recouvertes d'une lamelle avec 150 μ L de tampon phosphate K₂HPO₄ (20 mM, pH 6,1) pour éviter leur déshydratation, puis 30 μ L de la sonde CM-H₂DCFDA sont ajoutés. Après la mise au point, 5 min d'attente sont nécessaires pour vérifier que la plante n'a pas été stressée lors de la mise au point, et pour éviter les faux positifs. Dans le cas où la plante n'est pas stressée (absence de fluorescence), 80 μ L (en fonction de la concentration) de la solution d'éliciteur sont rajoutés directement sur la plaque. Une image est prise toutes les 5 minutes afin de mettre en évidence une cinétique de production des ROS à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et une longueur d'onde d'émission entre 510 et 530 nm.

NB : La puissance du laser représentée par le 'gain' est maintenue à une valeur constante durant toute l'expérimentation.

II.6. Mise en évidence des ADN extracellulaires (ADNex)

La mise en évidence des ADNex est effectuée à l'aide d'une sonde nucléique le Sytox Orange (Life technology, S11368) que l'on utilise directement sur le mucilage produit au niveau de l'apex racinaire des plantules de pomme de terre.

La solution stock de Sytox Orange (5 mM) est diluée dans du tampon phosphate à 5 μ M selon les recommandations du fournisseur et constitue la solution de travail. 150 μ L de la solution de travail sont prélevés pour rincer les apex racinaires de 5 plantules de pomme de terre, par influx-reflux avec la micropipette.

Le mucilage récupéré est incubé pendant 10 minutes avant d'être déposé sur des lames à puits à raison d'une vingtaine de microlitres par puits. Les lames sont ensuite recouvertes d'une lamelle et observées en microscopie confocale à une longueur d'onde d'excitation à 543 nm et une longueur d'onde d'émission à 570 nm.



Figure II.1 : Préparation de la gélose pour le test de chimiotactisme

Trois puits équidistants A, B et C ont été découpés dans le milieu solide coulé dans la boite de pétri. Les produits à tester sont déposés dans les puits opposés A et C et les bactéries dans le puits B, une fois que les composés déposés en A et C ont diffusé dans la gélose.

II.7. Mise en évidence du chimiotactisme

La mise en évidence du chimiotactisme de la bactérie pathogène *Pectobacterium atrosepticum* est effectuée avec des exsudats racinaires de plantule de pomme de terre. Cette expérimentation est réalisée en deux étapes.

Etape 1 : préparation des boites de pétri

Un milieu solide de culture de *P. atrosepticum* dont la composition pour un litre est de 4g/L d'acide polygalacturonique, 16,266g/L de K₂HPO₄, 0,899g/L de KH₂PO₄, 1,2g/L de (NH₄)2SO₄, 0,7% d'agar à pH 8, 20 mL d'une solution de MgSO₄7(H₂O) à 44,12 g/L et 10 mL d'une solution de CaCl₂ à 7,5 g/L, ajoutés après autoclave, est coulé dans des boites de pétri rondes. Une fois le milieu solidifié, trois puits équidistants sont découpés dans la gélose à l'aide de gabarits (**Figure II.1**).

Etape 2 : Dépôt des solutions d'exsudats racinaires

500 μ L d'une solution d'exsudats racinaires à 1mg/mL sont déposés dans le puits A et 500 μ L d'un deuxième composé compétitif par rapport au produit déposé en A ou d'un antibiotique dans le puits B. Les boites sont ensuite incubées pendant 1 heure à 25°C pour favoriser la diffusion des deux solutions à tester dans la gélose tout autour de leur puits respectif. A la fin de l'incubation, 500 μ L d'une suspension de *P. atrosepticum* à 10⁸ bactéries/mL (DO = 0.1) sont déposés dans le puits central (B).

Après incubation à 25°C pendant 72h, un chimiotactisme positif se traduira par un développement bactérien dans un des puits A ou C, et un chimiotactisme négatif par la multiplication des bactéries dans leur puits de dépôt B.

II.8. Effet des exsudats racinaires sur la croissance de *P. atrosepticum*

La première étape de cette expérimentation consiste à établir un coefficient de corrélation entre la densité optique (DO) lue à 580 nm et la quantité de *P. atrosepticum*. Pour ce faire, une numération bactérienne est effectuée en utilisant une cellule de Malassez.

Une fois le coefficient déterminé, une culture en milieu non renouvelé est initiée avec une DO de départ égale à 0,1 ce qui correspond à 10^8 bactéries par mL de préculture.

Afin d'établir la courbe de croissance, le milieu de culture PGA (4g/L d'acide polygalacturonique, 16,266g/L de K₂HPO₄, 0,899g/L de KH₂PO₄, 1,2g/L de (NH₄)2SO₄ et 0,7% d'agar à pH 8 pour 1L) est ensemencé avec un inoculum provenant d'une préculture de Pectobacterium qui est incubée pendant 16 heures à 25°C. La cinétique de croissance est suivie par la lecture de la densité optique d'un aliquot de la culture principale à 580 nm toutes les heures.

CHAPITRE III. Résultats

Au niveau racinaire, les cellules bordantes, les exsudats racinaires, et les ADN extracellulaires constituent des éléments clés dans la défense racinaire (Hawes *et al.*, 2000; 2003; Wen *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2009; Hawes *et al.*, 2011 Driouich *et al.*, 2013; N'Guema-Ona *et al.*, 2013). La racine ou ses exsudats peuvent être des agents répulsifs (Hawes *et al.*, 2000; 2003) ou des chimioattractants pour des pathogènes comme la phytobactérie *R. solanacearum* (Yao et Allen, 2006). En ce qui concerne les cellules bordantes de la pomme de terre, aucune donnée n'est actuellement disponible dans la littérature.

III.1. Caractérisation des Cellules Bordantes de pomme de terre

Le nombre de cellules bordantes produites augmente au cours de la croissance racinaire pour atteindre une valeur seuil, caractéristique d'une espèce végétale donnée (Hawes *et al.*, 2003 ; Driouich *et al.*, 2007). Les cellules bordantes sont le plus souvent caractérisées à partir de racines issues de jeunes plantules après germination des graines (chez le pois, 24 à 72h après germination) (Cannesan *et al.*, 2011). Afin d'analyser les cellules bordantes et les exsudats racinaires de la pomme de terre, nous devons donc disposer de jeunes plantules. Comme la culture *in vitro* de la pomme de terre se fait classiquement par multiplication végétative, un système de culture *in vitro* de la pomme de terre à partir de graines et à partir d'explants nous permettra de comparer les deux systèmes racinaires et de caractériser leurs cellules bordantes.

III.1.1. Culture in vitro de pomme de terre

III.1.1.1. Plantules issues de graines ou « semences vraies »

Trouver un fournisseur commercial pour acheter des graines de pomme de terre s'est avéré compliqué. Pour l'anecdote, un vendeur spécialiste de chez Truffaut nous a affirmé (un brin moqueur) que les graines de pomme de terre n'existaient pas.

Notre quête de graines de pomme de terre a finalement abouti grâce à la rencontre de Jacques et Martine Aublé de l'association ASF-Normandie (Association Agro Sans Frontière), par l'intermédiaire de Mr Bernard Jouan président de l'association ASF-Bretagne et du professeur Sidikou de l'Université de Niamey au Niger.





terre de variété Touareg. Observation au microscope électronique

à balayage TM3000 (Hitachi).

Figure III.1 : Graine de pomme de Figure III.2 : Morphologie d'une plantule de pomme de terre de variété Touareg.

14 jours après semis, échelle : 1 cm



Figure III.3 : Culture *in* vitro d'explant de pomme de terre sur milieu gélosé. A) Dépôt des explants (bourgeons découpés) sur un milieu gélosé dans une boite de pétri. B) Après dix jours de culture, un important développement racinaire est observé. Echelle : 1 cm



Figure III.4 : Micropropagation des vitroplants de pomme de terre.

A) Vitroplants âgés d'une quinzaine de jours et présentant 2 à 3 nœuds. B) Vitroplants repiqués en terre au phytotron dans des petits pots individuels puis dans des gros pots au bout d'une trentaine de jours de culture (C).

L'ASF est une association internationale qui lutte contre la faim dans le monde. L'un de leurs objectifs est de faire produire des tubercules de pomme de terre à partir de « semences vraies » dans les pays en voie de développement (<u>http://www.agrosansfrontiere.org/</u>).

Avant la mise en culture des graines mises à disposition par Mr et Mme Aublé, nous avons analysé leur morphologie à l'aide d'un microscope électronique à balayage de type TM3000. Les graines de cette variété sont de couleur marron, de forme ovoïde et mesurent un peu moins de deux millimètre de diamètre (**Figure III.1**).

Après deux semaines de culture dans des armoires phytotron avec une température jour de 25°C et nuit 18°C, de jeunes plantules de pomme de terre présentant des racines de longueur hétérogène (de 1 à 7 cm) sont obtenues (**Figure III.2**). Cette hétérogénéité racinaire constitue un problème pour notre étude. Afin d'avoir une croissance racinaire homogène pour l'étude des cellules bordantes, nous avons procédé à une vernalisation des graines à +4°C pendant 48 heures mais sans succès.

III.1.1.2. Culture in vitro d'explants de pomme de terre

Pour tenter d'obtenir une croissance racinaire homogène, et de réaliser une cinétique d'apparition des BC, il a été nécessaire de mettre en place la culture *in vitro* à partir d'explants, jusqu'alors indisponible au sein du laboratoire Glyco-MEV.

Les tubercules germés certifiés ont été obtenus auprès du Comité Nord Plants de Pommes de Terre, SIPRE. Les bourgeons sont découpés du tubercule puis stérilisés. Les explants ainsi obtenus sont ensuite déposés dans une boite de pétri sur un milieu de culture gélosé (**Figure III.3-A**). Après une dizaine de jours, un important développement racinaire allant de 1,5 à 8 cm de longueur ainsi que des ébauches foliaires sur certains explants peuvent être observés. La croissance racinaire des plantules ne s'est pas avérée homogène (**Figure III.3-B**).

Afin d'assurer une disponibilité constante en matériel biologique, des vitroplants ou plantules *in vitro*, sont préparés à partir des cultures d'apex, dans des tubes à essai contenant un milieu de culture faiblement gélosé. Au bout de 2 à 3 semaines, on obtient un vitroplant de 3 nœuds environ (**Figure III.4-A**). La micropropagation (**Figure III.4**) consiste à transférer et repiquer les vitroplants dans des pots individuels contenant un terreau stérilisé au préalable (**Figure III.4-B**). Au bout de 21 jours de culture, les jeunes plantules sont repiquées à nouveau dans des pots plus grands pour favoriser la croissance de la plante de pomme de terre (**Figure III.4-C**).



Figure III.5 : Détachement des BC de la coiffe racinaire d'une plantule.

A) et B) Observation en lumière transmise de plantule issue de graine. C) plantule issue de culture d'explant. A) et C) 10 secondes après dépôt d'une goutte d'eau sur la coiffe racinaire. B) 30 secondes après dépôt de la goutte d'eau. BC : cellules bordantes ; eBC : elongated Border Cells ; sBC : small Border Cells ; CR : coiffe racinaire. Echelle : 100 μm



Figure III.6 : Différents morphotypes de cellules bordantes.

Coloration au rouge de ruthénium des pectines acides, observation en lumière transmise.

A) et B) Plantule issue de graine. C) plantule issue de culture d'explant. A) et C) Organisation des BC autour de l'apex racinaire. B) Observation des sBC et eBC avec un plus fort grossissement. C) Présence d'un mucilage entourant les cellules coloré par le rouge de ruthénium. CR: coiffe racinaire ; eBC : elongated Border Cells ; sBC : small Border Cells; Echelle: A et C (100 μ m); B (50 μ m)

La micropropagation permet de vérifier la viabilité de nos vitroplants au sol. Les vitroplants issus d'explants ou fournis par le Comité Nord Plants de Pommes de Terre et la SIPRE seront ensuite utilisés pour l'extraction des exsudats racinaires.

De par l'hétérogénéité racinaire de ces deux types de plantules, issues de graines ou d'explants, il n'a pas été possible de réaliser une étude cinétique de la production de cellules bordantes (BC) de pommes de terre. Néanmoins, les BC ont pu être observées et caractérisées.

III.1.2. Etude des BC de plantules issues de graines ou de vitroplants

III.1.2.1. Mise en évidence des cellules bordantes (BC)

La présence de cellules bordantes est révélée par l'ajout d'une goutte d'eau, déposée à l'apex racinaire. Très rapidement au contact de l'eau, des cellules se détachent et se dispersent tout autour de la coiffe racinaire (**Figure III.5**). Les cellules se détachent individuellement de la coiffe racinaire de la pomme de terre, pour les deux types de plantules. Ensemble de cellules bien isolées les unes des autres, elles présentent des caractéristiques des cellules bordantes classiques décrites chez le pois ou le soja (Hawes *et al.*, 2003 ; Cai *et al.*, 2011).

Deux morphotypes peuvent être distingués, pour les plantules issues de graines ou issues de la culture d'explants : des petites cellules rondes au bout de la coiffe racinaire dénommées small border cells (sBC) et des cellules un peu plus allongées sur les parties latérales de la coiffe dénommées elongated border cells (eBC) (Figure III.5-C, Figure III.6). Ces différences sont plus facilement observables après coloration au rouge de ruthénium (Figure III.6). Les polymères acides comme les pectines et donc les parois des BC se trouvent ainsi fortement contrastés. Cette organisation des BC en différents morphotypes a déjà été observée chez le pois (Cannesan et al., 2011).

Une importante couche de mucilage entourant les cellules bordantes des vitroplants est mise en évidence (**Figure III.6-C**). Le rouge de ruthénium étant un marqueur des polymères acides comme la pectine, on peut déduire alors la présence de pectines dans le mucilage sécrété par les cellules bordantes, et la racine des plantules de pomme de terre issues de la culture d'explant.

Une fois la viabilité des cellules bordantes de plantules issues de vitroplants vérifiée, leur paroi a été caractérisée par immunocytochimie.



Figure III.7 : Viabilité des cellules bordantes (BC) issues d'explants

A) Marquage des BC avec de la fluorescéine diacetate (FDA). La présence de fluorescence verte indique la viabilité des cellules. B) Contrôle négatif effectué sur une racine chauffée à 90°C pendant 10 minutes. Encarts : Observation en lumière transmise. Echelle : 20 μm



Figure III.8 : Caractérisation de la paroi cellulaire des cellules bordantes (BC) par approche immunocytochimique.

Immunodétection des composés polysaccharidiques à l'aide d'anticorps dirigés contre des épitopes associés aux A) arabinogalactane-protéines (JIM13), aux B) homogalacturonanes (LM19), aux C) extensines (LM1) et aux D) xyloglucanes (CCRC-M1). Echelle : 50 µm.

III.1.2.2. Viabilité des cellules bordantes (BC)

La fluorescéine diacétate (FDA) est une sonde capable de pénétrer les cellules au travers de leur membrane, et est souvent utilisée comme marqueur de la viabilité (Boyb et al., 2008). Cette viabilité est mise en évidence par une fluorescence due à la dégradation de la molécule par les estérases des cellules vivantes. Une incubation des cellules bordantes avec de la FDA émet une fluorescence après une dizaine de minutes d'incubation témoignant ainsi de leur viabilité (**Figure III.7**).

On remarque que chez la pomme de terre, tous les morphotypes de BC sont viables, contrairement à ce qui a été observé chez le pois où seules les BC de petite taille restent vivantes après détachement de la racine (Cannesan *et al.*, 2011).

III.1.2.3. Analyse des polysaccharides pariétaux des BC

Les polysaccharides à la surface des BC jouent un rôle crucial dans les interactions avec les bactéries pathogènes de la rhizosphère ou avec les bactéries bénéfiques pour la plante (Cannesan *et al.*, 2012 ; Nguema-Ona *et al.*, 2013 ; Plancot *et al.*, 2013 ; Driouich *et al.*, 2013).

Afin de caractériser la composition polysaccharidique de la paroi des cellules bordantes de pomme de terre, des immunomarquages indirects sont réalisés avec des anticorps dirigés contre les épitopes associés aux AGP qui sont reconnus par le JIM 13 (Yates *et al.*, 1996), les homogalacturonanes faiblement méthyl-estérifiés reconnus par le LM19 (Verhertbruggen *et al.*, 2009), les épitopes associés aux extensines reconnus par le LM1 (Smallwood *et al.*, 1995) et enfin les xyloglucanes reconnus pas le CCRC-M1 (Puhlmann *et al.*, 1994). Le marquage des AGP se fait d'une façon homogène à la surface des BC contrairement aux marquages des homogalacturonanes, des extensines et des xyloglucanes qui se fait de façon ponctiforme avec la présence de microdomaines (**Figure III.8**).

Les cellules bordantes de pomme de terre présentent l'ensemble des caractéristiques classiques. Afin de mieux comprendre leur éventuel rôle dans la défense de la plante, ainsi que pour compléter la caractérisation du système racinaire, différents éléments pouvant démontrer leur implication dans la défense ont été étudiés.





Cette cinétique est effectuée sur des plantules issues de graines de pomme de terre. Les plantules sont élicitées avec 2 mg/ml d'un éliciteur issu d'une préparation inactivée de *P*. *atrosepticum*. L'encart représente l'image de la racine observée en lumière blanche. Echelle : $100\mu m$. RC : Root cap ; BC : cellules bordantes.



Figure III.10 : Contrôle négatif de la production des espèces réactives d'oxygènes (ROS) sur des racines élicitées avec de l'eau stérile.

Echelle : $100\mu m$. RC : Root cap ; BC : cellules bordantes.

III.2. Implication du système racinaire dans la défense de la pomme de terre

III.2.1. Production des espèces réactives d'oxygènes (ROS)

Dans un premier temps nous avons envisagé de déterminer si les BC de pomme de terre sont capables de percevoir un éliciteur et d'induire une réponse immunitaire. Pour ce faire, la production des espèces réactives d'oxygènes (ROS) sont choisies comme marqueur. Chez les plantes, les ROS sont produites très rapidement lors d'un stress.

La mise en évidence des ROS est effectuée sur des plantules de pomme de terre issues de graines. Les racines sont élicitées avec une préparation inactivée de *P. atrosepticum* à 2 mg/ml. L'observation de la fluorescence indiquant la production de ROS est permise par l'utilisation d'une sonde fluorescente la CMH₂DCFDA.

Après cinq minutes d'élicitation, une fluorescence de faible intensité apparait à l'extrémité de la coiffe témoignant de la production de ROS. Cette fluorescence va s'intensifier progressivement suite à la production de ROS de la quasi-totalité des BC et de l'apex racinaire au bout d'une trentaine de minute (**Figure III.9**).

Le contrôle négatif de l'expérimentation est effectué sur des plantules traitées avec de l'eau stérile en lieu et place de l'éliciteur. Aucune fluorescence n'est apparue au bout de 5 minutes de traitement. Une faible intensité de fluorescence apparait uniquement sur les apex racinaires après 25 minutes (**Figure III.10**). Cette production peut résulter de la manipulation de la plante ou de l'effet direct du laser du microscope confocal sur la plantule.

Ainsi, ces résultats mettent en évidence que les BC des plantes de pomme de terre sont capables de percevoir un éliciteur et d'y répondre. Toutefois la production de ROS est une réponse générale, ce qui laisse envisager l'utilisation d'un autre marqueur de défense plus spécifique, en l'occurrence l'accumulation de callose (cf. paragraphe III.3), ou encore la présence d'ADN extracellulaire.



Figure III.11 : ADNex dans le mucilage racinaire des plantules de pomme de terre par coloration au Sytox Orange.

Les photos A, B et C représentent différents morphotypes d'ADNex observés dans le mucilage de vitroplants de la pomme de terre.

 $Echelle:50\;\mu m$

III.2.2. Présence d'ADN extracellulaire dans les sécrétions racinaires

L'ADN extracellulaire (ADNex) a été démontré comme étant un élément clé de la formation du Root Extracellular Trap (RET) et participe activement à la défense racinaire (Wen *et al.*, 2009 ; Driouich *et al.*, 2013). A l'heure actuelle, aucune donnée n'est disponible dans la littérature sur la présence d'ADNex chez la pomme de terre.

La recherche de cet ADNex chez la pomme de terre est effectuée sur du mucilage collecté autour de la coiffe racinaire et des cellules bordantes de plantules issues de culture d'explants. Au bout d'une dizaine de minutes d'incubation avec du Sytox Orange, sonde qui marque de façon spécifique les molécules d'ADN, la fluorescence peut être observée (**Figure III.11**). L'observation au microscope confocal à balayage laser des lames sur lesquelles le mucilage est ensuite étalé met en évidence des structures filamenteuses fluorescentes (excitation du Sytox Orange par le laser à 543 nm). De par leur aspect et leur forme, ces structures sont semblables à celles publiées par Wen et al. (2009) et défini comme étant de l'ADN extracellulaire.

Le mucilage racinaire des plantules de pomme de terre pourrait ainsi avoir un rôle de piège extracellulaire (RET) vis-à-vis des pathogènes telluriques. En effet, les exsudats racinaires jouent un rôle capital dans la régulation de la communauté de microorganismes autour de la racine dans la rhizosphère (Dundek *et al.*, 2011 ; Carvalhais *et al.*, 2015). Par ailleurs, la coloration au rouge de ruthénium révèle une importante couche de mucilage entourant les BC et l'apex racinaire de la plante de pomme de terre. Ce mucilage pourrait être composé, comme dans le cas des autres plantes étudiées jusqu'alors, des exsudats racinaires provenant principalement des BC et de la coiffe racinaire (Driouich et al., 2013).

Egalement, en 2006, Yao *et al.* ont montré que les exsudats racinaires participent à la virulence des bactéries pathogènes en favorisant leur attraction par chimiotactisme dans le cas du pathosystème *R. solanacearum - Lycopersicon Solanum*.

Afin de déterminer l'implication des exsudats racinaires de la pomme de terre dans les interactions avec les pathogènes, un test de chimiotactisme utilisant *P. atrosepticum* comme pathogène modèle a été mis en place.



Figure III.12 : Dispositif expérimental pour la mise en évidence du chimiotactisme des exsudats racinaires de pomme de terre sur *P. atrosepticum*.

Les puits C1 et C2 permettent le dépôt des composés à tester et le puits B, le dépôt des bactéries une heure après le dépôt des composés C1 et C2.



Figure III.13 : Mise en évidence du chimiotactisme des exsudats racinaires de pomme de terre sur *P. atrosepticum*.

A) Un développement bactérien observé dans le puits (E) correspondant au puits contenant les exsudats racinaires de pomme de terre après une incubation de trois jours à 25°C. Aucun développement bactérien n'est observé dans le puits (T) contenant de la tétracycline. B) Contrôle négatif de l'expérimentation sur lequel aucun développement bactérien n'est observé dans les puits avec dépôt d'eau stérile. Les bactéries restent dans leur puits initial de dépôt.

III.2.3. Chimiotactisme des exsudats racinaires de pomme de terre vis-àvis de *P. atrosepticum*

Le dispositif expérimental utilisé est représenté sur la **Figure III.12**. Trois puits équidistants sont découpés directement dans le milieu gélosé d'une boite de pétri. Les composés à tester sont ensuite déposés dans les deux puits de chaque extrémité opposée (C1 et C2). Après environ 1h à 25°C, les composés auront diffusé dans la gélose autour du puits. Une suspension bactérienne est ensuite déposée dans le puits central (B). Après incubation pendant 72 heures à 25°C, les boites sont observées. Un chimiotactisme positif se traduira par le mouvement des bactéries du côté des produits C1 ou C2. Quant au chimiotactisme négatif, il se traduit par le stationnement des bactéries dans le puits de dépôt (B).

Ce dispositif est utilisé comme suit : en C1, dépôt de tétracycline (T) ou d'eau stérile (Contrôle), en C2 dépôt des exsudats racinaires de vitroplants (**Figure III.13**). Après dépôt des bactéries dans le puits B et 3 jours d'incubation, un important développement bactérien dans le puits E (Exsudat) est observé. Par contre aucun développement bactérien n'est observé dans le puits T (Tétracycline) (**Figure III.13-A**). Le développement des bactéries dans le compartiment (E) témoigne ainsi d'un chimiotactisme positif de *P. atrosepticum* contenue dans le puits (B) vers le puits (E). Un contrôle négatif est effectué en déposant de l'eau stérile dans les deux puits autour du puits de dépôt de bactéries. Dans ces conditions, aucun mouvement chimiotactique n'est observé et les bactéries restent immobiles dans le puits de dépôt (**Figure III.13-B**).

L'obtention de ces résultats nous a conduit à analyser la composition en monosaccharides des exsudats racinaires de pomme de terre afin de pouvoir déterminer le composé responsable de cet effet chimiotactique. Nous avons également cherché à déterminer l'effet de ces exsudats sur le développement de la phytobactérie *P. atrosepticum*. L'ensemble de ces résultats est présenté sous forme d'article scientifique dans la partie suivante.
III.3. Caractérisation du mucilage de la racine de pomme de terre et effet sur la croissance de *Pectobacterium atrosepticum*

La pomme de terre (*Solanum tuberosum*) est la première culture non céréalière produite dans le monde et quatrième derrière la culture du maïs, du blé et du riz avec une production mondiale annuelle de 374 millions de tonnes. Néanmoins, la pomme de terre est une plante sensible, surtout au pathogènes telluriques qui sont responsables chaque année d'importantes pertes économique (Axel *et al.*, 2012). Parmi les pathogènes telluriques, acteurs majeurs de la limitation de la production agricole chez la pomme de terre, on peut citer la bactérie *Ralstonia solanacearum*, responsable de la pourriture brune (Genin *et al.*, 2010), *Pectobacterium atrosepticum* responsable de la maladie de la jambe noire (Latour *et al.*, 2008) ou *Phytophtora infestans*, responsable du mildiou (Hélias *et al.*, 2008). A ce jour, il n'existe aucun traitement efficace contre ces pathogènes, en dehors des mesures prophylactiques.

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence les cellules bordantes de racine de pomme de terre, ce qui n'avait jamais été montré jusqu'alors. La caractérisation de ces cellules a été réalisée, notamment l'analyse polysaccharidique de leur paroi, leur viabilité, et leur capacité à percevoir un pathogène ou un éliciteur. Ainsi, la perception par les cellules bordantes d'un éliciteur bactérien dérivant de la bactérie *P. atrosepticum*, déclenche une réponse immunitaire au niveau des racines.

Les cellules bordantes et la racine constituent les principaux éléments producteurs de mucilage (Moody *et al.*, 1988; Vicré *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2010). La caractérisation des exsudats racinaires de la plante de pomme de terre et l'analyse de leur effet sur la croissance de la bactérie *P. atrosepticum* ont été réalisés. La croissance de *P. atrosepticum* s'avère stimulée dans un milieu enrichi avec des exsudats racinaires de pomme de terre.

L'ensemble de ces résultats sont développés ci-dessous dans l'article soumis au Journal of Experimental Botany. Les commentaires des reviewers ainsi que l'expérience supplémentaire réalisée avant la correction de l'article sont jointes.

III.3.1. Article 1, soumis à Journal of Experimental Botany

Root mucilage of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*

Abdoul Salam Koroney, Carole Plasson1, Ramatou Sidikou, Laurence Menu-Bouaouiche, Azeddine Driouich and Maïté Vicré-Gibouin

Running title: Galactose-containing root mucilage of potato affects the growth of *P. atrosepticum.*

- 1 Root mucilage of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose and impacts the
- 2 growth of *Pectobacterium atrosepticum*.
- 3
- Abdoul Salam Koroney¹, Carole Plasson¹, Ramatou Sidikou², Laurence Menu
 Bouaouiche¹, Azeddine Driouich¹ and Maïté Vicré-Gibouin¹
- 6
- 7

¹ Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (EA 4358), Grand
Réseau de Recherche VASI « Végétal-Agronomie-Sols et Innovations » et PlateForme d'Imagerie Cellulaire (PRIMACEN) de Haute-Normandie. Normandie
Université, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cedex, France.

² Faculté des Sciences, Université A.M. de Niamey, B.P. 12022 Niamey, Niger

14

- 15 **Date of submission: 05.02.2015**
- 16 Number of figures: 7 (3 Figures in color online-only)
- 17 Number of tables: 2
- 18 Supplementary Data: 3 Figures
- 19 Total word count: 8266
- 20

21	Run	ning	title:
----	-----	------	--------

22 Galactose-containing root mucilage of potato affects the growth of *P*. 23 *atrosepticum*.

24

25

- 26
- 27

28 Abstract

Potato (Solanum tuberosum) is an important food crop grown worldwide. It is 29 however significantly sensitive to various soil-borne pathogens that affect roots and 30 tubers causing considerable economic losses. So far, most of the research on potato is 31 dedicated to tubers and, hence, little attention has been paid to root structure and 32 33 function. In the present study, we have investigated the morphology of root tip, the composition of the secreted mucilage and its effect on bacterial growth using 34 biochemical and microscopical techniques. Our major findings are i) root mucilage is 35 highly enriched in galactose-containing molecules including arabinogalactan-36 proteins as major components, ii) treatment of the root with an elicitor derived from 37 Pectobacterium atrosepticum, a soil-borne pathogen, alters the composition of the 38 mucilage and arabinogalactan proteins and iii) the growth of the bacterium in vitro is 39 differently affected by exudates from elicited and non-elicited roots (i.e., inhibition 40 versus stimulation). In addition, treatment of the exudates with β -D-glucosyl yariv 41 suggests that arabinogalactan proteins might be involved in controlling bacterial 42 43 growth. Taken together these findings indicate that galactose-containing polymers of potato root mucilage play a central role in the root-microbe interactions. 44

45

Key words: Arabinogalactan proteins, border cells, galactose-containing polymers,
mucilage, *Pectobacterium atrosepticum*, root exudates, *Solanum tuberosum*.

- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55

56 Introduction

Potato (Solanum tuberosum) belongs to the Solanaceae family that comprises more 57 than two thousands species including economically important crops such as tomato 58 (Solanum lycopersicon) and tobacco (Nicotiana tabaccum). Potato is cultivated for 59 its tubers and represents the third main food crop in the world after rice (Oryza 60 61 sativa) and wheat (Triticum aestivum) in terms of both cultivated surfaces and total crop production (Douches et al., 1996). The worldwide crop production exceeds 320 62 million tons representing human consumption for more than a billion people across 63 South America, Europe, Africa and Asia (Haverkort, 1990). Potato is considered as a 64 promising crop to combat starvation worldwide and its cultivation is highly promoted 65 by the United Nations (Diallo et al., 2011). Unfortunately, potato is subjected to 66 many devastating diseases caused by soil-borne pathogens responsible for 67 considerable economic losses. For instance, the Pectobacterium species that is 68 widely known under the name of Erwinia carotovora, constitutes a major threat for 69 potato plants. Pectobacterium atrosepticum (formerly E. carotovora subsp. 70 71 atroseptica) is a pathogen causing the soft rot disease in both field conditions and during tuber conservation (Latour et al., 2008; Yaganza et al., 2014). P. atrosepticum 72 is responsible for primary infections facilitating subsequent attacks by other 73 pathogens such as Dickeya genera leading to the blackleg disease and tuber soft rot 74 (Pérombelon and Kelman, 1980; Priou and Jouan, 1996; Pérombelon, 2002). There is 75 currently no effective method available to control the disease caused by P. 76 atrosepticum. No chemical agents are efficient against these pathogens and cultural 77 practices and storage conditions are insufficient to avoid the spreading of the disease 78 (Priou and Jouan, 1996; Yaganza et al., 2014). 79

80 Previous research has shown that potato rhizosphere is enriched in plant growth promoting rhizobacteria and mycorrhizal fungi that have a very good potential to be 81 used as biocontrol agents (Diallo et al., 2011). However, although a large number of 82 studies have focused on tuber tissue infection, the role of root cells in the interaction 83 with microbes remains unexplored so far (Horn et al., 2014). In order to develop new 84 strategies for potato protection against root diseases it is necessary to gain a better 85 knowledge on the mechanisms controlling potato root interaction with 86 87 microorganisms and the response of root cells to pathogen attacks.

The root system plays an important role in shaping soil-borne microbes communities 88 by secreting a wide range of compounds that stimulate and/or inhibit microorganism 89 proliferation thereby contributing to maintain the whole plant health (Wu and Van 90 Etten, 2004; Berendsen et al., 2012). It is now recognized that mechanisms involved 91 in plant defense responses are organ-specific (Balmer et al., 2013). Although less 92 well studied, a higher defensive state seems to occur in roots as compared to 93 aboveground organs of the plants (Attard et al., 2010; Millet et al., 2010; Balmer et 94 al., 2013). In addition the root immune response seems to vary between different root 95 tissues (Millet et al., 2010; Cannesan et al., 2011, 2012). Several studies have shown 96 that root caps display enhanced local resistance to pathogen attacks as compared to 97 98 the elongation zone that is often described as the primary site of infection (Gunawardena and Hawes, 2002; Gunawardena et al., 2005; Cannesan et al., 2011). 99 100 The root tip protection against abiotic and biotic stress has been shown to be due to the activity of border cells in many species including pea (Pisum sativum) soy bean 101 102 (Glycine max) or rice (Oryza sativa) (Gunawardena and Hawes, 2002; Cannesan et al., 2011; Cai et al., 2013). Root border cells are known to originate from the root 103 104 cap meristem and to detach individually and be released within the external environment (Hawes et al., 2003, 2012). All plant species produce populations of 105 border cells that vary in number, shape, size and activity (Hawes et al, 2003; 106 Driouich et al., 2007, Driouich et al., 2012; Endo et al., 2011; Plancot et al., 2013). 107 Border cells synthesize and secrete a large variety of substances, among which many 108 defense-related molecules that contribute to root protection (Wen et al., 2007, 2009; 109 Cannesan et al., 2011; Plancot et al., 2013; Driouich et al., 2013). These molecules 110 also contribute to the composition of the mucilage that often encloses border cells 111 and influences microbial dynamic and activity within the rhizosphere. 112

The root exudation varies between species and depends on plant development and 113 external factors. The root exudates composition comprise low molecular weight 114 115 compounds such as amino acids, organic acids, phenolics and high molecular weight compounds including mucilage and proteins (Walker et al., 2003; Liu et al., 2014). 116 The mucilaginous material is enriched in carbohydrates with the presence of 117 galactose, glucose, arabinose, fucose and xylose residues. Small amounts of 118 119 galacturonic acids and glucuronic acids are also present in some species such as pea or wheat (Knee et al., 2001). Based on the glycosidic linkage patterns established 120 121 from mucilage of different plants, it appears that polysaccharides are highly diverse

and often unique within a plant species. Moreover the nature of the polysaccharides and other glycan-containing molecules of root mucilage play a major role in mediating root-microbes interactions (Hinch and Clarke, 1980; Irving and Grant, 1984; Ray et al., 1988; Cannesan et al., 2012, Nguema-Ona et al., 2013). Although the presence of hydroxyproline has been reported to be minor component in maize and cress mucilage (Ray et al., 1988), glycoproteins such as arabinogalactan proteins (AGP) that belong to hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGP) have been found to occur in root secretions of many plant species such pea, Arabidopsis or Brassica napus (Knee et al., 2001; Durand et al., 2009; Cannesan et al., 2012).

In this paper, we present the first study that characterizes border cells and exudates from root tips of S. tuberosum using a combination of microscopical and biochemical techniques. Our data demonstrate that root mucilage contains unusual high amounts of galactose residues suggesting that galactan containing-polymers such as AGP are major components. In addition, we show that the composition of AGP is altered in response to elicitors derived from the pathogenic bacterium *P. atrosepticum*. Finally, root exudates from elicited-plants and AGP are shown to interfere with the growth and proliferation of the bacterium.

150 Materials and methods

151

152 Plant material

Tubers and vitroplants of potato (*S. tuberosum* cv. Desiree) were kindly provided by
the Comité Nord Plants de Pommes de Terre, SIPRE, Achicourt, France.

Potato germs on potato tubers were cut and surface sterilized in 70% ethanol and in 155 sodium hypochlorite diluted 1/3 (v/v). They were then sown onto Murashige and 156 Skoog medium containing 3.5% (w/v) Bacto Agar supplemented with 3% (w/v) 157 sucrose (Durand et al., 2009). Plants were grown in culture chamber under 158 continuous light (120 mE m⁻² s⁻¹ 21°C) for 18 hours at 24°C and 6 hours for 18°C. To 159 avoid the roots penetrating the agar and the subsequent loss of border cells, plants 160 were grown in vertically oriented petri dishes. Microscopical observations of root 161 tips were made on ten day-old seedlings. Root exudates were collected by growing 162 163 potato vitroplant in 5 ml of culture media without Bacto Agar in test tubes. After three days, vitroplants were washed (three times) in deionized water and transferred 164 into 5 ml of sterile water for three days to collect root exudates (adapted from 165 Chaparro et al., 2013). Exudates were centrifuged (2500g for 5 min) to remove cell 166 debris and border cells before use. 167

168

169 Histochemical staining and light microscopy

170 Roots were mounted on microscope slides in a drop of water for observations using bright-field microscopy. Ruthenium red dye (Sigma) was used at 0.05% (w/v) in 171 172 deionized water for 15 min. Roots were carefully washed in deionized water and observed using a bright-field microscope (Durand et al., 2009). For viability test, 173 174 staining with 5 mM calcein-AM (Sigma) was performed as described in Vicré et al. (2005). Briefly, roots and root border cells were stained for 1 hour, carefully washed 175 176 in deionized water and observed using a microscope equipped with UV fluorescence (excitation filter, 490 nm; emission filter, 520 nm). Images were acquired with a 177 178 Leica DCF 300FX camera.

179 Staining of callose was performed using aniline blue (Sigma-Aldrich) at a 180 concentration of 1 mg.ml⁻¹ as described in Plancot *et al.*, (2013).

181

182 Immunofluorescence localization of cell wall polysaccharides epitopes

The monoclonal antibodies specific for cell wall polysaccharides used in this study 183 are JIM13 (Yates et al., 1996), LM1 (Smallwood et al., 1995) and LM2 (Smallwood 184 et al., 1996). Roots from 10-d-old germs were fixed for 60 min in 1% 185 glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde in 50 mM PIPES, and 1 mM CaCl2, pH 7, and 186 187 immunolabeled according to Willats et al. (2001). Roots were washed in phosphatebuffered saline (PBS) containing 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and then 188 189 incubated overnight in JIM13 (1:50), LM1 (1:50) and LM2 (1:50), diluted in PBS-1% BSA containing 1:30 normal goat serum, as described previously by Vicré et al. 190 191 (2005). Roots were carefully washed and incubated with anti-rat IgG (dilution, 1:5000) coupled to fluorescein isothiocyanate (Sigma). After washing in PBS-1% 192 BSA, roots were mounted in antifading agent (Citifluor; Agar Scientific) and 193 examined using laser confocal microscope. Control experiments, in which the 194 primary antiserum was omitted, were performed as described in Plancot et al. (2013). 195

196

197 Analysis of monosaccharide composition of root exudates

The sugar composition of root exudates was determined by gas chromatography of 198 trimethylsilyl methylglycoside derivatives according to York et al. (1985) and using 199 inositol as an internal standard. Briefly, samples were hydrolyzed in 2M 200 trifluoroacetic acid for 2 h at 110°C and then heated in dry 1M HCl in methanol at 201 80°C for 24 h for methanolysis. After evaporation of the methanol, the methyl 202 glycosides were then converted into their trimethylsilyl derivatives by heating the 203 samples for 30 min at 80°C in hexamethyl disilizane: trimethyl chlorosilane: pyridine 204 (3:1:9). After evaporation of the reagent, the samples were suspended in cyclohexane 205 before being injected on a DB-1 column (Supelco) as described previously by 206 Nguema-Ona et al. (2006). Temperature program optimized for separation of the 207 most common cell wall monosaccharides (Ara, Fuc, Gal, GalA, Glc, GlcA, Man, 208 209 Rha, Xyl) was used. Chromatographic data were integrated with GC Star 210 Workstation software (Varian), each surface being corrected according to its211 response factor.

212

213 Methylation linkage analysis of S. tuberosum root exudates

S. tuberosum root exudates were methylated by the NaOH method of Ciucanu and 214 Kerek (1984) (see also Nguema-Ona et al, 2012). Freeze-dried fractions (1-2 mg) 215 were solubilized in 500 µl of DMSO, stirred overnight and sonicated prior to the start 216 of methylation. Two to three NaOH pellets were ground and two tiny spatulas were 217 added to a borosilicated glass test tube, and the contents vigorously mixed. Two 25 218 µl portions of methyl iodide were added 20 min apart; followed after 20 min by a 219 third addition of 50 µl and the mixture was stirred for 2 hours. The reaction mixture 220 was quenched with 1 ml 100 mg.ml⁻¹ freshly prepared sodium thiosulfate. One ml of 221 dichloromethane was immediately added to the test tube and vigorously mixed to 222 form an emulsion. After a brief centrifugation (30 s at 5000rpm), the upper aqueous 223 phase was removed and the lower phase washed three times with water before drying 224 225 under a stream of nitrogen. This first methylation step was repeated once. The methylated polysaccharides obtained were hydrolyzed at 110°C for 90 min in 0.5 ml 226 of 2M trifluoroacetic acid and the hydrolyzed samples were dried under airflow, re-227 suspended in 100 µl of propan-2-ol before re-drying. The partially methylated 228 monosaccharides were dissolved in 100 µl of 1M NH₄OH and 500 µl of 20 mg.ml⁻¹ 229 NaBD₄ in DMSO were added to the mixture. This reduction reaction was performed 230 overnight at room temperature. Excess reductant was destroyed with 100 µl of 231 glacial acetic acid. 100 µl of 1-methyl imidazole and 0.5 ml of acetic anhydride were 232 233 successively added to the mixture. Acetylation of the partially methylated alditols was performed at room temperature for 15 min. Unreacted anhydride was destroyed 234 with 1.5 ml of H₂O, and the partially methylated alditol acetate (PMAA) derivatives 235 were partitioned into 1 ml of dichloromethane, washed five times with water, and 236 dried. Finally, the partially methylated alditol acetates derivatives were dissolved in 237 200 µl dichloromethane. Derivatives were then injected in a GC-EI mass 238 spectrometer composed of a Hewlett-Packard 6890 series gas chromatograph 239 coupled with an Autospec mass spectrometer of EBE geometry (Micromass, 240 Manchester, UK) equipped with an Opus 3.1 data system. Chromatographic 241

separations were obtained using a Zebron Z5-MSi (30 m, 0.25 mm id, 0.25 mm film 242 thickness, Phenomenex) capillary column. Helium was the carrier gas and the flow-243 rate was 0.8 ml.min⁻¹. The temperature programming started at 100°C for 1 min, 244 ramped to 160°C at 10°C min⁻¹, then to 220°C at 2°C min⁻¹ and finally to 270°C at 245 15°C min⁻¹ (maintained at 270°C for 1 min). The temperature of the injector, the 246 interface and the lines was 250°C. Injections of 0.5 µl of samples were performed in 247 split less mode. Identification of the PMAA derivatives and deduction of their 248 glycosidic linkages was achieved using a combination of reference data available 249 250 publicly at (http://www.ccrc.uga.edu/specdb/ms/pmaa/pframe.html), and from published PMAA spectra (Carpita and Shea, 1989). 251

252

253 Immunoblots and electrophoresis

254 Root exudates from 15 plants were collected. For SDS-PAGE analysis, total proteins were separated on 8% polyacrylamide minigels (Bio-Rad) and blotted as described 255 previously (Willats and Knox, 1996). For blot detection of arabinogalactan proteins 256 and extensin epitopes, 15 µg of root exudates proteins were blotted on nitrocellulose 257 membranes (Whatman; protran BA 83 nitrocellulose, 0.2 mm) and were blocked in 258 Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) containing 1% 259 Tween 20 (TBST). Exudates were incubated with primary antibody (1:25) in TBST 260 for 2 h. After four washes with TBS (8 minutes per wash), blots were incubated for 2 261 h with anti-rat IgG peroxidase conjugate (Sigma) diluted 1:5000 in TBST containing. 262 After four washes with TBST followed by one wash with TBS, enzyme activity was 263 visualized with 30% hydrogen peroxide (diluted in TBS) and methanol 4-264 265 chloronaphthol horseradish peroxidase color reagent.

266 Dot blot analysis of root exudates were performed with PR 648 Slot Blot Manifold 48-well of GE HEALTHCARE. 100 µl of root exudates are blotted on nitrocellulose 267 268 membranes (Whatman; protan BA 83 nitrocellulose, 0.2 mm). After blocking in Trisbuffered saline (TBS; 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) containing 1% Tween 20 269 270 (TBST), the rest of the experiment is done as described previously. The primary antibodies used are JIM13, JIM7, LM2, LM1, LM6, LM5 and INRA-RU1. All the 271 272 antibodies were obtained from Plant Probes except the INRA-RU1 kindly provided by F. Guillon (INRA, UR1268, France). 273

For the radial diffusion assay, 1% (w/v) agarose gel containing 0.15M NaCl, 0.02% (w/v) NaNO₃, and 10 μ g.ml⁻¹of β -GlcY reagent was prepared according to van Holst and Clarke (1986). The wells were filled with root exudates and incubated overnight at room temperature. Gum arabic from acacia (Fisher Scientific) was used as a standard. Determination of AGP quantity was performed as described by van Holst and Clarke, (1986).

280

281 In vitro infection of S. tuberosum root with P. atrosepticum

P. atrosepticum was cultured in a minimum PGA media (16.266 g of K₂HPO₄, 0.899 282 g KH₂PO₄, 1.2 g of (NH₄)₂SO₄ and 4g of Polygalacturonic acid (PGA, P0853, 283 Sigma) for one liter of medium as previously described by Smadja et al. (2004a, b). . 284 After being autoclaved (20 minutes at 120 °C), the media was completed with 0.818 285 $g.l^{-1}$ MgSO₄-6H2O and 0.075 $g.l^{-1}$ of CaCl2. Infection assay was performed by 286 deposition of 50 μ l of a bacterial solution (15.10⁷ CFU.ml⁻¹) onto root apex of S. 287 tuberosum. After 5 days of infection, bacteria viability was assayed by adding one 288 drop of the LIVE/DEAD Baclight Bacterial Viability kit (Molecular Probes) at the 289 location of the infection following the instruction provided by the manufacturer. 290 Observations were then made with a confocal laser microscope at PRIMACEN 291 imaging platform. Control experiments were carried out by using sterile water 292 instead of bacterial suspension. 293

294

295 *Treatment with exudates and determination of bacterial colonies*

Root exudates were collected from 25 plants and were diluted (1:5) in PGA medium 296 supplemented with 15% Bactoagar for a final volume of 20 ml per petri dish. 297 Bacterial suspension of *P. atrosepticum* was concentrated by centrifugation (3500x 298 g, 10 min) and the concentration adjusted to 30.10⁷ CFU.ml⁻¹. 100 µl of the 299 suspension was deposited in a medium-containing petri dish preincubated with either 300 water (control) or root exudates collected either from elicited or non-elicited roots. 301 Petri dishes were subsequently incubated for 72 hours at 25°C, and finally, bacterial 302 colonies were counted and their number determined. For AGP binding experiments, 303 root exudates were pre-incubated overnight with 5 μ g.ml⁻¹ β -D-glucosyl Yariv 304

reagent before use. All experiments were performed in triplicate and independently replicated three times. The elicitor preparation derived from *P. atrosepticum* was kindly given by Dr. F. Val (INRA Rennes, France) and used at concentrations of 1 to 3 mg.ml^{-1} (F. Val, personal communication).

309

310 Statistical analyses

Statistical significance was calculated by using two-way ANOVA and the Tukey test. Differences at P < 0.05 were considered to be significant.

313

314

315 **Results**

316 *Characteristics of root border cells from S. tuberosum*

317 So far, the root architecture of S. tuberosum has never been investigated. Here, the morphology and detachment pattern of root border cells were examined in 10 day-318 319 old seedlings of S. tuberosum. Staining of root tips with ruthenium red, a dye used 320 for visualizing acidic polymers revealed the presence of thick mucilage surrounding root tip and in which border cells are embedded (Fig. 1A). Two subpopulations of 321 morphologically distinct border cells were released from the root tip. Small/rounded 322 border cells that are frequently located at close vicinity of the root cap and elongated 323 cells present located along the elongation zone. These cells were termed "small 324 Border Cells" (sBC) and "elongated border cells" (eBC) respectively (Fig. 1B and 325 C). Interestingly, large granular structures were clearly seen within the cytoplasm of 326 both cell subpopulations (Fig. 1C). These structures were shown to contain starch as 327 revealed by lugol staining and are most likely to be starch granules (Supplementary 328 329 Fig. S1). These granules, in such a large number and size, have never been seen in 330 border cells of any other species studied so far including pea, wheat, flax or A. thaliana. Finally, staining with the vital dye calcein acetoxymethyl ester (calcein-331 332 AM) demonstrated that both populations of border cells remain viable after their detachment and separation from the root tip (Fig. 1D). 333

334

335 *Characterization of root mucilage from S. tuberosum.*

336 As shown in Fig. 1A, an important halo of mucilage was found surrounding the root tip and border cells. The mucilage was collected and the monosaccharide 337 composition analyzed using gaz chromatography. As shown in Fig. 2, galactose was 338 the most abundant sugar residue found in the mucilage accounting for 68.7 ± 0.2 %. 339 This suggests that galactan or arabinogalactan proteins are major components of root 340 exudates from S. tuberosum. Glucuronic acid (GlcA) represented 22.5 \pm 0.1 % of the 341 total sugar whereas only very small amounts of galacturonic acid (GalA) and neutral 342 sugars, arabinose (Ara) rhamnose (Rha), xylose (Xyl), mannose (Man) were 343 detected. In contrast, fucose (Fuc) could not be detected. Although less abundant, 344 monosaccharides such as rhamnose (Rha), galactose (Gal) and GalA suggest the 345

presence of pectins in root exudates. Therefore, to gain additional information on the 346 occurrence of pectins in the exudates immunodot-binding assay was performed with 347 the mAbs LM19 and JIM7 both specific for homogalacturonan (HG) epitopes, and 348 the mAb INRA-Ru1 and LM5 specific for epitopes associated with 349 rhamnogalacturonan I (RG-I). All epitopes carried by HG and RG-I were detected in 350 the mucilage consistent with the monosaccharides composition and confirming the 351 presence of pectins (Table 1). Therefore, RG-I containing β -1,4 galactan side chains 352 and HG seem to be present in the mucilage secreted by root tip and border cells of 353 354 potato.

To check for the presence of AGP, immunodot-assay using the mAbs LM2 and 355 JIM13 specific for AGP epitopes were also performed on the same root exudates. 356 The data revealed that both epitopes were quite strongly detected suggesting that 357 AGP are abundantly present in the secreted mucilage. Furthermore, we performed 358 359 linkage analysis using methanolysis to characterize the linkage nature of Gal residues found in the mucilage. The results show that β -1,3 Gal-, β -1,6 Gal- and β -3,6 Gal-360 361 residues are predominant supporting the presence of AGP as major components of the mucilage (Table 2). Finally, along with AGP, extensin-associated epitopes, 362 recognized by the mAb LM1, were also detected in the exudates. 363

At a tissue level, immunofluorescence performed on root tips showed that AGP 364 365 epitopes recognized by LM2 and JIM13 mAbs were abundant at the cell surface of root border cells as well as in the secreted mucilage (Fig. 3A and B). Control 366 367 experiments performed by omitting the primary antibodies LM2 and JIM13 did not show any fluorescent staining (data not shown). We also investigated the occurrence 368 369 of extensin, another class of hydroxyprolin-rich glycoproteins like AGP. LM1-370 recognized epitopes were found to occur at the cell surface of root border cells as well as in the mucilage (Fig. 3C, Table 1). 371

372

373 *Effect of bacterial elicitation on the monosaccharide composition of the mucilage*

We investigated the composition of the mucilage when root tips were treated with an elicitor fraction prepared from the soil-borne pathogen *P. atrosepticum* (Kroner *et al.* 2011). To ascertain that the bacterial-derived elicitor induces a defense response in

root, we first examined deposition of callose, a marker of defense, using aniline blue 377 staining and microscopy. The data show that patterns of callose deposition are 378 observed in root tip and border cells upon elicitation with the elicitor even at a 379 concentration of 1 mg.ml⁻¹ (supplementary Fig. S2). We then investigated the 380 monosaccharide composition of mucilage after elicitation (3 day-treatment) of root 381 using three concentrations of elicitors (1, 2 and 3 mg.ml⁻¹). A significant increase of 382 Man residues was revealed in elicited samples as compared to non-elicited controls 383 (Fig. 2). However, control analysis showed that P. atrosepticum elicitor preparation 384 385 contained significant amount of Man (data not shown) indicating that Man was not part of the plant response. A significant increase in Ara and Rha residues also 386 387 occurred in response to elicitor treatment. Both monosaccharides were absent from the *P. atrosepticum* preparation (data not shown) suggesting that their increase is part 388 389 of the root tip response to elicitors. In contrast to Ara and Rha, a decrease in Gal and GlcA residues was observed in the presence of the elicitor as compared to controls 390 391 (Fig. 2). As a consequence, exudates from elicited plant exhibited a much higher Ara/Gal ratio (from 1:10 to 1:8 depending on the concentration of elicitors) than that 392 393 found in the exudates of non-elicited roots (1:50). Such a change in sugar content 394 could be related to modifications in AGP composition. Therefore, the quantity of AGP in root exudates was estimated by radial gel diffusion and β -D-glucosyl Yariv 395 staining (Fig. 4). Red spots are indicative of the presence of AGP, the quantity being 396 correlated to the diameter of the halo. β-D-glucosyl Yariv staining revealed the 397 presence of AGP in root exudates from control and elicited samples. It also revealed 398 an increase in AGP content after elicitor treatment, especially at a concentration of 2 399 $mg.ml^{-1}$. As a consequence only the two concentrations of elicitors (1 and 2 $mg.ml^{-1}$) 400 were kept for further characterization of AGP. 401

To analyze further the impact of elicitation on AGP composition, exudates were 402 403 separated by SDS-PAGE, blotted and probed with the anti-AGP mAbs, JIM13, JIM15 and LM2. The data revealed that JIM13 bound to a smear of material of 404 405 molecular weight comprised between 34-130 kDa in control as well as in elicited samples (Fig. 5A). In the case of LM2, a band of ~34 kDa, not seen in control 406 samples strongly reacted with the antibody in elicited samples (Fig. 5B), . The 407 intensity of the signal was more pronounced at a concentration of 1 mg.ml⁻¹ of 408 elicitor than at 2 mg.ml⁻¹. Anti-JIM15 showed a weak signal in non-elicited plants 409

revealing two bands faintly stained at 28 and 34 kDa (Fig. 5C). In elicited samples, the JIM15 antibody reacted very strongly with two bands at 25 and 40 kDa, not detected in control samples, for respectively 1 and 2 mg.ml⁻¹ of elicitor concentration. This further supports that AGP composition/structure is modified in exudates from elicited roots.

415 However one should not rule out the possibility that differences in monosaccharide composition observed in elicited samples, could also arise from modifications in 416 extensin composition (Fig. 5D). Western blotting using the anti-extensin mAb JIM11 417 did not reveal any significant difference between samples from non-elicited and 418 elicited roots and detected the presence of a smear ranging between 28 and 130 kDa 419 (data not shown). In contrast, a major band ranging between 20 and 34 kDa strongly 420 reacted with the mAb LM1 in exudates from plants treated with the elicitor at 1 421 mg.ml⁻¹ as compared to other conditions (Fig. 5D). The smear was very weakly 422 detected in 2 mg.ml⁻¹ elicited samples. 423

424

425 *Effect of root exudates on the growth of P. atrosepticum*

While *P. atrosepticum* is known to infect potato tubers causing tuber blight diseases, 426 the root colonization and infection remain poorly studied. Here, we assessed the 427 effect of root exudates on *P. atrosepticum* growth in vitro. First, we checked whether 428 the bacteria bind to roots when these were inoculated with a solution of P. 429 atrosepticum at a concentration of 15.10⁷ CFU.ml⁻¹. As shown in Fig. 6, the bacteria 430 were clearly seen over the surface of the root tip, border cells and exudates (Fig. 6). 431 432 We then monitored bacterial growth over 3 days by measuring the number of colonies (colony forming unit CFU) formed in the presence of a standard growth 433 434 medium or a medium supplemented with root exudates (Fig. 7). Compared to bacteria cultured in the standard medium, the number of P. atrosepticum colonies 435 436 formed in the presence of the exudates-containing medium increased significantly. To check whether AGP present in root exudates could affect bacterial growth, 437 exudates were incubated overnight with 5 μ g.ml⁻¹ β -D-glucosyl Yariv reagent prior 438 to bacteria plating. The β -D-glucosyl Yariv is a reagent that binds and precipitates 439 440 AGP thus interfering with their function (Yariv et al., 1967; Sardar et al., 2006; Kitazawa et al., 2013; Marzec et al., 2014). Interestingly, when exudates were 441

incubated with β -D-glucosyl Yariv reagent, the number of colonies formed decreased to the same level as that reached with a standard medium without exudates. This suggests that β -D-glucosyl Yariv –bound AGP are somehow involved in the stimulation of bacterial growth observed in the presence of root exudates. AGP or their carbohydrates could function either as signaling molecules promoting growth or as a sugar-containing nutrient source used by the bacteria to proliferate.

Finally, we tested the effect of different media supplemented with exudates collected from elicitor-treated plants on bacterial growth. Under these conditions growth rates of bacteria were significantly reduced when compared to those of bacteria grown in a medium containing exudates from non-elicited plants. Addition of β -D-glucosyl Yariv reagent to exudates from elicited plants did not affect the growth of *P*. *atrosepticum* bacteria.

- 454
- 455
- 456
- 457
- 458
- 459

460

461 **Discussion**

462 In a context of ever-increasing human population and water shortage, potato crop is essential to the food security of hundreds of millions of people worldwide. Potato 463 464 diseases such as common scab, tuber soft rot or powdery scab caused by soil-borne pathogens remain a major threat affecting tuber quality and yield (Thangavel et al., 465 466 2014). So far, most of the studies carried on S. tuberosum deal with infection of tubers, the root system being completely unexplored. Considering the importance of 467 root border cells and their exudates in shaping the soil microflora it is thus essential 468 to acquire knowledge on potato root system and its function in plant defense against 469 pathogens. A deep understanding of the cellular and molecular mechanisms 470 controlling interactions between roots, exudates and microorganisms can help 471 improving protection during tuber formation and growth within the rhizosphere. 472

The present study is one of the first reports to characterize potato root tip, border 473 cells and exudates. Root tips of S. tuberosum released individual cells characteristic 474 475 of the "classical" root border cells embedded in thick mucilage similar to those 476 described in pea (Hawes et al., 2003). Based on their morphology, two subpopulations of root border cells, namely small and elongated border cells, were 477 478 easily distinguishable. In pea, three subpopulations of border cells were previously identified corresponding to small, intermediate and elongated border cells. However 479 480 in pea, only small and intermediate border cells were found to be living cells capable 481 of developing defense responses against pathogens (Cannesan et al., 2011). In potato, 482 elongated border cells were also stained with calcein-AM indicating that, unlike in pea, both subpopulations are viable cells that might function in root defense. Also 483 484 unlike in pea, potato border cells were found to be highly enriched in large starch 485 granules, a feature not observed in any other species so far. Starch is known to serve as an energy reserve for the cells and it is likely to play an important role in the 486 survival of potato root border cells after their release within the rhizosphere. 487

Our data also show the occurrence of thick mucilage that surrounds border cells. In plants, root mucilage is mainly produced and secreted by the root cap and border cells (Moody *et al.*, 1988; Vicré *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2010). Carbohydrates have been shown to be major components of root mucilage in many plant species including cowpea, pea, wheat and maize (Moody *et al.*, 1988, Cannesan *et al.*, 2011).

They are also important for interaction of root with microbes (Hinch and Clarke, 493 1980; Longman and Callow, 1987). We analyzed the monosaccharide composition of 494 potato root exudates and found that they contain high levels of Gal (68.7 %) 495 suggesting that galactans are major components of the exudates. Such a high content 496 of Gal residues has never been reported in any other plant species studied so far. Gal 497 content was always found to be less represented in root mucilage not exceeding 30 to 498 35%. For instance Gal content was shown to represent 33% for maize, 28% for 499 cowpea, 20% for Rice and 16% for Wheat (Chaboud and Rougier, 1984; Moody et 500 501 al., 1988). Although we show that galactan-containing polymers such as RG1 are constituents of potato root mucilage, AGP appear to be very abundant. This 502 503 observation is in agreement with previous findings reporting the presence of AGP in quite high amounts in root exudates of various plant species (Moody et al., 1988; 504 505 Durand et al., 2009; Ma et al., 2010; Cannesan et al., 2012). However, AGP were not the only HRGPs represented in the root exudates of potato. Interestingly, LM1-506 507 recognized epitopes carried by extensins were also detected in the exudates. Whereas 508 extensins are known to accumulate in the plant cell walls resulting on its structural 509 reinforcement during biotic stress, its occurrence in root mucilage has never been reported. The functional relevance of extensin produced in root exudates has yet to 510 be fully explored. 511

The high content of Gal residues present in potato root exudates seem to be mostly 512 associated with AGP and to a lesser extent with extensin and RG-I. Recent data 513 highlight the importance of HRGP such as AGP and extensin in plant-microbe 514 interactions (Zhu et al., 2003; Xie et al., 2011; Nguema-Ona et al., 2012; Plancot et 515 al., 2013; Nguema-Ona et al., 2014). For instance, in vitro assays revealed that AGP 516 from pea root cap and border cells could interfere with the development of the 517 pathogenic oomycete Aphanomyces euteiches (Cannesan et al., 2012). Such 518 interaction species-specific is probably correlated to the high complexity and 519 specificity of the AGP carbohydrate moiety. However, the molecular mechanisms 520 521 controlling such interactions are still not fully elucidated. Interestingly, our western blot data show that treatment with elicitor preparations from P. atrosepticum induces 522 modifications of AGP and extensin in root exudates of S. tuberosum. Elicitation also 523 causes an increase in labeling with LM1 anti-extensin mAb. Whereas no change in 524 525 AGP labeling was detected in our conditions with the JIM 13 antibody, the LM2 and

JIM15 AGP signals strongly increased after treatment with the elicitors. This 526 indicates that specific subpopulations of AGP might be involved in the response to 527 elicitors and defense against pathogens. It is worth noting that an increase in the 528 content of the AGP recognized by the mAb LM2 was previously detected upon 529 inoculation with the pathogenic Fusarium oxysporum and in response to fusaric acid 530 treatment in the roots of wax gourd (Xie et al., 2011). Modification in the anti-531 extensin LM1 pattern of labeling also occurs in response to elicitors in root border-532 like cells of A. thaliana and flax (Plancot et al., 2013). These observations do support 533 534 a role for LM2, JIM15 and LM1 epitope-containing molecules in the defense responses of root cells against pathogens. 535

Our data also show that root exudates from S. tuberosum stimulate P. atrosepticum 536 growth by increasing the number of colonies formed. In order to check whether AGP 537 contained in the exudates interfere with the development of *P. atrosepticum*, root 538 exudates were pre-incubated with β -D-glucosyl Yariv reagent before use. A 539 significant decrease in bacterial growth occurred under this condition as compared to 540 541 β-D-glucosyl Yariv untreated exudates. Our findings revealed a positive role of AGP of S. tuberosum root in promoting P. atrosepticum growth. It is well known that soil-542 borne microorganisms utilize root exudates for growth and multiplication (Bais et al., 543 2006). Although we cannot rule out the possibility that AGP might be a source of 544 nutrients for bacteria, AGP or their carbohydrates could act as signaling molecules 545 546 that activate mechanisms controlling bacterial cell proliferation. However, it remains to be established whether AGP affect bacterial binding and growth on potato root in 547 548 vivo in a similar manner. Attraction and adhesion of bacteria and other pathogens on root have also been shown to be affected by AGP (Vicré et al., 2005; Cannesan et 549 al., 2012). For instance, AGP from Pisum sativum from border cells and exudates act 550 as chemoattractants for the pathogenic oomycete Aphanomyces euteiches (Cannesan 551 et al., 2012). The study has shown that AGP attract zoospores, facilitate their 552 encystment and prevent subsequent germination thereby inhibiting the proliferation 553 554 of the pathogen. In the case of S. tuberosum, AGP from the exudates could contribute to trap and maintain *P. atrosepticum* within the root extracellular trap (RET) then 555 556 facilitating the action of antimicrobial compounds found within. The RET surrounding the root cap is known to be enriched in antimicrobial compounds such as 557 558 phytoalexins, proteins and exDNA providing efficient root cap protection against

infection (Gunawardena et al 2005., Wen et al., 2007., 2009; Cannesan et al., 2011, 559 2012; Driouich et al., 2013). It is interesting to note that in response to exudates from 560 elicitor treated potato seedlings; the number of colonies formed is significantly 561 reduced. How this is controlled is unclear. However, this finding is consistent with 562 the hypothesis that newly-synthesized antimicrobial molecules (e.g., phyotalexins, 563 defense-related proteins) interfering with the growth P. atrosepticum, are secreted 564 into the exudates. Further research is required to substantiate this hypothesis. 565 Together our finding highlights the importance of galactan-containing molecules 566 567 released by root cap and border cells into the exudates in controlling plant root interactions with soil-borne microbes. 568

569

570

Supplementary material

In the Supplementary data, we show the presence of starch within border cells and the capacity of the pathogen-derived elicitor to induce callose deposition in root cells of *S. tuberosum*. Finally, we provide data using Gum Arabic as standard to estimate the quantity of AGP in root exudates.

575

576 Acknowledgments

We are grateful to La Région de Haute Normandie and le Grand Réseau de 577 Recherche-Végétal, Agronomie, Sol et Innovation, l'Université de Rouen, Le Fonds 578 Européen FEDER for financial supports. Abdoul Koroney was funded by a Ph.D 579 fellowship from the French embassy in Niger (Bourse de Cooperation Française). 580 The authors thank Dr. Xavier Latour (LMSM, EA 4312, Evreux, Université de 581 Rouen, France) and Dr. Florence Val (Agrocampus Ouest Rennes, France) for 582 respectively providing P. atrosepticum strains and elicitor preparation from P. 583 atrosepticum. A special thank is due to Dr. Virginie Deveaux (Comité Nord, 584 Achicourt, France) for providing tubers and vitroplants of potato and Dr. Corinne 585 Loutelier-Bourhis (COBRA UMR6014 and FR3038, Université de Rouen, France) 586 for linkage analysis of root exudates using methanolysis. We also thank Dr. Eric 587 588 Nguema-Ona for helpful and constructive comments during the course of this work.

References

Attard A, Gourgues M, Callmeyn-Torre N, Keller H. 2010. The immediate activation of defense response in Arabidopsis roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. New Phytologist **187**, 449-460.

Balmer D, de Papajewski DV, Planchamp C, Glauser G, Mauch-Mani B. 2013. Induced resistance in maize is based on organ-specific defense responses. Plant Journal 74, 213-25.

Bais H.P, Weir T.L, Perry L.G, Gilroy S, Vivanco J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annual Review of Plant Biology **57**, 233-66.

Berendsen RL, Pieterse CM Bakker PA. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science **17**, 478–486.

Cai M, Wang N, Xing C, Wang F, Wu K, Du X. 2013. Immobilization of aluminum with mucilage secreted by root cap and root border cells is related to aluminum resistance in *Glycine max L*. Environmental science and pollution research international **20**, 8924-33.

Carpita NC and Shea EM. 1989. Linkage structure of carbohydrate by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) of partially methylated alditol acetates. In C. J. Biermann, & G. D. McGinnis Eds. Analysis of carbohydrates by gas-liquid chromatography and mass spectrometry Florida, Boca Ranton: CRC Press pp. 157–216.

Chaboud A and Rougier M. 1984. Identification and localization of sugar components of rice (*Oryza sativa* L.) root cap mucilage. Journal of plant physiology **116**, 323-30.

Chaparro JM, Badri DV, Bakker MG, Sugiyama A, Manter DK, Vivanco JM. 2013. Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. PLoS One 8: e55731 doi: 10.1371/journal.pone.0055731. Cannesan MA, Durand C, Burel C, Follet-Gueye ML, Lerouge P, Ishii T, Driouich A, Vicré-Gibouin M. 2012. Effect of arabinogalactan-proteins from root caps of *Pisum sativum* and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. Plant Physiology **159**, 1658-1670.

Cannesan MA, Gangneux C, Lanoue A, Giron D, Laval K, Hawes M, Driouich A, Vicré-Gibouin M. 2011. Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*. Annals of Botany **108**, 459-469.

Ciucanu I and Kerek F. 1984. Rapid and simultaneous methylation of fatty and hydroxy fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. Journal of Chromatography **284**,179-185.

Diallo S, Crépin A, Barbey C, Orange N, Burini JF, Latour X. 2011. Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology **75**, 351-64.

Douches DS, Maas D, Jastrzebski K, Chase RW. 1996. Assessment of potato breeding progress in the USA over the last century. Crop Science **36**, 1544–52.

Durand C, Vicré-Gibouin M, Follet-Gueye ML, Duponchel L, Moreau M, Lerouge P, Driouich A. 2009. The organization pattern of root border-like cells of Arabidopsis is dependent on cell wall homogalacturonan. Plant Physiology **150**, 1411–1421.

Driouich A, Follet-Gueye ML, Vicre-Gibouin M, Hawes M. 2013. Root border cells and secretions as critical elements in plants host defense. Current Opinion in Plant Biology **16**, 489-495.

Driouich A, Cannesan MA, Dardelle F, Durand C, Plancot B, Bernard S, Follet-Gueye ML, Vicré-Gibouin M. 2012. Unity is strength: the power of border cells and border like cells in relation with plant defense. *In* Vivanco JM, Baluska F, eds, Secretions and Exudates in Biological Systems, Signaling and Communication in Plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 91-107.

Driouich A, Durand C and Vicré-Gibouin M. 2007, Formation and separation of root border cells. Trends in Plant Science **12**, 14-19.

Endo I, Tange T, Osawa H. 2011. A cell-type-specific defect in border cell formation in the *Acacia mangium* root cap developing an extraordinary sheath of sloughed-off cells. Annals of Botany 108, 279 – 290.

Gunawardena U, Rodriguez M, Straney D, Romeo JT, Van Etten HD, and Hawes MC. 2005. Tissue-Specific localization of Pea Root Infection by *Nectria haematococca*. Mechanisms and Consequences. Plant Physiology **137**, 1363–1374.

Gunawardena U and Hawes MC. 2002. Role of border cells in localized root infection by pathogenic fungi. Molecular Plant-Microbe Interactions **15**, 1128–1136.

Haverkort AJ. 1990. Ecology of potato cropping systems in relation to latitude and altitude. Agricultural systems **32**, 251–72.

Hawes MC, Curlango-Rivera G, Xiong Z, Kessler JO. 2012. Roles of root border cells in plant defense and regulation of rhizosphere microbial populations by extracellular DNA 'trapping'. Plant and Soil **355**, 1-15.

Hawes MC, Bengough G, Cassab G, Ponce G. 2003. Root caps and rhizosphere. Journal of Plant Growth Regulation 21, 352–367.

Hinch JM and Clarke AE. 1980. Adhesion of fungal zoospores to root surfaces is mediated by carbohydrate determinants of the root slime. Physiological Plant Pathology **16**, 303-7.

Horn P, Santala J, Nielsen SL, Hühns M, Broer I, Valkonen JP. 2014. Composite potato plants with transgenic roots on non-transgenic shoots: a model system for studying gene silencing in roots. Plant Cell Reports **33**, 1977-92.

Irving HR and Grant BR. 1983. The effect of pectin and plant root surface carbohydrates on encystment and development of *Phytophthora cinnamomi* zoospores. Journal of General Microbiology **130**, 1015-1018.

Kitazawa K, Tryfona T, Yoshimi Y, *et al.* 2013. β -galactosyl Yariv reagent binds to the β -1,3-galactan of arabinogalactan proteins. Plant Physiology **161**, 1117-26.

Knee EM, Gong FC, Gao M, Teplitski M, Jones AR, Foxworthy A, Mort AJ, Bauer WD. 2001. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. Molecular Plant-Microbe Interactions 14, 775-84.

Kröner A, Hamelin G, Andrivon D, Val F. 2011. Quantitative resistance of potato to *Pectobacterium atrosepticum* and *Phytophthora infestans*: integrating PAMP-triggered response and pathogen growth. PLoS One 6, e23331. doi: 10.1371/journal.pone.0023331.

Latour X, Faure D, Diallo S, Cirou A, Smadja B, Dessaux Y, Orange N. 2008. Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium spp. (Erwinia carotovora)*. Cahiers Agricultures **17**, 355–360.

Liu Y, Zhang N, Qiu M, Feng H, Vivanco JM, Shen Q and Zhang R. 2014. Enhanced rhizosphere colonization of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by pathogen infection. FEMS Microbiology Letters **353**, 49-56.

Longman D and Callow JA. 1987. Specific saccharide residues are involved in the recognition of plant root surfaces by zoospores of *Pythium aphanidermatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology **30**, 139-50.

Ma W, Muthreich N, Liao C, Franz-Wachtel M, Schütz W, Zhang F, Hochholdinger F, Li C. 2010. The mucilage proteome of maize (*Zea mays L.*) primary roots. Journal of Proteome Research 9, 2968–2976.

Marzec M, Szarejko I, Melzer M. 2014. Arabinogalactan proteins are involved in root hair development in barley. Journal of Experimental Botany doi: 10.1093/jxb/eru475.

Millet YA, Danna CH, Clay NK, Songnuan W, Simon MD, Werck-Reichhart D, Ausubel FM. 2010. Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns. Plant Cell 22, 973–990.

Moody SF, Clarke AE, Bacic A. 1988. Structural analysis of secreted slime from wheat and cowpea roots. Phytochemistry 27, 2857-2861.

Nguema-Ona E, Vicré-Gibouin M, Gotté M, Plancot B, Lerouge P, Bardor M, Driouich A. 2014. Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. Frontiers in Plant Science 2, 5:499. doi: 10.3389/fpls.2014.00499.

Nguema-Ona E, Coimbra S, Vicre-Gibouin M, Mollet J-C, Driouich A. 2012. Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. Annals of Botany **110**, 383–404.

Nguema-Ona E, Andème-Onzighi C, Aboughe-Angone S, Bardor M, Ishii T, Lerouge P, Driouich A. 2006. The reb1-1 mutation of Arabidopsis. Effect on the structure and localization of galactose-containing cell wall polysaccharides. Plant Physiology **140**, 1406-17.

Pérombelon MCM and Kelman A. 1980 Ecology of the soft rot erwinias. Annual Review of Phytopathology **18**, 361–87.

Pérombelon MCM. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. Plant Pathology **51**, 1–12.

Plancot B, Santaella C, Jaber R, Kiefer-Meyer MC, Follet-Gueye ML, Leprince J, Gattin I, Souc C, Driouich A, Vicré-Gibouin M. 2013. Deciphering the response of border-like cells of *Arabidopsis thaliana* and *Linum usitatissimum* to pathogen-derived elicitors. Plant Physiology **163**, 1584-1597.

Priou S and Jouan B. 1996. Les maladies provoquées par les bactéries pathogenes du genre Erwinia. In Rousselle P, Robert P, and Crosnier JC eds, La pomme de terre. INRA Editions, Paris, France. p. 260–265.

Ray TC and Callow JA. 1988. Composition of root mucilage polysaccharides from *Lepidium sativum*. Journal of experimental botany **206**, 1249-1261.

Sardar HS, Yang J and Showalter AM. 2006. Molecular interactions of arabinogalactan proteins with cortical microtubules and F-actin in Bright Yellow-2 tobacco cultured cells. Plant Physiology **142**, 1469-79.

Smadja B, Latour X, Trigui S, Burini JF, Chevalier S, Dessaux Y, Orange N. 2004a. Involvement of *N*-Acylhomoserine lactones througouht plant infection by *Erwinia caratovora subsp. atroseptica (Pectobacterium atrosepticum)*. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal **17**, 1269-1278.

Smadja B, Latour X, Trigui S, Burini JF, Chevalier S, Orange N. 2004b. Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (Pectobacterium spp.). Canadian Journal of Microbiology **50**, 19-27.

Smallwood M, Yates EA, Willats WG, Martin H, Knox JP. 1996. Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactanproteins in rice and carrot. Planta **198**, 452–459.

Smallwood M, Martin H, and Knox JP. 1995. An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasmamembrane glycoproteins. Planta **196**, 510-522.

Thangavel T, Steven Tegg R, Wilson CR. 2014. Resistance to multiple tuber diseases expressed in somaclonal variants of the potato cultivar Russet Burbank. Scientific World Journal 2014: 417697. doi: 10.1155/2014/417697.

Van Holst GJ and Clarke AE. 1986. Organ-Specific Arabinogalactan-Proteins of *Lycopersicon peruvianum* (Mill) Demonstrated by Crossed Electrophoresis. Plant Physiology **80**, 786-9

Vicré M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A. 2005. Root border-like cells of Arabidopsis: microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. Plant Physiology **138**, 998–1008.

Walker TS, Bais HP, Halligan KM, Stermitz FR, Vivanco JM. 2003. Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**, 2548-54.

Wen F, White GJ, VanEtten HD, Xiong Z, Hawes MC. 2009. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. Plant Physiology **151**, 820–829.

Wen F, Van Etten H. D, Tsaprailis G, Hawes MC. 2007. Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. Plant Physiology 143, 773–783.

Willats WGT, Orfila C, Limberg G, et al. 2001. Modulation of the Degree and Pattern of Methylesterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls. Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. Journal of Biological Chemistry 276, 19404–19413.

Willats WGT, Knox JP. 1996. A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of β -glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal **9**, 919–925.

Wu Q and Van Etten HD. 2004. Introduction of plant and fungal genes into pea (*Pisum sativum L*.) hairy roots reduces their ability to produce pisatin and affects their response to a fungal pathogen. Molecular Plant-Microbe Interactions **17**, 798–804

Xie D, Ma L, Šamaj J, Xu C. 2011. Immunohistochemical analysis of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins in the roots of resistant and susceptible wax gourd cultivars in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. Benincasae infection and fusaric acid treatment. Plant Cell Reports **30**, 1555–1569

Yaganza ES, Tweddell RJ, Arul J. 2014. Postharvest application of organic and inorganic salts to control potato (*Solanum tuberosum L.*) storage soft rot: plant tissue-salt physicochemical interactions. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **62**, 9223-31

Yariv J, Lis H, Katchalski E. 1967. Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. Biochemical Journal **105**, 1C–2C

Yates EA, Valdor JF, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W, Knox JP. .1996. Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. Glycobiology **6**, 131–139

York WS, Darvill A, O'Neill M, Stevenson T, Albersheim P. 1985. Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. Methods in Enzymology 118, 3–40

Zhu MY, Ahn SJ, Matsumoto H. 2003. Inhibition of growth and development of root border cells in wheat by Al. Plant Physiology **117**, 359-367.

Tables

Table 1: Summary of data of immunodot binding assay performed on root exudates

 of *S. tuberosum* using different antibodies

Antibody	Epitope	Reference	Root exudates
LM 19	Un-esterified homogalacturonan	Verhertbruggen et al., (2009)	++
JIM 7	Partially methyl-esterified epitope of homogalacturonan	Willats et al., (2000)	++
LM 5	β(1-4)-D-galactan	Jones et al. (1997)	+
LM 6	(1→5)-α-L-Arabinan	Willats et al. (1998)	++
INRA-Ru1	$[\rightarrow 2)$ - α -L-Rhap - $(1 \rightarrow 4)$ - α -D-GalpA- $(1 \rightarrow]$	Ralet et al., (2010)	+
Jim 13	β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha	Yates et al., (1996)	++
LM 2	β-Linked GlcA	Smallwood et al., (1994)	++
LM 1	Extensin	Smallwood et al., (1995)	++

+ and ++ refer to moderate and highly positive labeling with the antibody, respectively.

RT	Methylation product	
11,53	T-Xyl _p	
16,48	3,5-Ara _f	
19,22	3-Gal _p	
20,47	6-Gal _p	
24,17	3,6-Gal _p	

Table 2: Methylation analysis of S. tuberosum root exudates

Linkages were deduced from electron-impact MS of partially methylated alditol acetate derivatives.

RT: Retention time

Figure legends

Fig. 1. Histochemical characterization of *S. tuberosum* root border cells. A, Micrograph of a root tip stained with ruthenium red showing abundant mucilage (M) surrounding the root tip. Border cells are also seen at the root tip. B, Calcofluor staining of the root tip showing border cell phenotypes. Two sub-populations of border cells are distinguishable: elongated border cells (eBC) and small/round-shaped cells (sBC). C, Bright-field micrograph of a population of border cells stained with the vital dye Calcein-AM. Fluorescence is indicative of cell viability. BC: Border cells; RC: Root cap; M: Mucilage

Bars =100 μ m (A, B) and (D, E) = 20 μ m

Fig. 2. Monosaccharide composition (mol %) of *S. tuberosum* root exudates recovered from elicited or non-elicited (control) roots. Elicitation was applied using an elicitor preparation from the bacterium *P. atrosepticum*. E1, E2 and E3 correspond to the concentrations used for elicitation (1 mg.ml-1 for E1, 2 mg.ml-1 for E2, and 3 mg.ml-1 for E3). Superscript letters indicate a statistically significant difference (P<0.05).

Fig. 3. Immunofluorescence staining of root tips with the mAbs, LM2 (A), JIM13 (B) and LM1 (C) recognizing arabinogalactan protein and extensin epitopes. Note the occurrence of the epitopes both at the root cell surface and within the mucilage (white asterix). RC: Root cap; BC: Border cells.

Bars = $100\mu m$ (A) and (B, C) = $20\mu m$

Fig. 4. Quantification of arabinogalactan proteins of root exudates using gel diffusion assay and β -D-glucosyl Yariv reagent. Exudates are recovered from non-elicited control (C) or elicited (E) roots. Histogram illustrating the density of the staining

with the β -D-glucosyl Yariv reagent (A) as revealed by the gel diffusion assay that is shown in (B). Elicitation was applied using an elicitor preparation from the bacterium *P. atrosepticum*. E1, E2 and E3 correspond to the concentrations used for elicitation, namely 1 mg.ml⁻¹ for E1, 2 mg.ml⁻¹ for E2, and 3 mg.ml⁻¹ for E3.

Fig. 5. SDS-PAGE and western blot analysis of proteins from root exudates of nonelicited (c for control) or elicited (E) plants. Proteins were run on gels, blotted, and probed with antisera recognizing arabinogalactan proteins JIM13 (A), LM2 (B) and JIM15 (C) or extensin LM1 (D). Molecular mass is indicated in kDa on the left. E1 and E2 correspond to the concentrations used for elicitation (1 mg.ml⁻¹ for E1, 2 mg.ml⁻¹ for E2).

Fig. 6. Laser confocal microscopy image showing binding of the bacterium *P. atrosepticum* to *S. tuberosum* root tip. Note the presence of the bacteria over border cells (arrowheads and inset). Green spots correspond to bacteria. BC: Border cells

Bars = 86 μ m (A) and (B) = 20 μ m

Fig. 7. Effects of root exudates from *S. tuberosum* on the growth of *P. atrosepticum*. The number of colonies formed (colony forming unit CFU) in a standard growth medium or in a medium supplemented with root exudates from elicited or non-elicited plants was measured. Different conditions were used:

- Bacteria grown in a standard medium supplemented with water only (w) or water containing β -GlcY reagent (wy).

- Bacteria grown in a medium supplemented with root exudates from non-elicited plants (the exudates were treated without (e) or with (ey) β -GlcY before use).

⁻ Bacteria grown in a medium supplemented with root exudates from elicited plants (the exudates were treated without (E1 or E2) or with (E1y or E2y) β -GlcY before use). E1 and E2 correspond to the elicitor concentrations used (1 mg.ml⁻¹ for E1 and 2 mg.ml⁻¹ for E2). Superscript stars indicate a statistically significant difference (P<0.05). RE: Root exudates. β -GlcY: β -D-glucosyl Yariv reagent . The reagent was used at 5 µg.ml⁻¹



Fig. 1.



Fig. 2.






Fig. 4.

	A	JIM 13	}	B	LM	2	C	JIM 15	,	D	LM 1	
1.5	С	E1	E2	C	E 1	E2	C	E1	E2	С	E1	E2
kDa 95 — 72 — 55 —	1	H	-		ľ			n			10.0	•
43 — 34 — 28 — 17 —	R.	1	1		-	. 6	11	1.1	1 10	33.4	-	N

Fig. 5.



Fig. 6.





III.3.2. Données supplémentaires

Supplementary data

Root mucilage of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*

Abdoul Koroney¹, Carole Plasson¹, Ramatou Djermakoye Seyni Sidikou², Laurence Menu Bouaouiche¹, Azeddine Driouich¹ and Maïté Vicré-Gibouin¹



Supplementary Fig. S1: Detection of starch accumulation within root border cells stained with Lugol.

 $Bar=20 \mu m$



Supplementary Fig. S2: Staining of callose in root and root border cells of S. *tuberosum*. Elicited root (A); non-elicited root (B). Note callose deposition (blue spots) in elicited root tip. Elicitor preparation was used at 1mg.ml⁻¹. BC: Border cells; RC: Root cap

 $Bar = 100 \ \mu m$



Supplementary Fig. S3: Gel diffusion assay of Gum arabic stained with β -D-glucosyl Yariv. Gum Arabic is used at different concentrations as a standard reference to estimate the quantity of arabinogalactan proteins of root exudates (see figure 4)

III.3.3. J. Exp. Botany : Decision letter

Dear Dr. Vicré-Gibouin,

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Experimental Botany.

I am sorry to inform you that, based on the comments of two experts in the field and my own opinion, we cannot consider your manuscript for publication in JXB. A major shortcoming that was flagged by both reviewers is the lack of quantification and in some cases even the absence of biological repeated experiments. As these are very fundamental criteria in the evaluation process and require redoing a large part of the experimental work, we regret to inform you that we cannot accept your manuscript for publication.

We are sorry that we cannot be more positive on this occasion and hope you will consider submitting future work to the JXB.

Yours sincerely,

Thomas Beeckman JXB Editor

III.3.4. Commentaires des reviewers et réponses apportées

Reviewer 1 Comments for the Author

This is a very interesting study that reports composition of root exudates in potato and demonstrates how the composition changes in response to elicitors from a pathogen. Furthermore, the altered exudates are shown not to stimulate bacterial growth, in contrast to exudates from non-induced plants. This is a clearly presented study of significant interest.

Major comments

1.

317. So far, the root architecture of *S. tuberosum* has never been investigated. 329. These granules, in such a large number and size, have never been seen in border cells of any other species studied so far including pea, wheat, flax or A. thaliana. 484. Potato border cells were found to be highly enriched in large starch granules, a feature not observed in any other species so far'.

The authors should be careful with this kind of statements and generally avoid them. Who is to say for example that a feature was 'never observed in any species so far', or that potato roots have 'never been investigated'. Maybe there is a paper out there, maybe in Polish, Norwegian or Spanish or in a PhD thesis from Russia that the authors did not find (or try to find). Very likely there were observations that were not published. The statements of priority carry a certain air of arrogance that is better avoided.

2.

The method for elicitor preparation and treatment is not given. In the Results there is a reference to Kroner *et al.*, 2011, but that is insufficient.

Réponse : L'éliciteur utilisé dans cette étude nous a été fourni par le Dr Florence Val de l'Université de Rennes et cela avait été mentionné dans le manuscrit.

3.

Fig. 4. The data have no replicates. This experiment should include biological replicates and standard deviations.

Réponse : L'expérience est réalisée avec 2 reliquats biologiques et 2 réplicas techniques. Le fait de ne pas l'avoir mentionné est effectivement une maladresse.

4.

Table1. I have no problem with the qualitative nature of this experiment, but it would still have been nice to have some kind of quantitation e.g. by comparing response to response of dilution series of a standard or by some other method that qualifies what '+' and '++' mean. This is especially an issue since all antibodies react. So what does a negative look like? Could a negative control be included? For example since fucose is absent an antibody against fucosylated xyloglucan would be an excellent negative control. A xylan antibody is perhaps another option. Antibodies against xyloglucan and xylan are available commercially.

Réponse : Effectivement l'utilisation de « + » ou « ++ » est inadéquate pour un immunodot dans la mesure où nous n'avons fait aucune gamme de dilution pour déterminer une échelle de réponse.

5.

In Figs. 2 and 7, the number of replicates is not given. I do not know exactly how these

experiments were done, but it would be important that they were done with independent biological replicates. This needs to be clarified.

Réponse : Une fois de plus le fait de ne pas mentionner le nombre de réplicas constitue une maladresse. L'analyse de la composition monosaccharidique est effectuée avec des exsudats provenant de 15 plantules (N = 15). Six réplicas biologiques sont effectués indépendamment. De plus, trois réplicas techniques sont effectués pour chaque réplica biologique.

6.

The high content of GlcA is interesting. I wonder why no information about the linkage of GlcA was obtained with the linkage analysis? Is the GlcA alpha or beta linked? Are the GlcA residues terminal? Is it possible to say something about the high content of GlcA? The composition of the exudates in Fig. 2 is not that of a 'typical AGP' plus some pectin. I am not questioning the data in Fig. 2 but some more discussion of the - in my opinion – somewhat unusual composition would be useful.

Réponse : les acides uroniques ne sont pas détectés sur une perméthylation de type PMAA (Partially Methylated Alditol Acetate), d'où le manque d'information sur le type de liaison des acides glucuroniques.

7.

Further to Table 2. It is not consistent with the sugar composition analysis in Fig. 2. 11% Xyl and 17% Ara is inconsistent with the much smaller numbers in Fig. 2. In Fig. 2, Rha and Man are much more abundant than Ara and Xyl, but Table 2 has no information on Man and Rha linkage. I mentioned the GlcA already above, it is also missing from Table 2 although it is the second most abundant sugar in Fig. 2 comprising more than 20% of the total.

Réponse : Si j'ai bien compris l'observation, le reviewer fait le lien entre les temps de rétention des différents sucres et la quantité observée sur le chromatogramme de la figure 2. Sauf erreur de ma part, il n'y a pas de lien entre le temps de rétention d'un sucre sur une PMAA et sa quantité. S'il n'y a pas d'informations sur le Man et le Rha, c'est que l'on souhaitait mettre l'accent sur la grande quantité de Gal dans les exsudats. C'est cette observation qui est à l'origine de cette expérience. Quant à GlcA, il n'est tout simplement pas possible de l'analyser en utilisant la PMAA.

- Minor comments

9.

Ln. 159 Remove '21 C'. This appears to be an error since different temperatures for day (24 C) and night (18 C) are given in the same sentence.

10.

What is 'vitroplant'? I can guess what it means but it is as far as I know not a standard term and should be explained.

11.

Ln. 338: 'gaz' should be changed to 'gas'.

12.

Table2. RT – the unit (presumably minutes) should be stated. Numbers should have decimal point '.' and not comma ','. What is the unit for the numbers? Presumably Mol% but it needs to be stated.

13.

Ln. 500: rice and wheat should be lower case

14.

Ln. 507: It is stated 'Interestingly, LM1- recognized epitopes carried by extensins were also detected in the exudates. Whereas extensins are known to accumulate in the plant cell walls resulting on its structural reinforcement during biotic stress, its occurrence in root mucilage has never been reported. A bit further down it is stated that, 'Modification in the anti- extensin LM1 pattern of labeling also occurs in response to elicitors in root border- like cells of *A. thaliana* and flax (Plancot *et al.*, 2013). These two statements sound a bit contradictory. Maybe it is simply that the Plancot paper did not look at mucilage but only at the cells themselves (?), but it might be a good idea to explain a bit more.

Réponse : Comme mentionné dans la discussion, les extensines sont retrouvées dans les mécanismes de renforcement pariétal des BLC de lin (Plancot *et al.*, 2013). Par contre, dans cet article, la présence d'extensines est mise en évidence dans les exsudats en plus de leur présence au niveau des BC. Par ailleurs, nous avons bien précisé que cette observation n'est pas encore rapportée dans d'autres études d'où le questionnement initial de leur rôle dans les exsudats racinaires de pomme de terre.

Reviewer 2 Comments for the Author...

This manuscript appears to show that an elicitor preparation from *P. atrosepticum* changes AGP and possibly extensin levels in potato root exudates after growth on a very artificial medium. The microbial work, as reported is incomprehensible to me. I also have reservations about how reproducible some of the experiments are, but that may be simply a problem with the way the experiments were described. The following are some comments:

1.

The work was done with plantlets grown *in vitro* in M & S growth medium (which normally contains added plant hormones), with added sucrose (3.5%). Therefore I am not sure what the data actually mean. Could the responses observed be due to the plant hormones or high levels of sucrose? It appears that the experimental rationale may be misconceived. For example, previous work has not described seeing starch in border cells of other plant species, but we simply cannot know if the difference seen with potato (Fig1 lines 329-30) is due to the sucrose, the hormones or a genuine species difference.

Réponse : La mise en évidence des grains d'amidon dans les cellules bordantes de pomme de terre n'est absolument pas due au fait de l'utilisation du milieu MS ou du saccharose dans le milieu de culture de la pomme de terre. En effet une récente étude a émis les mêmes observations dans les cellules bordantes de *Medicago truncatula*.

2.

The data in Figs 1-3 look fine with the caveat that they may only be appropriate for growth of roots in this odd medium (in terms of normal plant growth).

3.

The data in Fig 4 seem to me to be of dubious quality. What seems to be observed is that there is no response at 1 mg/ml of elicitor, a response at 2 mg/ml and no response at 3 mg/ml elicitor. I have never heard of such a dose response in such an assay. There is no explanation of how many independent elicitor preps were used or how many replicates were done with different (i.e. independent) preparations of root exudates.

4.

The same issue about reproducibility recurs in the data in Fig. 5. Although it is less of an issue because each prep seems to be made up from 15 roots. It is not essential to show data from

different experiments, but it would be good to know that in a biological repeat the same trend was evident.

5.

The data in Fig. 7 are incomprehensible to me. It is clearly stated in the methods that the bacteria 'concentration' (I assume numbers) was adjusted to 30.10 power 7 CFU per ml. To me that means there are about 3 x 10 power 8 bacteria per ml. In the first experiments it then seems that 100 microlitres of this was plated on PGA agar containing 20% water or 20% exudate. That means that about 30,000,000 bacteria (3 x 10 power7) bacteria were plated. Why were only 30 colonies observed? Alternatively why did six orders of magnitude more bacteria NOT grow? Next I assumed that an error had been made and that actually dilutions had been done such that about 30 colonies appeared after incubation on the control. Where then did the supposedly extra 25% of the colonies appear from when the exudate was present in the agar? Is the hypothesis that the exudate prevents the death of some bacteria in the control? If that is so, how were the original CFUs determined? Another explanation could be that the exudate contained contaminating bacteria. Was this a reproducible effect with different root exudates (different biological repeats)? It is very clear to me that this experiment is not possible to understand. Even the simplest explanation (a rogue count in one sample) is not compatible with the description of the experiment in the methods.

Réponse : En réponse à cette observation sur l'effet des exsudats racinaires sur la croissance de *P. atrosepticum* en milieu gélosé, l'effet des exsudats est cette fois-ci observé sur la croissance de la bactérie en milieu liquide non renouvelé (**Figures III.14 et III.15**).





Courbe de croissance de *P. atrosepticum* à 25° C pendant 16h dans le milieu PGA (Contrôle, rose) ou supplémenté avec 1 mg/ml d'exsudats racinaires de plantules de pomme de terre non élicitées (Exsudats, bleu). Le témoin contaminant (vert) correspond aux exsudats racinaires incubés dans le milieu PGA. Les mesures de densité optique sont effectuées à une absorbance de 580 nm toutes les heures. (Barres = Ecart type; n= 9).





Courbe de croissance de *P. atrosepticum* à 25°C pendant 16h dans le milieu PGA (Contrôle, rose) ou supplémenté avec 1 mg/ml d'exsudats racinaires de plantules de pomme de terre non élicitées (Exsudats, bleu) ou élicitées avec 1 mg/mL (E1) ou 2 mg/mL (E2) d'une préparation inactivée de Pectobactéries. Le témoin contaminant (vert) correspond aux exsudats racinaires incubés dans le milieu PGA. Le témoin éliciteur (rose entouré de bleu) est constitué d'éliciteurs bactériens incubé dans le milieu PGA. Les mesures de densité optique sont effectuées à une absorbance de 580 nm toutes les heures. (Barres = Ecart type; n= 9).

Une courbe de croissance de *P. atrosepticum* a été établie en conditions contrôle : 10^8 bactéries par millilitre (DO = 0,1) dans le milieu PGA (**Figure III.14**). Dans ces conditions, la phase de croissance exponentielle se déroule entre trois et sept heures de culture à 25°C sous une agitation de 180 rpm. Pendant cette phase, la vitesse spécifique de croissance ou taux exponentiel de croissance est maximale et de 0,216. Le temps de génération (G) de *P. atrosepticum* est égal à 2,88 heures et correspond à la durée nécessaire pour un doublement de la population bactérienne.

L'ajout de 1 mg/mL d'exsudats racinaires provenant de plantules de pomme de terre élicitées ne modifie pas le temps de génération (G) de *P. atrosepticum*. Cependant, la phase de croissance exponentielle est plus longue d'une heure en présence d'exsudats racinaires. A la fin de la phase stationnaire la culture bactérienne présente une différence de DO de 0,1 par rapport à la condition contrôle soient 10^8 bactéries (Figure III.14).

Cette augmentation de la biomasse bactérienne est vraisemblablement corrélée à une disponibilité de nutriment dans le milieu de culture. Ainsi, dans ces conditions, *P. atrosepticum* utiliserait les exsudats racinaires de pomme de terre comme une source de carbone pour se développer. Cette hypothèse est confortée par le fait que l'analyse par chromatographie en phase gaz des exsudats de pomme de terre a révélé une composition polysaccharidique constituée majoritairement d'AGP. Or, certaines bactéries sont capables de dégrader et d'utiliser les AGP comme une source de carbone (Knee *et al.*, 2001).

Cette expérience a été renouvelée mais cette fois avec des exsudats racinaires provenant de plantules de pomme de terre élicitées par 1 mg/mL ou 2 mg/mL d'un éliciteur dérivé de *P. atrosepticum* (Figure III.15). Les courbes de croissance ne sont pas significativement différentes en présence d'exsudats de plantules élicitées, quelle que soit la concentration en éliciteur, ou en absence d'exsudats. L'augmentation de biomasse induite par la présence des exsudats dans le milieu de culture n'est pas observée dans ce cas.

Ce résultat nous permet d'émettre l'hypothèse qu'une plantule élicitée pourrait produire des composés antimicrobiens inhibant l'effet stimulateur des exsudats racinaires, ce qui est conforme au résultat présenté dans l'article en milieu gélosé.



Figure III.16 : Stratégie générale de recherche des glycoprotéines de S. tuberosum.

Les glycoprotéines de type AGP, Extensines et PRPs sont recherchées dans une collection de séquences protéiques possédant un site potentiel d'O-glycosylation. Cette collection de séquence appelée base de donnée Hyp-O-G est constituée de toutes les séquences contenant le glycomodule [ASTV]-P(1,4)-X(0,10)-[ASTV]-P(1,4) défini par Gomord *et al.*, (2010).

III.4. Analyse bioinformatique : identification des séquences des HRGPs

Afin d'identifier et de réaliser la classification des HRGPs de la pomme de terre, nous avons dans un premier temps choisi d'appliquer la stratégie générale de Showalter *et al.*, (2010) (**Figure I.33, Chapitre I**). L'ensemble des étapes de cette stratégie est regroupé dans l'outil BIO-OHIO développé par les auteurs. Cependant, à l'heure actuelle, le programme s'avère indisponible, malgré une requête adressée aux auteurs conformément aux indications citées dans leur publication.

Pour pallier ce problème, nous avons décidé de mettre en place un nouvel outil bioinformatique utilisant des scripts spécifiques sous le logiciel R. Ces scripts sont principalement utilisés sous R grâce au package « SEQINR » développé par Charif et Lobry en 2007 et qui permet de travailler avec des séquences biologiques. Les scripts ont été développés sur la base de la stratégie de recherche des HRGPs mise en place par Showalter *et al.*, (2010). Cependant, une étape supplémentaire est ajoutée à cette stratégie initiale.

En effet, au lieu de procéder à une analyse sur l'ensemble d'un protéome donné, nous réaliserons au préalable une collection de séquences dénommée « Hyp-O-G putative sequences » constituée uniquement de séquences protéiques possédant un site potentiel de O-glycosylation. Ce site de O-glycosylation est mis en évidence par la présence du glycomodule [ASTV]-P(1,4)-X(0,10)-[ASTV]-P(1,4) défini par Gomord *et al.*, (2010). Cette étape supplémentaire permet de procéder à des analyses uniquement sur des séquences potentielles d'HRGPs car ces dernières sont majoritairement O-glycosylées d'une part et d'autre part, elle permet de travailler sur une collection de séquences restreinte donc plus facile à manipuler. Ainsi, un screening des 56 218 séquences protéiques de la pomme de terre (http://potato.plantbiology.msu.edu/data/PGSC_DM_v3.4_pep.fasta.zip) avec le glycomodule [ASTV]-P(1,4)-X(0,10)-[ASTV]-P(1,4) en se servant de SCAN PROSITE (UNIPROT), nous a permis de collecter 20 971 séquences qui vont constituer notre collection « Hyp-O-G putative sequences ». Cette recherche en amont de séquences contenant un site potentiel de O-glycosylation sera une étape intégrée dans la stratégie de recherche générale des HRGPs établie par Showalter et al., (2010) (**Figure III.16**).



Figure III.17 : Stratégie de recherche des arabinogalactanes protéines (AGPs).

III.4.1. Elaboration des scripts en langage R

Afin de rechercher les glycoprotéines de type HRGPs de la pomme de terre sous le logiciel R, les différentes étapes de la stratégie de recherche sont codées en langage de programmation R sous forme de script. Trois principaux scripts sont édités avec l'aide de Caroline Bérard du laboratoire LITIS de l'Université de Rouen pour la recherche des AGP, des extensines et des PRPs.

III.4.1.1. Script AGP (Annexe 1)

Le « script AGP » reprend l'ensemble de la stratégie présentée dans la figure III.17. L'utilisation de ce script permet de classer les différentes séquences issues de la collection Hyp-O-G en AGP classique, AGpeptide, Lys-rich AGP et les fasciclines-like proteins (FLAs). Est considérée comme AGP classique toute séquence protéique constituée d'au moins 50 % d'acides aminés de type P-A-S-T avec la présence des motifs répétés AP, PA, SP et TP. Les fasciclines-like AGP (FLAs) et les lys-rich-AGP doivent également avoir un pourcentage de P-A-S-T supérieur ou égal à 50% en plus des motifs répétés AP, PA, SP et TP. La recherche des fasciclines-like AGP (FLAs) et des lys-rich-AGP n'étant pas encore intégrée dans le script AGP. leur recherche est effectuée directement sur **SCANPROSITE** (http://prosite.expasy.org/scanprosite/) avec le code accession PS50213 et le motif d'acide aminé KHKKKTKKHK respectivement. Quant aux AG-peptides, ils doivent être constitués d'au moins 35% d'acides aminés P-A-S-T avec une longueur comprise entre 50 et 90 acides aminés et une répétition des motifs AP, PA, SP et TP.

En sortie du programme « Script AGP », R renvoie en résultat un tableau contenant le nom des séquences, le pourcentage en acides aminés P-A-S-T et le nombre de répétition des motifs AP, PA, TP et SP (Annexe 2).

Pour les séquences d'intérêts AGPs, AGpeptide, Lys-rich AGP et FLAs, une recherche de peptide signal ainsi qu'une ancre GPI est effectuée afin de faciliter leur classification. Ces deux étapes n'étant pas encore intégrées au « Script AGP », la recherche des peptides signaux est effectuée sur la plateforme CBS (<u>http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</u>) et les ancres GPI sur la plateforme PredGPI (<u>http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm</u>). Un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est également effectué pour la recherche d'orthologues potentiels.



Figure III.18 : Stratégie de recherche des Extensines.

III.4.1.2. Script EXT (Annexe 1)

Le « script EXT » permet la recherche de l'ensemble des extensines, notamment les extensines « classiques » et les « ShortExtensines » selon la stratégie présentée dans la **figure III.18.**

Est considérée comme extensines « classiques », toute séquence possédant au moins deux répétitions du motif tétrapeptidique S-P-P-P ou pentapeptidique S-P-P-P. Le « script EXT » permet de distinguer ces deux classes d'extensines en les regroupant au sein d'une classe « EXTs1 » pour les extensines possédant le motif tétrapeptidique et au sein de la classe « EXTs2 » pour les extensines ayant des motifs pentapeptidiques. Une troisième catégorie d'extensines portant des motifs S-P-P-P-P est également classée par le « script EXT » dans le groupe « EXTs3 ». L'ensemble des trois classes d'extensines doit être composé de plus de 200 résidus acides aminés.

S'agissant des « Short-Extensines », elles possèdent les mêmes caractéristiques que les « classiques », mais elles ne doivent pas excéder 200 acides aminés de longueur. Pour ces dernières une classe « ShortExts » a été définie dans la programmation. L'ensemble de ces extensines peuvent également posséder des répétitions du motif tripeptidique de type YVY.

En sortie du programme « Script EXT », R renvoie en résultat un tableau contenant le nom des séquences, le nombre de motifs S-P-P-P, S-P-P-P et S-P-P-P-P ainsi que nombre de répétition de motif YVY dans toutes séquences (Annexe 2).

Comme précédemment, pour l'ensemble des extensines une recherche de peptide signal ainsi que d'une ancre GPI est effectuée ainsi que la recherche d'orthologues potentiels.



Figure III.19 : Stratégie de recherche des PRPs.

III.4.1.3. Script PRPs (Annexe 1)

Le « script PRPs » reprend l'ensemble de la stratégie présentée dans la **figure III.19** et permet de rechercher l'ensemble des PRPs contenues dans la collection de séquence Hyp-O-G. Une première catégorie de PRPs est constituée de séquences composées d'au moins 45% de résidus d'acides aminés de type P-V-K-C-Y-T et est regroupée dans la classe « PRPs1 » par le « script PRPs ».

La deuxième catégorie des PRPs est constituée par des séquences contenant au moins deux répétitions du motif K-K-P-C-P-P ou encore deux répétitions de motifs P-V-X-(K/T) ou X peut être n'importe quel acide aminé. Ces deux types de PRPs sont respectivement regroupés dans les classe « PRPs2 « et « PRPs3 ». Toutes les PRPs peuvent également contenir une répétition de motif PPV.

En sortie du programme « Script PRPs », R renvoie en résultat un tableau contenant le nom des séquences, le pourcentage des acides aminés P-V-K-C-Y-T, le nombre de répétition des motifs K-K-P-C-P-P, P-V-X-(K/T) et PPV (Annexe 2).

Comme précédemment, pour l'ensemble des PRPs une recherche de peptide signal ainsi que d'une ancre GPI est effectuée ainsi que la recherche d'orthologues potentiels.

Tableau III.1 : Séquences putatives d'AGPs

Classe HRGPs	Script AGP	BIO-OHIO
AGPs classique (> 50% PAST)	78	64
AG Peptide (≥ 35% PAST)	96	86
Fasciclin-like AGP	23	25
Total	200	175

Identifiées par le « Script AGP » ou identifiées par l'outil BIO-OHIO (Showalter et al., 2010)

Tableau III.2 : Séquences putatives d'Extensines

Identifiées par le « Script EXT » ou identifiées par l'outil BIO-OHIO (Showalter et al., 2010)

Classe HRGPs	Script EXT	BIO-OHIO
Extensines	118	102
Short EXT	22	12
Total	140	114

Tableau III.3 : Séquences putatives de PRPs

Identifiées par le « Script PRPs » ou identifiées par l'outil BIO-OHIO (Showalter et al., 2010)

Classe HRGPs	Script EXT	BIO-OHIO
PRPs (≥ 45% PVKCYT ;	169	128
KKPCPP ; PPVX(K/T)		
Total	169	128

III.4.2. Validation des Scripts

III.4.2.1. Application des scripts sur les séquences protéiques d'A. *thaliana*

Afin de vérifier l'efficacité et la robustesse de nos différents scripts pour la recherche des HRGPs, nous avons fait une analyse comparée des résultats obtenus par le programme BIO OHIO de Showalter *et al.*, (2010) et les résultats obtenus à la suite de l'application de nos scripts sous le logiciel R. Pour ce faire, nous nous sommes constitués une collection de séquences à partir de la base ATpepTAIR10 de TAIR contenant 35 386 séquences protéiques d'*A. thaliana*.

Après l'application du « Script AGP », 200 séquences putatives d'AGP au total ont été identifiées contre 175 identifiées par le programme BIO-OHIO (**Tableau III.1**). Parmi les 200 séquences identifiées par le « Script AGP » 78 sont identifiées comme étant des séquences putatives d'AGP classiques contre 64 identifiées par BIO-OHIO. De même, 96 séquences d'AGpeptide putatifs sont retrouvées par le « Script AGP » contre 86 initialement trouvées par BIO-OHIO. Pour finir, 23 FLAs sont identifiées grâce à l'utilisation du code d'accession SCANPROSITE contre 25 identifiées par BIO-OHIO grâce à l'utilisation du motif :

[MALIT]T[VILS][FLCM][CAVT][PVLIS][GSTKRNDPEIV]+[DNS][DSENAGE]+[ASQM]

Quant à la recherche des extensines, l'utilisation du « Script EXT » a permis d'identifier 118 extensines classiques et 22 short-extensines. BIO-OHIO a permis d'identifier 102 extensines classiques et 12 short-extensines putatives (**Tableau III.2**).

En ce qui concerne la recherche des PRPs, le « Script-PRPs » a permis d'identifier 169 séquences putatives contre 128 identifiées par BIO-OHIO.

Tableau III.4 : Séquences putatives d'AGP non identifiées par le « Script AGPs »

En comparaison des séquences putatives identifiées par BIO-OHIO (Showalter et al., 2010)

Gène	Nom de la glycoprotéine	Classe
At1g03820	AGP28	Chimère
At1g24520	AGP50	Classique
At1g28290	AGP31	Chimère
At2g28440	AGP54	Classique
At2g33790	AGP30	Chimère
At3g45230	AGP57	Classique
At5g18690	AGP25	Classique
At5g21160	AGP32	Chimère
At5g56330	AGP33	Chimère

Tableau III.5 : Séquences putatives d'EXT non identifiées par le « Script EXT »

En comparaison des séquences putatives identifiées par BIO-OHIO (Showalter et al., 2010)

Gène	Nom de la glycoprotéine	Classe
At1g52290	PERK15	Chimeric
At4g32710	PERK14	Chimeric
At5g49080	EXT16	S-P-P-P

Tableau III.6 : Séquences putatives de PRPs non identifiées par le « Script PRPs »

En comparaison des séquences putatives identifiées par BIO-OHIO (Showalter et al., 2010)

Gène	Nom de la glycoprotéine	Classe
At3g50570	PRP8	Chimère
At5g09520	PRP9	Chimère
At5g15780	PRP11	Chimère

III.4.2.2. Analyse comparée des séquences identifiées

Afin de vérifier la précision des différents scripts édités, une analyse comparée de l'ensemble des séquences identifiées par Showalter *et al.*, (2010) est effectuée.

Au niveau des AGP, cette analyse a permis de montrer que 90% des séquences identifiées AGP par l'étude de Showalter *et al.*, (2010) sont retrouvées grâce à l'utilisation du « Script AGP ». En effet, les séquences codantes pour les protéines issues des gènes At1g03820, At1g28290, At2g33790, At5g21160, At5g56330 sont classées comme étant des chimères car disposant d'un pourcentage de P-A-S-T inférieur à 50% (**Tableau III.4**). Or, ce seuil de 50% de P-A-S-T constitue une des clés de détermination des AGPs classiques définie par les auteurs. Du fait de ce pourcentage de P-A-S-T insuffisant, ces cinq séquences sont automatiquement éliminées par le « Script AGP » de même que par le programme BIO-OHIO. Le fait que ces séquences soient classées comme étant des AGP, relève d'un travail manuel effectué. Une pareille approche est également utilisée pour la localisation et la classification des gènes At1g24520 et At3g45230 codant pour l'AGP50 et l'AGP57 respectivement. Cela explique que ces dernières soient également écartées de la liste des séquences potentielles d'AGP lors de l'utilisation du « Script AGP ».

Les séquences des protéines codées par les gènes At2g28440 et At5g18690, respectivement AGP54 et AGP25 n'ont pas été collectées lors de l'utilisation du « Script AGP ». Cependant, une analyse du gène At2g28440 codant pour l'AGP54 révèle que ce dernier ne contient que 49,81% d'acide aminé P-A-S-T par rapport au 63% rapportés par l'auteur. Par contre au niveau des motifs répétés AP/PA/SP/TP le « script AGP » et BIO-OHIO montrent les mêmes résultats à savoir 5/5/28/0. De plus, le résultat d'un Blast sur ce gène renvoie à une En/Spm-like transposon protein (Q9SKM6) avec une identité de 100%. En résumé le gène At2g28440 ne code ni pour une AGP, ni pour une HRGP de façon générale.

Pour conclure sur la recherche des AGP, seul le gène At5g18690 codant pour l'AGP25 n'a pas pu être identifié avec l'utilisation du « Script AGP », ce qui donne finalement un pourcentage de 99% de séquences putatives d'AGP identifiées.

En ce qui concerne l'utilisation du « Script EXT », il a permis de même d'identifier 99% des séquences mises en évidence par Showalter *et al.*, (2010). Les deux gènes At1g52290, At4g32710, représentant respectivement la PERK15 et PERK14 n'ont été mis en évidence ni par BIO-OHIO ni par le « Script EXT » (**Tableau III.5**).

 Tableau III.7 : Séquences putatives d'AGPs identifiées par le « Script AGPs » avec ou sans le glycomodule

Classe HRGPs	- Glycomodule	+ Glycomodule
AGPs classique (> 50%	78	74
PAST)		
AG Peptide (≥ 35% PAST)	96	55
Total	174	129

 Tableau III.8 : Séquences putatives d'Extensines identifiées par le « Script EXT » avec

 ou sans le glycomodule

Classe HRGPs	- Glycomodule	+ Glycomodule
Extensines	118	114
Short EXT	22	17
Total	140	131

 Tableau III.9 : Séquences putatives de PRPs identifiés par le « Script PRPs » avec ou sans le glycomodule

Classe HRGPs	- Glycomodule	+ Glycomodule
PRPs (≥ 45% PVKCYT ;	169	108
KKPCPP ; PPVX(K/T)		
Total	169	108

En effet, PERK14 et PERK15 ne contiennent aucun motif répété tétrapeptidique S-P-P-P ou pentapeptidique S-P-P-P qui caractérise les extensines, ce qui explique qu'elles ne soient pas détectées par les deux programmes. L'ajout de ces gènes comme étant des extensines par les auteurs se justifie par le fait qu'elles soient documentées dans la littérature. Quant au gène At5g49080 (EXT16) il n'a également pas été retrouvé avec l'utilisation du « Script EXT ». Une recherche de ce gène dans la collection de séquences ATpepTAIR10 sur laquelle l'ensemble des recherches ont été effectuées ne donne aucun résultat. Cela peut alors expliquer le fait que le « Script Ext » n'a pas identifié cette EXT16.

Enfin, l'utilisation du « Script PRPs », a permis l'identification de 100% des séquences PRPs mises en évidence par Showalter *et al.*, (2010). En effet, les trois séquences At3g50570, At5g09520, At5g15780 correspondant à la PRP8, PRP9 et PRP11 (**Tableau III.5**) ne sont ni détectables par BIO-OHIO, ni par le « Script PRPs » car ne possédent aucun motif principal caractéristique des PRPs. Les auteurs ont rajouté ces séquences comme étant des PRPs suite à une recherche d'annotation dans la base de données d'*A. thaliana*.

En plus de l'identification de la majorité des HRGPs collectées par BIO-OHIO, les différents scripts édités sous R, ont également permis de mettre en évidence de nouvelles HRGPs à l'exemple des séquences AT1G63530, AT1G63540, AT2G22510, AT3G54590, AT4G11430 après l'application du « script AGP ».

III.4.3. Impact du glycomodule sur la recherche des HRGPs

L'application du glycomodule en amont de la création de la collection de séquences Hyp-O-G a permis de circonscrire cette dernière de 35 386 séquences protéiques chez *A. thaliana* à seulement 15 708 séquences.

L'utilisation du « script AGP » sur cette nouvelle collection Hyp-O-G a permis d'identifier seulement 129 AGP putatives contre 174 initialement identifiées à partir de la collection de séquence de base (**Tableau III.7**). Cette différence de 45 séquences entre les deux collections est principalement due aux 41 séquences d'AGpeptide en moins dans la collection Hyp-O-G. Cela peut s'expliquer par le fait que l'utilisation du glycomodule permet d'identifier les protéines avec un site potentiel d'O-glycosylation. Les 41 séquences manquantes peuvent alors être considérées comme des faux positifs car ne possédant pas de site potentiels de O-glycosylation.



Figure III.20 : Répartition des 570 HRGPs identifiées chez *S. tuberosum* avec l'utilisation des scripts AGP, EXTs et PRPs.

La recherche des extensines par l'utilisation du « script Ext » a quant à lui permis d'identifier 131 séquences potentielles d'extensines dans la collection Hyp-O-G contre 140 au sein de la base initiale (**Tableau III.8**). Et enfin 108 PRPs sont identifiés à partir de la base Hyp-O-G contre 169 à partir de la base initiale (**Tableau III.9**).

D'une façon générale, on remarque qu'à la suite de l'utilisation du glycomodule et donc de la collection de séquences Hyp-O-G, on diminue de façon considérable le nombre des séquences putatives sans pour autant en perdre en qualité. En effet, toutes les séquences identifiées comme HRGPs dans la collection de séquences initiales avec 35 386 séquences sont retrouvées dans la collection Hyp-O-G qui ne compte que 15 708 séquences. De plus, les recherches dans la base Hyp-O-G ont permis d'identifier le gène AT5G18690 qui code pour l'AGP25 et qui n'a pas été identifié précédemment par l'utilisation du « Script AGP » sur la base initiale.

En conclusion, l'addition d'un filtre intégrant le glycomodule dans la stratégie générale de recherche des HRGPs établie par Showalter *et al.*, (2010) (**Figure III.17**) permet de disposer d'une collection de séquence plus stringente et plus précise.

III.4.4. Application à Solanum tuberosum

Le génome de la pomme de terre a été séquencé et publié en juillet 2011 dans Nature par le PGSC (Potato Genome Sequence Consortium), un consortium de scientifiques appartenant à 14 pays. Cependant, une grande partie du génome n'est pas encore annotée, ce qui freine la recherche dans le protéome traduit de la pomme de terre. La recherche des HRGPs est effectuée directement sur la collection de séquences Hyp-O-G qui contient 20 971 séquences protéiques sur les 56 218 séquences que compte le protéome traduit de pomme de terre.

Sur l'ensemble de cette collection, les trois scripts ont été appliqués, et les FLAs sont quant à elles identifiées suite à un scan sur SCANPROSITE du motif PS50213 sur la collection de séquences Hyp-O-G. Au total, 570 séquences de HRGPs putatives ont pu être collectées (**Figure III.20**). Les résultats complets sont présentés dans l'**annexe 3**.

Ces résultats constituent une étape préliminaire à la participation à l'annotation du génome de pomme de terre. Egalement, une analyse phylogénique de cette classe de glycoprotéines, et notamment des AGP, nous permettrait d'améliorer la compréhension de l'origine de ces protéoglycanes.

CHAPITRE IV. Discussion

Culture de plants VS culture de « semences vraies »

La pomme de terre est une plante très sensible aux pathogènes. Ces derniers présentent une diversité importante allant des bactéries, aux virus en passant par les nématodes (Mehle *et al.*, 2004 ; Brian *et al.*, 2009 ; Mansfield *et al.*, 2012). De plus, le mode de culture végétatif utilisé majoritairement dans le monde favorise et accroît l'infection de la plante de pomme de terre. Cette culture végétative est basée sur l'utilisation de plants, qui peuvent être un important réservoir de pathogènes, tout en gardant un aspect sein comme dans le cas d'une infection par la bactérie du genre *Pectobacterium* (Latour *et al.*, 2008). Ainsi, l'importation ou l'exportation de plants infectés favorise la dissémination des pathogènes. Afin de lutter contre cette dissémination, il existe des structures chargées de contrôler la mise sur le marché de ces plants, telles que le Service Officiel de Contrôle et de Certification (SOC) et l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la protection des plantes (EPPO).

Cependant, ce genre de structures n'existe pas dans la majorité des pays en voie de développement, ce qui pousse les petits agriculteurs à utiliser des plants non certifiés avec le risque de disposer d'un lot contaminé. Quant aux grosses structures de production, elles tentent non sans difficulté d'importer des plants certifiés produits en majorité dans les pays européens afin de garantir leur production. Cette démarche reste la plus sûre mais malheureusement est très onéreuse. A titre d'exemple, il faut environ 22 000 euros pour acheminer un conteneur de plants de 25 tonnes au Niger (Association Agro Sans Frontière Bretagne). Ces différents éléments peuvent expliquer les faibles taux de production de la pomme de terre en Afrique subsaharienne, en Amérique du Sud et en Asie.

Pour pallier ce problème de coût et de production, plus d'une trentaine de pays du tiers monde dont le Bangladesh, l'Inde, l'Indonésie, le Népal, les Philippines, le Sri Lanka et le Vietnam ont opté pour la production de pomme de terre à partir de « semences vraies » ou graines de pomme de terre (Workshop CIP, 2008 ; Ortiz *et al.*, 2009).

Une analyse économique menée par le CIP a montré que la surface de production de la pomme de terre à partir de « semences vraies » atteint 10%, principalement chez les petits producteurs qui ont vu leur rendement augmenter de 75% par rapport à la traditionnelle culture de plant. Des données similaires sont également enregistrées en Inde et en Indonésie.

Dans la zone subsaharienne, les Organisations Non Gouvernementales (ONG), telles qu'Agro Sans Frontière, font la promotion de cette production de pomme de terre à base de « semences vraies ».

Au cours de ces travaux de thèse nous avons brièvement travaillé avec des graines de pomme de terre pour la caractérisation racinaire notamment la mise en évidence des cellules bordantes (BC).

Caractérisation des BC de la pomme de terre

Depuis leur mise en évidence il y a de cela une vingtaine d'années, les BC ont été identifiées chez plusieurs plantes notamment le pois, le soja (Hawes *et al.*, 2000 ; 2003 ; Cannesan *et al.*, 2011), le maïs (Rodger *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2014), le coton (Curlango-Rivera *et al.*, 2013), le riz (Cai *et al.*, 2011) ou chez *Medicago truncatula* (Watson *et al.*, 2015). Des organisations atypiques de ces cellules ont également été décrites chez *A. thaliana*, le lin ou encore l'acacia (Vicré *et al.*, 2005 ; Endo *et al.*, 2011 ; Plancot *et al.*, 2013). Ces cellules sont des acteurs majeurs de la défense racinaire et participent à la compartimentation de la défense. En effet, de récents travaux chez *Medicago truncatula* ont montré une importante différence dans le métabolome et le transcriptome des BC comparés à ceux de la racine (Watson *et al.*, 2015).

Bien que leur présence au niveau de la racine de pomme de terre ait été signalée dans quelques études (Diallo *et al.*, 2008 ; Lilley *et al.*, 2011), aucune de ces études n'a effectué un travail de caractérisation de ces BC. Cela peut s'expliquer par le fait qu'au niveau de la pomme de terre contrairement à d'autres plantes, toute l'attention ou presque est portée sur l'analyse des tubercules de pomme de terre (Desender *et al.*, 2006 ; Kröner *et al.*, 2011 ; Saubeau *et al.*, 2014 ; Barbey *et al.*, 2013 ; Yaganza *et al.*, 2014). Au cours de ce projet nous avons pu mettre en évidence, chez le cultivar Désirée de *Solanum tuberosum*, la présence de BC sur des plantules issues de culture *in vitro* de pomme de terre. Ces cellules présentent des caractéristiques identiques aux cellules bordantes décrites chez le pois. Elles ont la particularité d'être libérées individuellement les unes des autres autour de la coiffe racinaire.

Toutefois, la caractérisation de ces cellules chez la pomme de terre, a permis de mettre en évidence une hétérogénéité au sein de la population de ces BC. Ainsi, nous avons observé une sous-population de BC, au bout de la coiffe racinaire, constituée de petites cellules rondes, les « small border cells » (sBC). Une deuxième sous-population de BC, constituée de cellules un peu plus allongées, sont retrouvées sur les parties latérales de la coiffe, les « elongated border cells » (eBC). Ce type de différences basées sur des critères morphologiques au sein de la population des BC a été rapporté chez le pois (Cannesan *et al.*, 2011) ou chez le lin (Plancot *et al.*, 2013). De plus, nous avons mis en évidence la présence d'amidon au sein des BC de pomme de terre. Cet amidon peut ainsi servir de source d'énergie aux cellules bordantes une fois libérées dans la rhizosphère. Une telle observation a été récemment rapportée chez Medicago. Les auteurs ont également discuté de l'utilisation de l'amidon comme source critique de carbone et d'énergie pour les BC (Watson *et al.*, 2015).

L'analyse de la viabilité des BC de pomme de terre, montre également que l'ensemble des sous-populations de BC sont vivantes après détachement de la racine. Cette observation est différente de celle effectuée chez les BC de pois ou seules deux sous-populations parmi les trois identifiées restent vivantes une fois détachées de la racine (Cannesan *et al.*, 2011).

BC de pomme de terre et défense

De précédents travaux sur les cellules bordantes de pois ont démontré l'implication des BC dans la défense des plantes contre les stress biotiques (Cannesan *et al.*, 2012). Il a ainsi été démontré que les BC de pois sont capables d'attirer ou de repousser des pathogènes autour de la coiffe racinaire (Hawes *et al.*, 1998 ; 2000 ; Baetz and Martinoia, 2014).

Afin de vérifier si les BC de la pomme de terre sont capables de percevoir un éliciteur et d'induire une réponse immunitaire, nous les avons mises en présence d'un éliciteur dérivant de *P. atrosepticum*. Une production de ROS a été observée seulement cinq minutes après le traitement. Cette réaction de défense est comparable sur l'ensemble des sous-populations de BC de pomme de terre. La production de ROS ne constituant pas une défense spécifique (Wang *et al.*, 2013), nous avons également mis en évidence la production de callose par la racine et les BC de pomme de terre 48h après élicitation. Ces dépôts de callose constituent une réaction spécifique de défense observée chez les plantes lors d'un stress biotique dont le rôle est de limiter ou de stopper la progression du pathogène dans les tissus de la plante (Hückelhoven, 2007 ; Millet *et al.*, 2010 ; Ellinger and Voig, 2014).
Les exsudats racinaires de la pomme de terre

La production des exsudats racinaires est assurée majoritairement par la coiffe racinaire et les BC (Moody *et al.*, 1988; Vicré *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2010). Chez la plante de pomme de terre, la présence de ce mucilage/exsudats peut être observée grâce à une coloration au rouge de ruthénium. Une série d'analyses par chromatographie en phase gaz nous a permis d'anlyser la composition en monosaccharides suivante : le galactose (Gal) qui est le monosaccharide majoritaire avec 68.7 ± 0.2 % des sucres totaux, suivi de l'acide glucuronique (GlcA) avec 22.5 ± 0.1 %, et enfin d'autres sucres tels que l'arabinose (Ara), le rhamnose (Rha), le xylose (Xyl) et le mannose (Man) retrouvés à des quantités relativement inférieures.

Toutefois, il faut noter la présence inhabituelle de galactose (Gal) en grande quantité dans les exsudats de pomme de terre. En effet, seulement 33% de Gal est retrouvé dans les exsudats racinaires du maïs, 28% chez le haricot, 20% chez le riz et 16% chez le blé (Chaboud and Rougier, 1984; Moody *et al.*, 1988). La présence de Gal peut provenir majoritairement de galactanes ou de polymères-riches en galactanes tels que le rhamnogalacturonan I (RGI) et/ou les arabinogalactan proteins (AGP). Afin de déterminer l'origine du Gal, nous avons effectué une analyse des exsudats par perméthylation, ce qui a permis de mettre en évidence la présence des liaisons de type β -1,3 Gal-, β -1,6 Gal- et β -3,6 Gal, qui sont des liaisons rencontrées spécifiquement chez les AGP (Seifert et Roberts, 2007 ; Ellis *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2010, Knoch *et al.*, 2014). La présence d'AGP dans les exsudats racinaires de pomme de terre est également confirmée par des immunoblots effectués avec les anticorps LM2 (Smallwood *et al.*, 1994) et JIM13 (Smallwood *et al.*, 1995) dirigés spécifiquement contre des épitopes associés aux AGP.

Ainsi, ces résultats montrent une grande richesse en AGP des exsudats racinaires de la pomme de terre. La présence de ces glycoprotéines dans les exsudats a déjà été décrite chez d'autres plantes (Moody *et al.*, 1988; Durand *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010; Cannesan *et al.*, 2012).

Par ailleurs, nous avons également démontré la présence d'épitopes associés aux extensines dans les exsudats de pomme de terre. Ce résultat est très intéressant car il rapporte pour la première fois la présence des extensines dans des exsudats racinaires, alors que ces dernières sont retrouvées avant tout au niveau de la paroi végétale où elles jouent un rôle dans le renforcement pariétal à la suite d'un stress biotique (Ribeiro *et al.*, 2006).

En réponse à une élicitation, un changement dans la composition monosaccharidique des exsudats racinaires est constaté, notamment pour l'Ara et le Gal, les deux composants principaux des AGP (Seifert et Roberts, 2007 ; Ellis *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2010, Knoch *et al.*, 2014). Ce changement laisserait supposer une modification dans la population d'AGP. En effet, l'utilisation des anticorps monoclonaux JIM15 et LM2 sur les profils protéiques montrent l'apparition de nouvelles bandes correspondant à de nouvelles populations d'AGP dans les conditions élicitées à 1 et 2 mg/ml. L'utilisation de l'anticorps LM1 qui reconnait les épitopes associés aux extensines montre aussi une intensification de la réponse en condition élicitée par rapport aux contrôles.

Ces résultats supportent l'hypothèse d'une possible synthèse de population d'AGP spécifique à l'élicitation, en plus de l'intensification de la réponse des AGP et des extensines. Cette hypothèse est en conformité avec les observations de Xie *et al.*, (2011) : la population d'AGP reconnue par l'anticorps LM2 augmente lors du traitement de la courge cireuse avec de l'acide fusarique. Quant à une possible modification des extensines suite à une élicitation, cela avait été rapporté chez les BLC d'*A. thaliana* et de lin (Plancot *et al.*, 2013).

> Effet des exsudats racinaires sur la croissance de *P. atrosepticum*

Au cours de ces travaux, nous avons observé une augmentation de la biomasse de *P. atrosepticum*, en culture avec 1 mg/ml d'exsudats racinaires non élicités. Cette observation peut s'expliquer par le fait que certains pathogènes telluriques ont développé la capacité de dégrader les AGP grâce à une sécrétion de β -1,3-galactanases, β -1,6-galactanases, arabinofuranosidases et des β -glucuronidases (Knee *et al.*, 2001 ; Nguema-Ona *et al.*, 2013). La dégradation de ces AGP des exsudats racinaires pourrait alors servir de source de carbone à la bactérie.

Par ailleurs, les exsudats racinaires provenant de plantes élicitées n'engendrent aucun effet de croissance ou d'augmentation de la biomasse de *P. atrosepticum*. L'inhibition de l'effet stimulateur de la croissance pourrait provenir dans ce cas de la synthèse de composés antimicrobiens tels que des phytoalexines ou des protéines Pathogenesis-Related par la plante. Cependant, d'autres expérimentations sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse d'un point de vue moléculaire.

> Effet chimioattractant des exsudats racinaires sur P. atrosepticum

Le chimiotactisme est le phénomène par lequel les microorganismes orientent leur mouvement vers une cible bien déterminée, grâce à un composé chimique émis par cette dernière. Chez les plantes, le chimiotactisme des agents pathogènes constitue un élément déterminant lors de l'étape précoce de la virulence (Josenhan and Suerbaum, 2002; Tyler, 2002; Yao et Allen, 2006). Le pouvoir chimiotactique de *Ralstonia solanacearum*, pathogène tellurique de la pomme de terre a également été démontré par Yao et Allen en 2006. En effet cette bactérie répond de manière très spécifique aux exsudats racinaires de la tomate, une plante hôte, comparée à ceux du riz, plante non hôte. Les auteurs ont également démontré que le chimiotactisme constituait un élément majeur de la virulence de Ralstonia. Il a également été rapporté que les AGP issus de la coiffe racinaire et des BC de pois, attirent d'une manière chimiotactique les zoospores d'*A. euteiches* avant de les enkyster (Cannesan *et al.*, 2012).

Au cours de ce travail de thèse, un effet chimioattractant des exsudats de pomme de terre sur *P. atrosepticum* a été mis en évidence. Au vu de l'importante présence d'AGP dans les exsudats racinaires de pomme de terre, nous avons évalué l'implication de ces derniers sur l'effet chimioattractant observé sur *P. atrosepticum*. Pour ce faire, nous avons co-incubé les exsudats racinaires avec du réactif de Yariv. Le résultat reste cependant inchangé. Ainsi, les AGP contenues dans les exsudats racinaires de pomme de terre observé dans le pathosystème pomme de terre-*P atrosepticum*.

Identification des HRGP putatives dans le génome de la pomme de terre

Les HRGPs étant une classe de glycoprotéines importante chez la pomme de terre en particulier et dans le monde végétal en général, nous avons mis en place un outil bioinformatique afin de les identifier rapidement dans les protéomes traduits des génomes de différentes espèces végétales. L'outil bioinformatique mis en place et basé sur le logiciel R, qui présente l'avantage considérable d'être un logiciel gratuit et permet le traitement de plus de 50 000 séquences en une seule analyse.

L'utilisation de cet outil dont la stratégie de recherche est basée sur les travaux de Showalter *et al.*, (2010), nous a permis d'identifier la quasi-totalité des HRGPs annotées d'*Arabidopsis thaliana*, du moins celles qui présentent les caractéristiques des HRGPs. En

effet, les séquences non identifiées ou rejetées par notre programme ne correspondent pas aux critères de sélection des HRGPs définies par Showalter et al., (2010).

Ainsi, les quinzaines de séquences non classées sont toutes des chimères rajoutées dans la liste des HRGPs suite à un travail manuel des auteurs et suivant les données bibliographiques. L'analyse de ces séquences nous a également permis de mettre en évidence quelques erreurs dans la classification effectuée par Showalter *et al.*, (2010). A titre d'exemple, la classification du gène At2g28440 qui code pour l'AGP54 ne contient que 49,81% de PAST au lieu des 63% indiqué par l'auteur. De plus, la recherche d'homologues de ce gène en effectuant un blast renvoie sur une protéine En/Spm-like transposon (Q9SKM6) avec une identité de 100%.

L'ajout d'une étape supplémentaire qui est la création d'une collection de séquence Hyp-O-G à la stratégie de recherche des HRGPs permet de disposer d'une collection de séquence beaucoup plus restreinte et de réduire les faux positifs. Grâce à cette amélioration, des séquences de type HRGPs ont été collectées alors qu'elles n'avaient pas été identifiées par Showalter *et al.*, (2010). Cependant, ce dernier point peut s'expliquer par le fait que nous avons effectué nos recherches sur une base de données contenant 35,386 séquences protéiques d'*A. thaliana* contre 28,952 séquences utilisées par Showalter *et al.*, (2010).

Une fois cette stratégie de recherche validée, nous avons appliqué le programme sur les séquences protéiques de la pomme de terre. Cette recherche a permis de disposer de 570 séquences potentielles d'HRGPs qui doivent encore être analysées et classées en AGP, PRPs ou Extensines de manière plus approfondie.

Défense de type Root extracellular Trap (RET) chez la pomme de terre ?

Par analogie avec le NET (Neutrophils Extracellular Trap) retrouvé chez les mammifères, Driouich *et al*, (2013) ont proposé le modèle RET (Root extracellular Trap) qui est un modèle de défense en synergie des différents acteurs du système immunitaire racinaire. Parmi ces acteurs, les ADNex, que nous avons mis en évidence la présence chez la pomme de terre, les BC, des polysaccharides (AGP, EXT, etc.) et des composés antimicrobiens participent à la réponse antimicrobienne de la plante. Le mode du fonctionnement du RET est calqué sur celui du NET qui est retrouvé au niveau du système immunitaire humain (Brinkmann *et al.*, 2004).

Ainsi, l'action conjointe des différents acteurs de la défense racinaire vont permettre de piéger et d'immobiliser les pathogènes. Une fois immobilisés, les pathogènes sont détruits par

l'action des protéines de défense et des métabolites secondaires sécrétés par les cellules bordantes et la racine. En plus de cette fonction dans la défense, le RET permet la promotion des interactions avec les bactéries bénéfiques comme les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria ; Driouich *et al.*, 2013).

Au cours de ces travaux de thèse, la majorité des éléments constitutifs du RET tels que défini par Driouich *et al.*, (2013) ont été mis en évidence et caractérisés chez la pomme de terre, et leur implication dans la mise en place de la défense au niveau racinaire de la plante de pomme de terre a été évaluée. Sur la base de l'ensemble de ces résultats, nous émettons l'hypothèse d'une défense racinaire en synergie de type RET chez la plante de pomme de terre : les cellules bordantes vont permettre l'attraction ou la répulsion des microorganismes pathogènes autour de la racine. Puis les ADNex vont permettre l'immobilisation des pathogènes. Des composés antimicrobiens potentiellement sécrétés des cellules bordantes, comme la pisatine identifiée dans le pathosystème *Pisum sativum-A. euteiches* (Cannesan *et al.*, 2012) pourraient agir pour la neutralisation des pathogènes. Les polysaccharides de type AGP et autres composés solubles dans les exsudats racinaires pourraient, d'autre part, favoriser l'attraction des bactéries bénéfiques.

CHAPITRE V. Conclusion et perspectives

Grâce à la mise en place d'un système de culture *in vitro* de la pomme de terre au sein du laboratoire Glyco-MEV, à partir de graines ou à partir d'explants, les cellules bordantes (BC) et le mucilage de la pomme de terre ont pu être caractérisés pour la première fois. Leur possible implication dans la défense racinaire a été évaluée au travers du pathosystème *Pectobacterium atrosepticum / Solanum tuberosum*.

Qu'elles soient produites par les racines de plantules issues de graines, ou issues d'explants, les cellules bordantes se détachent de la coiffe racinaire, comme chez le pois (Cannesan et al., 2011) et présentent deux morphotypes : sphériques (sBC) ou allongées (eBC). L'analyse immunocytochimique de ces cellules a révélé la présence de glycoprotéines de type AGP et extensines, ainsi que des pectines dans leur paroi. Les BC sont des cellules vivantes qui sont capables de percevoir un éliciteur et de développer une réponse immunitaire spécifique. Une interaction directe entre les BC et la bactérie *P. atrosepticum* a été observée par microscopie confocale. Il serait intéressant maintenant de caractériser cette interaction afin de mieux comprendre le comportement de cette bactérie dans ce pathosystème et de localiser le point d'entrée de Pectobacterium au niveau racinaire.

Les AGP entrent majoritairement dans la composition du mucilage de la pomme de terre et les exsudats racinaires, comme potentielles sources de carbone, stimulent la croissance de la bactérie. Tester des concentrations supérieures à 1 mg/mL d'exsudats permettrait de déterminer s'il existe un effet dose réponse. Il serait aussi important de purifier les AGPs à partir des exsudats racinaires et de vérifier leur effet sur *P. atrosepticum*. Cette étude permettrait ainsi de déterminer le rôle joué par les AGP dans les mécanismes de stimulation de cette croissance observée.

Durant ces travaux, nous avons aussi mis en évidence pour la première fois la présence d'ADNex chez la pomme de terre. Cette découverte ouvre une perspective quant aux mécanismes de défense chez la pomme de terre. En effet, comme l'avait démontré Wen *et al.*, (2009), un traitement de l'ADNex avec de la DNase en présence d'un pathogène permet de déterminer son implication dans les processus de défense racinaire. Cette analyse nous permettra ainsi de valider notre hypothèse sur la synergie de type RET des différents acteurs de la défense racinaire de la pomme de terre.

Enfin, l'outil de recherche des HRGPs développé à partir du logiciel R sélectionne et tri les séquences protéiques traduites des génomes en vue de leur classification dans les différentes familles de glycoprotéines. A présent il serait intéressant de procéder à une analyse phylogénétique afin d'étudier la diversification des AGP entre différentes espèces végétales ainsi que leur origine.

A plus long terme, l'identification d'HRGPs de la pomme de terre impliquées dans la résistance aux maladies disséminées par les pathogènes telluriques pourrait aussi permettre de servir de base à la mise au point d'un test *in vitro* de sélection variétale. Des plants moins sensibles car produisant naturellement en abondance des molécules de défense telles que les AGP seraient d'une utilité cruciale pour le développement de la culture de la pomme de terre dans les pays en voie de développement.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abad Z.G, Abad J.A. 1997. Another look at the origin of late blight of potatoes, tomatoes, and pear melon in the Andes of South America. Plant Disease Journal 8:682–688

Abi Abdallah DS, Denkers EY. 2012. Neutrophil cast extracellular trap in response to protozoan parasites. Frontiers in immunology 3: 382

Alghamdi AS, Foster DN. 2005. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. Biology of Reproduction 73:1174-81

Ahn JH, Choi Y, Kim S-G, Kwon YM, Do Choi Y, Lee JS. 1998. Expression of a soybean hydroxyproline-rich glycoprotein gene is correlated with maturation of roots. Plant physiology 116 : 671–679

Ao Ying, Li Zhangqun, Dongru Feng, Feng Xiong, Jun Liu, Jian-Feng Li, Menglong Wang, Jinfa Wang, Bing Liu and Hong-Bin Wang. 2014. OsCERK1 and OsRLCK176 play important roles in peptidoglycan and chitin signaling in rice innate immunity. The Plant Journal 80: 1072–1084

Attard A, Gourgues M, Callmeyn-Torre N, Keller H. 2010. The immediate activation of defense response in Arabidopsis roots is not sufficient to prevent Phytophthora parasitica infection. New Phytologist 187, 449-460.

Axel C, Zannini E, Coffey A, Guo J, Waters DM, Arendt EK. 2012. Ecofriendly control of potato late blight causative agent and the potential role of lactic acid bacteria: a review. Applied Microbiology Biotechnology 96 : 37-48.

B

Badri DV and Vivanco JM. 2009. Regulation and function of root exudates. Plant Cell Environment 32: 666-81

Baetz U and Martinoia E. 2014. Root exudates: the hidden part of plant defense. Trends in Plant Science 19: 90-8 Balmer D and Mauch-Mani B. 2013. More beneath the surface? Root versus shoot antifungal plant defenses. Frontiers in Plant Science 12: 4-256

Basu D, Wang W, Ma S, DeBrosse T, Poirier E, Emch K, Soukup E, Tian L, Showalter AM. 2015. Two Hydroxyproline Galactosyltransferases, GALT5 and GALT2, Function in Arabinogalactan-Protein Glycosylation, Growth and Development in Arabidopsis. PLoS One 14:10-5

Barbey C, Crépin A, Bergeau D, Ouchiha A, Mijouin L, Taupin L, Orange N, Feuilloley M, Dufour A, Burini JF, Latour X. 2013. In Planta Biocontrol of *Pectobacterium atrosepticum* by *Rhodococcus erythropolis* Involves Silencing of Pathogen Communication by the Rhodococcal Gamma-Lactone Catabolic Pathway. PLoS One 6 : e66642

Berendsen RL, Pieterse CM Bakker PA. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science 17: 478–486.

Boller T, Felix G. 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. Annual Review of Plant Biology 60: 379–406

Brian J. Haas, Sophien Kamoun, Michael C. Zody, Rays H. Y. Jiang, Robert E. Handsaker, Liliana M. Cano, Manfred Grabherr, Chinnappa D et al., 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. Nature 461: 393-398

Boyd V, Cholewa OM, Papas KK. 2008. Limitations in the Use of Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide (FDA/PI) and Cell Permeable Nucleic Acid Stains for Viability Measurements of Isolated Islets of Langerhans. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy 2 : 66-84.

Brigham LA, Woo HH, Nicoll SM, Hawes MC .1995. Differential Expression of Proteins and mRNAs from Border Cells and Root Tips of Pea. Plant Physiology 109: 457– 463

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science, 303:1532-1535

Brown RM, Saxena IM, Kudlicka K. 1996. Cellulose biosynthesis in higher plants. Trends in Plant Science 5: 149–156

Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, Feramisco J, Nizet V. 2006. Current Biology 4: 396–400

C

Caffall K.H., Mohnen D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. Carbohydrate Research 344: 1879–1900

Cai MZ, Wang FM, Li RF, Zhangb S, Wang N, Xu GD. 2011. Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings. Journal of Inorganic Biochemistry 105: 966–971

Cannesan MA, Durand C, Burel C, Follet-Gueye ML, Lerouge P, Ishii T, Driouich A, Vicré-Gibouin M. 2012. Effect of arabinogalactan-proteins from root caps of Pisum sativum and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. Plant Physiology 159: 1658-1670

Cannesan MA, Gangneux C, Lanoue A, Giron D, Laval K, Hawes M, Driouich A, Vicré-Gibouin M. 2011. Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*. Annals of Botany 108: 459-469

Carvalhais LC, Dennis PG, Badri DV, Kidd BN, Vivanco J, Schenk P. 2015. Linking jasmonic acid signalling, root exudates and rhizosphere microbiomes. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-01-15-0016-R

Cassab GI. 1998. Plant cell wall proteins. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49: 281–309

Chaboud A and Rougier M. 1984. Identification and localization of sugar components of rice (Oryza sativa L.) root cap mucilage. Journal of plant physiology 116, 323-30.

Chen, J. and Varner, J.E. 1985. Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extension and a proline-rich 33-kDa protein. Proceedings of the National Academy of Sciences 82, 4399–4403.

Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. Nature Reviews. Molecular Cell Biology 6, 850–861

Curlango-Rivera G, Huskey DA, Mostafa A, Kessler JO, Xiong Z, Hawes MC. 2013; Intraspecies variation in cotton border cell production: rhizosphere microbiome implications. American Journal of Botany 100 :1706-12

Curlango-Rivera G, Hawes MC. 2011. Root tips moving through soil: an intrinsic vulnerability. Plant Signaling & Behavior 6 : 726-7

D

D'Arcy WG. 1991. The Solanaceae since 1976 with a review of its biogeography. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M, Estrada-R N (eds) Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp 75-137

Davidsson PR, Kariola T, Niemi O, Palva ET. 2013. Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. Frontiers in Plant Science 4: 191

Deepak S, Shailasree S, Kini RK, Muck A, Mithöfer A, Shetty SH. 2010. Hydroxyproline-rich Glycoproteins and Plant Defence. Journal of Phytopatholo. 158: 585– 593

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

Desender S, Andrivon D, Val F. 2007. Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? Cellular Microbiology 9 : 21-30

Diallo S, Crépin A, Barbey C, Orange N, Burini JF, Latour X. 2011. Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology 75 : 351-64

Driouich A, Follet-Gueye ML, Vicre-Gibouin M, Hawes M. 2013. Root border cells and secretions as critical elements in plants host defense. Current Opinion in Plant Biology 16, 489-495 Driouich A, Cannesan MA, Dardelle F, Durand C, Plancot B, Bernard S, Follet-Gueye ML, Vicré-Gibouin M. 2012. Unity is strength: the power of border cells and border like cells in relation with plant defense. In Vivanco JM, Baluska F, eds, Secretions and Exudates in Biological Systems, Signaling and Communication in Plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 91-107.

Driouich A, Durand C, Cannesan M-A, Percoco G, Vicré-Gibouin M. 2010. Border cells versus border-like cells: are they alike? Journal of Experimental Botany 61: 3827–3831

Driouich A, Durand C and Vicré-Gibouin M. 2007. Formation and separation of root border cells. Trends in Plant Science 12 : 14-19.

Dundek P, Holík L, Rohlík T, Hromádko L, Vranová V, Rejšek K, Formánek P. 2011. Methods of plants root exudates analysis: A review. Acta Universitatis doi.org/10.11118/actaun201159030241

Durand C, Vicré-Gibouin M, Follet-Gueye ML, Duponchel L, Moreau M, Lerouge P, Driouich A. 2009. The organization pattern of root border-like cells of Arabidopsis is dependent on cell wall homogalacturonan. Plant Physiology 150: 1411–1421

E

Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A. 2010. Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? Plant Physiology 153 : 403-19

Ellinger Dorothea and Voigt Christian A. 2014. Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. Annals of Botany 114 : 1349–1358

Elphinstone, J.G. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex (Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C., eds), pp. 9–28. St Paul, MN: APS Press.

Endler A and Persson S. 2011. Cellulose synthase and synthesis in Arabidopsis. Molecular Plant 4: 199–211 Endo I, Tange T, Osawa H. 2011. A cell-type-specific defect in border cell formation in the Acacia mangium root cap developing an extraordinary sheath of sloughed-off cells. Annals of Botany 108: 279-90

Estévez JM, Kieliszewski MJ, Khitrov N, Somerville C. 2006. Characterization of synthetic hydroxyproline-rich proteoglycans with arabinogalactan protein and extensin motifs in Arabidopsis. Plant Physiology 142:458-70

F

Faik A, Abouzouhair J, Sarhan F. 2006. Putative fasciclin-like arabinogalactanproteins (FLA) in wheat (*Triticum aestivum*) and rice (*Oryza sativa*): identification and bioinformatic analyses. Molecular Genetics & Genomics 276: 478–494

Faulkner C, Robatzek S. 2012. Plants and pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. Current Opinion in Plant Biology 15: 699-707

Fiers M, Edel-Hermann V, Chatot C, Le Hingrat Y, Alabouvette C, Steinberg C. Potato soil-borne diseases. 2012. Agronomy for Sustainable Development 32: 93–132

Flor HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annu Rev Phytopathol 9: 275-296

Fowler, T.J, Bernhardt C, and Tierney M.L. 1999. Characterization and expression of four proline-rich cell wall protein genes in Arabidopsis encoding two distinct subsets of multiple domain proteins. Plant Physiology., 121: 1081–1091

Fragkostefanakis S, Sedeek KE, Raad M, Zaki MS, Kalaitzis P. 2014. Virus induced gene silencing of three putative prolyl 4-hydroxylases enhances plant growth in tomato (Solanum lycopersicum). Plant Molecular Biology 85 : 459-71

Fry WE. 1998. Late Blight of Potatoes and Tomatoes. Integrated Pest Management, Fact Sheet pp 726.20. Cornell University

Fry WE. 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. Molecular Plant Pathology 9:385-402

Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wrobleski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences 7: 107-36

Fuqua WC,. Winans SC and Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. Journal of Bacteriology. 176:269–275

G

Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Molecular Plant Microbe Interaction 19: 711-724

García-Muniz N, Martínez-Izquierdo JA, Puigdomènech P. 1998. Induction of mRNA accumulation corresponding to a gene encoding a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein by fungal elicitors. Plant Molecular Biology 38: 623–632

Genin S. 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. New Phytologist. 187 : 920-8

Gomord V, Fitchette AC, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C, Plasson C, Michaud D, Faye L. 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. Plant Biotechnology Journal 8:564-87

Gong L, Zhang H, Gan X, Zhang L, Chen Y, Nie F, Shi L, Li M1, Guo Z, Zhang G, Song Y. 2015. Transcriptome Profiling of the Potato (Solanum tuberosum L.) Plant under Drought Stress and Water-Stimulus Conditions. PLoS One 206: 10-5

Groot EP, Doyle JA, Nichol SA, Rost TL. 2004 Phylogenetic distribution and evolution of root apical meristem organization in dicotyledonous angiosperms. International Journal of Plant Sciences 165:97-105

Guimaraes-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceic,a[~] o-Silva F, Elvira M, Saraivaa EM. 2009 Leishmania amazonsis promastigates induce and are killed by neutrophil extracellular traps. Proceedings of the National Academy of Sciences 106: 6748-6753.

Gunawardena U and Hawes MC. 2002. Tissue specific localization of root infection by fungal pathogens: role of root border cells. Molecular Plant-Microbe Interactions 15:1128-36

Gunawardena U, Rodriguez M, Straney D, Romeo JT, Van Etten HD, and Hawes MC. 2005. Tissue-Specific localization of Pea Root Infection by *Nectria haematococca*. Mechanisms and Consequences. Plant Physiology 137: 1363–1374.

Η

Haichar FZ, Santaella C, Heulin T, Achouak W. 2014. Root exudates mediated interactions belowground. Soil Biology 77: 69-80

Hamamoto L, Hawes MC, Rost TL. 2006. The production and release of living root cap border cells is a function of root apical meristem type in dicotyledonous angiosperm plants. Annals of Botany 97:917-23

Haverkort A, Struik P, Visser R, Jacobsen E. 2009. Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. Potato Res 52 : 249–264.

Hawes MC, Curlango-Rivera G, Xiong Z, Kessler JO. 2012. Roles of root border cells in plant defense and regulation of rhizosphere microbial populations by extracellular DNA 'trapping'. Plant and Soil 355: 1-15.

Hawes MC, Curlango-Rivera G, Wen F, White GJ, VanEtten HD, Xiong Z. 2011. Extracellular DNA: The tip of root defenses? Plant Science 180 : 741–745

Hawes MC, Bengough G, Cassab G, Ponce G. 2003. Root caps and rhizosphere Journal of Plant Growth Regulation 21 : 352-367

Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X. 2000. The role of root border cells in plant defense. Trends in Plant Science 5, 128-133.

Hawes MC, Brigham LA, Wen F, Woo HH, Zhu Y. 1998. Function of Root Border Cells in Plant Health: Pioneers 1 in the Rhizosphere. Annual review of phytopathology 36: 311–327 Hélias V. 2008. Pectobacterium spp. et Dikeya spp. de la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour Erwinia spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie. Cahier Agriculture 17 : 349-54.

Hélias V, Andrivon D, Jouan B. 2000. Development of symptoms caused by *Erwinia carotovorasubsp. atroseptica* under field conditions and effects of these symptoms on the yield of individual potato plants. Plant Pathology 49 : 23-32

Henry G, Thonart P, Ongena M. 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. 16: 257-268

Hijazi M, Velasquez SM, Jamet E, Estevez JM, Albenne C. 2014. An update on posttranslational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. Frontiers in Plant Science 14 : 5:395

Hückelhoven R. 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. Annual review of phytopathology 45: 101-127

Ι

Ishii T., Matsunaga T., Hayashi N. 2001. Formation of Rhamnogalacturonan II-Borate Dimer in Pectin Determines Cell Wall Thickness of Pumpkin Tissue. Plant Physiology 126: 1698–1705

\mathbf{J}

Jeandet P, Hébrard C, Deville MA, Cordelier S, Dorey S, Aziz A and Crouzet J. 2014. Deciphering the Role of Phytoalexins in Plant-Microorganism Interactions and Human Health. Molecules 19: 18033-18056

Jensen JK, Sorensen SO, Harholt J, Geshi N, Sakuragi Y, Moller I, Zandleven J, Bernal AJ, Jensen NB, Sorensen C, Pauly M, Beldman G, Willats WGT, Scheller HV. 2008. Identification of a xylogalacturonan xylosyltransferase involved in pectin biosynthesis in Arabidopsis. Plant Cell 20: 1289-1302 Jones D.L, Hodge A, Kuzyakov Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. New Phytologist 163: 459e480

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

Jones JL, Singer LV. 2001. Fluorescence microplate-based assay for tumor necrosis factor activity using SYTOX green stain. Analytical Biochemistry 293: 8–11

Josenhans C, Suerbaum S. 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. 291 : 605-14

Josè-Estanyol, M and Puigdomènech, P. 1998. Developmental and hormonal regulation of genes coding for proline-rich proteins in female inflorescences and kernels of maize. Plant Physiology., 116 : 485–494.

Jourdan E, Ongena M, Thonart P. 2008. Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement 12 : 437-449

K

Keegstra K. 2010. Plant cell walls. Plant physiology 154: 483-6

Kieliszewski MJ, Shpak E. 2001. Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins. Cellular and Molecular Life Sciences 58: 1386–1398

Kieliszewski MJ, O'Neill M, Leykam J, Orlando R. 1995. Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from a hydroxyproline-rich plant cell wall glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline O-arabinosylation. The Journal of Biological Chemistry 10: 2541-9.

Kieliszewski MJ, Lamport DTA. 1994. Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. The Plant Journal 5: 157–172

Kieliszewski M, de Zacks R, Leykam JF, Lamport DT. 1992. A repetitive proline-rich protein from the gymnosperm douglas fir is a hydroxyproline-rich glycoprotein. Plant Physiol. 98: 919-26.

Kimura S, Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, C.R., and Brown, R.M. 1999. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant Vigna angularis. Plant Cell. 11: 2075–2086

Knapp S. 2002. Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspectives on fruit diversity in the Solanaceae. Journal of Experimental Botany 53:2001-2022

Knee EM, Gong FC, Gao M, Teplitski M, Jones AR, Foxworthy A, Mort AJ, Bauer WD. 2001. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. Molecular Plant-Microbe Interactions 14: 775-84.

Kotchi, Serge Olivier. 2004. Détection du stress hydrique par thermographie infrarouge. Application à la culture de la pomme de terre, Mémoire de maîtrise en Sciences Géomatiques, Université de Laval, Canada

Knoch E, Dilokpimol A, Geshi N. 2014. Arabinogalactan proteins: focus on carbohydrate active enzymes. Frontiers in Plant Science 11: 5:198

Kröner A, Hamelin G, Andrivon D, Val F. 2011. Quantitative resistance of potato to Pectobacterium atrosepticum and Phytophthora infestans: integrating PAMP-triggered response and pathogen growth. PLoS One 6 : e23331

L

Lamport DTA, Katona L and Roerig S. 1973. Galactosylserine in extensin. Journal of Biochemistry. 133: 125–131

Lanoue A, Burlat V, Henkes G.J, Koch I, Schurr U, Rose, U.S.R. 2010. De novo biosynthesis of defense root exudates in response to Fusarium attack in barley. New Phytol. 185:577e558

Latour X, Faure D, Diallo S, Cirou A, Smadja B, Dessaux Y, Orange N. 2008. Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux Pectobacterium spp. (Erwinia carotovora). Cahiers Agricultures 17, 355–360.

Leborgne-Castel N, Adam T. and Bouhidel K. 2010. Endocytosis in plant-microbe interactions. Protoplasma 247: 177-193

LeGoff A, Renard C.M.G.C, Bonnin E, Thibault J.F. 2001. Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. Carbohydrates. Polymers. 45: 325–334

Lerouxel O, Cavalier DM, Liepman AH, Keegstra K. 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides: a complex process. Current Opinion in Plant Biology. 9: 621-630

Lilley CJ, Wang D, Atkinson HJ, Urwin PE. 2011. Effective delivery of a nematoderepellent peptide using a root-cap-specific promoter. Plant Biotechnology Journal 9 : 151-61

Lohou David, Lonjon Fabien, Genin Stéphane and Vailleau Fabienne. 2013. TypeIII chaperones & Co in bacterial plant pathogens: a set of specialized bodyguards mediating effector delivery. Frontiers in Plant Science 4: 431-1

\mathbf{M}

Ma W, Muthreich N, Liao C, Franz-Wachtel M, Schütz W, Zhang F, Hochholdinger F, Li C. 2010. The mucilage proteome of maize (Zea mays L.) primary roots. Journal of Proteome Research 9: 2968–2976.

Mae A, Montesano M, Koiv V, Palva ET. 2001. Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen Erwinia carotovora. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal 14:1035-42.

Marzec M, Szarejko I, Melzer M. 2014. Arabinogalactan proteins are involved in root hair development in barley. Journal of Experimental Botany 66: 1245-57

Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 13 : 614-29

McCann HC, Nahal H, Thakur S, Guttman DS. 2012. Identification of innate immunity elicitors using molecular signatures of natural selection. Proceedings of the National Academy of Sciences 109: 4215–4220

McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. 2012. ntravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. Cell Host & Microbe 12: 324-33

McNeil M, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. Annual review of biochemistry 53: 625–663

McNeil M., Darvill A.G, and Albersheim, P. 1982. Structure of plant cell walls. Identification of seven glycosyl residues attached to O-4 of the 2-4 linked L-rhamnosyl residues of rhamnogalacturonan I. Plant Physiology 70: 1586–1591

Mehle N, Kovač M, Petrovič N, Pompe M, Baebler S, Stres HK, Gruden K, Ravnikar M. 2004. Spread of potato virus Y^{NTN} in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. Physiological and Molecular Plant Pathology 64: 293–300

Millet YA, Danna CH, Clay NK, Songnuan W, Simon MD, Werck-Reichhart D, Ausubel FM. 2010. Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbeassociated molecular patterns. Plant Cell 22: 973–990.

Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. Current in Opinion Plant Biology 11:266-77

Mollet JC, Kim S, Jauh GY, Lord EM. 2002. Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. Protoplasma. 219: 89-98

Moody SF, Clarke AE, Bacic A. 1988. Structural analysis of secreted slime from wheat and cowpea roots. Phytochemistry 27 : 2857-2861.

Muthamilarasan M and Prasad M. 2013. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. Journal of Biosciences 382:433-49

Ν

Nakamura A, Furuta H, Maeda H, Takao T, Nagamatsu Y. 2002. Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 66: 1155–1158

Nardi S, Concheri G, Pizzeghello D, Sturaro A, Rella R, Parvoli ., 2000. Soil organic matter mobilization by root exudates. Chemosphere 5 : 653e658

Nguema-Ona E, Vicré-Gibouin M, Gotté M, Plancot B, Lerouge P, Bardor M, Driouich A. 2014. Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. Frontiers in Plant Science 2 : 5-499

Nguema-Ona E, Vicré-Gibouin M, Cannesan M-A, Driouich A. 2013. Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions. Trends in plant science 18: 440-449

Nguema-Ona E, Coimbra S, Vicre-Gibouin M, Mollet J-C, Driouich A. 2012. Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. Annals of Botany 110 : 383–404

0

O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG. 2004. Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. Annual Review of Plant Biology 55: 109-139

O'Neill, MA., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G., Albersheim, P. 1996. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. The Journal of Biological Chemistry 271: 22923-22930

Oechslin R, Lutz M.V and Amado R. 2003. Pectic substances isolated from apple cellulosic residue: Structural characterization of a new type of rhamnogalacturonan I. Carbohydrate Polymers, 51: 301–310

Ogawa-Ohnishi M and Matsubayashi Y. 2015. Identification of three potent hydroxyproline O-galactosyltransferases in Arabidopsis. Plant Journal 81: 736-46

Oikawa A, Lund CH, Sakuragi Y, Scheller HV. 2013. Golgi-localized enzyme complexes for plant cell wall biosynthesis. Trends Plant in plant Science 18:49-58

Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, Santiago-Valentin E, Garcia VF, Collier SM. 2008. A molecular phylogeny of the Solanaceae. Taxon 57:1159-1181

Ortiz R, Simon P, Jansky S and Stelly D. 2009. Ploidy manipulation of the gametophyte, endosperm and sporophyte in nature and for crop improvement: a tribute to Professor Stanley J. Peloquin (1921–2008). Annals of Botany 104 : 795-80

Pareira AM, Simona Masiero, Margarida Sofia Nobre1, Mário Luís Costa, María-Teresa Solís, Pilar S. Testillano, Stefanie Sprunck, Coimbra S. 2014. Arabinogalactan proteins: rising attention from plant biologists. Plant Reproduction 28:1-15

Pel MJ, Pieterse CM. 2013. Microbial recognition and evasion of host immunity. Journal of Experimental Botany 64: 1237-48

Pérombelon MCM. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. Plant Pathology 51: 1–12

Pérombelon MCM and Kelman A. 1987. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot erwinias: a proposal for a revision of the terminology. Plant Disease 71: 283–5.

Pérombelon MCM and Kelman A. 1980 Ecology of the soft rot erwinias. Annual Review of Phytopathology 18: 361–87.

Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN. 2012. Control of Arabidopsis Root Development. Annual Review of Plant Biology 63: 563–590

Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2009. Hormonal Modulation of Plant Immunity. Annual Review of Cell and Developmental Biology 28: 489–521

Plancot B, Santaella C, Jaber R, Kiefer-Meyer MC, Follet-Gueye ML, Leprince J, Gattin I, Souc C, Driouich A, Vicré-Gibouin M. 2013. Deciphering the response of borderlike cells of *Arabidopsis thaliana* and *Linum usitatissimum* to pathogen-derived elicitors. Plant Physiology 163, 1584-1597

Priou S and Jouan B. 1996. Les maladies provoquées par les bactéries pathogenes du genre Erwinia. In Rousselle P, Robert P, and Crosnier JC eds, La pomme de terre. INRA Editions, Paris, France. p. 260–265

Puhlmann J, Bucheli E, Swain MJ, Dunning N, Albersheim P, Darvill AG, Hahn MG. 1994. Generation of monoclonal antibodies against plant cell-wall polysaccharides. I. Characterization of a monoclonal antibody to a terminal alpha-(1-->2)-linked fucosylcontaining epitope. Plant Physiology 104 : 699-710 Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënne-Loccoz Y. 2008. The rhizosphere: a playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganisms. Plant soil 321, 1-2, pp 341-361

Ribeiro JM, Pereira CS, Soares NC, Viera AM, Feijó JA, Jackson PA. 2006. The contribution of extension network formation to rapid, hydrogen peroxide-mediated increases in grapevine callus wall resistance to fungal lytic enzymes. Journal of Experimental Botany 57: 2025–2035

Ridley BL., O'Neill MA, Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. Phytochemistry 57: 929-967

Rodger S, Bengough AG, Griffiths BS, Stubbs V, and Young IM. 2003. Does the Presence of Detached Root Border Cells of Zea mays Alter the Activity of the Pathogenic Nematode Meloidogyne incognita? Phytopathology 93 : 1111-1114

Rodríguez-Concepción, M., Pérez-García, A. and Beltrán, J.P. 2001. Up-regulation of genes encoding novel extracellular proteins during fruit set in pea. Plant Mol. Biol., 46, 373–382.

Rose JKC. 2003. The Plant Cell Wall. Department of Plant Biology Cornell University Ithaca, New York USA. Blackwell Publishing CRC Press

Rost TL. 2010. The organization of roots of dicotyledonous plants and the positions of control points. Annals of Botany 107: 1213–1222

Rumyantseva NI. 2005. Arabinogalactan proteins: involvement in plant growth and morphogenesis. Biochemistry. 70:1073-85

S

Sanabria NM, Huang JC, Dubery IA. 2010. Self/nonself perception in plants in innate immunity and defense. Self/Nonself 1:40-54

Saubeau G, Gaillard F, Legentil L, Nugier-Chauvin C, Ferrières V, Andrivon D, Val F. 2014. Identification of three elicitins and a galactan-based complex polysaccharide from a

concentrated culture filtrate of Phytophthora infestans efficient against Pectobacterium atrosepticum. Molecules 19: 15374-90

Scheller HV, Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. Annual Review of Plant Biology 61: 263–289

Scheller HV, Jensen JK, Sorensen SO, Harholt J, Geshi N .2007. Biosynthesis of pectin. Physiologia Plantarum 129: 283-295

Schneiderbauer A, Back E, Sandermann H, Ernst D. 1995. Ozone induction of extensin mRNA in Scots pine, Norway spruce and European beech. New Phytologist 130: 225–230

Schreiber C, Slusarenko AJ, and Schaffrath U. 2011. Organ identity and environmental conditions determine the effectiveness of non-host resistance in the interaction between *Arabidopsis thaliana* and *Magnaporthe oryzae*. Molecular Plant Pathology12, 397–402

Schultz CJ, Rumsewicz MP, Johnson KL, Jones BJ, Gaspar YM, Bacic A. 2002. Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. Plant Physiology 129:1448-63

Schultz CJ, Johnson K, Currie G. and Bacic A. 2000. The classical arabinogalactan protein gene family of Arabidopsis. Plant Cell, 12, 1–18.

Schultz C.J., Gilson, P., Oxley, D., Youl, J.J. and Bacic, A. 1998. GPI-anchors on arabinogalactanproteins: implications for signalling in plants. Trends in Plant Science 3: 426–431

Schumann, G. L. and C. J. D'Arcy. 2000. Late blight of potato and tomato. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0724-01.

Schoonbeek Henk-jan, Wang Hsi-Hua, Stefanato Francesca Craze Melanie, Bowden Sarah, Wallington Emma, Zipfel Cyril and Ridout J Christopher.2015. Arabidopsis EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. New Phytologist 206: 606–613

Schlink K. 2009. Down-regulation of defense genes and resource allocation into infected roots as factors for compatibility between Fagus sylvatica and Phytophthora citricola. Functional & Integrative Genomics 10: 253-64

Seifert GJ & Roberts K. 2007. The biology of arabinogalactan proteins. Annual Review of Plant Biology. 58: 137-161

Sherrier DJ, Prime TA. and Dupree P. 1999. Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell surface proteins from Arabidopsis. Electrophoresis 20: 2027–2035.

Showalter AM, Keppler B, Lichtenberg J, Gu D, Welch LR. 2010. A Bioinformatics Approach to the Identification, Classification, and Analysis of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins. Plant Physiology 153: 485–513

Showalter AM. 2001 Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. Cellular and Molecular Life Sciences, 58 : 1399–1417.

Sidikou Ramatou. 2002. Contribution des Biotechnologies Végétales à l'adaptation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) au Niger.

Smadja B, Latour X, Trigui S, Burini JF, Chevalier S, Dessaux Y, Orange N. 2004a. Involvement of N-Acylhomoserine lactones througouht plant infection by Erwinia caratovora subsp. atroseptica (Pectobacterium atrosepticum). Molecular Plant-Microbe Interactions Journal 17: 1269-1278.

Smallwood M, Martin H, and Knox JP. 1995. An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma-membrane glycoproteins. Planta 196 : 510-522

Smallwood, M., Beven, A., Donovan, N. et al. 1994. Localization of cell wall proteins in relation to the developmental anatomy of the carrot root apex. Plant Journal 5 : 237–246.

Somerville C. 2006. Cellulose Synthesis in Higher Plants. Annual Review of Cell and Developmental Biology 22: 53–78

Sreekanta Suma, Bethke Gerit, Hatsugai Noriyuki, Tsuda Kenichi, Thao Amanda, Wang Lin, Katagiri Fumiaki and Glazebrook Jane. 2015. The receptor-like cytoplasmic kinase PCRK1 contributes to pattern-triggered immunity against Pseudomonas syringae in Arabidopsis thaliana. New Phytologist 207: 78–90

Sumby P, Barbian KD, Gardner DJ, Whitney AR, Welty DM, Long RD, Bailey JR, Parnell MJ, Hoe NP, Adams GG, DeLeo FR, Musser JM. 2005. Extracellular DNase made by group A Streptococcus assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. Proceedings of the National Academy of Sciences 102:1679-1684

Т

Tan L, Varnai P, Lamport DTA, Yuan C, Xu J, Qiu F, Kieliszewski MJ. 2010. Plant O-Hydroxyproline Arabinogalactans Are Composed of Repeating Trigalactosyl Subunits with Short Bifurcated Side Chains. Journal of Biological Chemistry 285: 24575–24583

Tan L, Qiu F, Lamport DT, Kieliszewski MJ. 2004. Structure of a hydroxyproline (Hyp)-arabinogalactan polysaccharide from repetitive Ala-Hyp expressed in transgenic Nicotiana tabacum. The Journal of Biological Chemistry 279: 13156-65

Timotiwu PB, Sakurai N. 2002. Identification of mono-, oligo-, and polysaccharides secreted from soybean roots. Journal of Plant Research 115: 77-85

Torres MA. 2010. ROS in biotic interactions. Plant Physiology 4:414-29

Trdá Lucie, Boutrot Freddy, Claverie Justine, Brulé Daphnée, Dorey Stephan and Poinssot Benoit. 2015. Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptor in the frontline. Frontiers in Plant Science 6: 219

Tyler Brett M. 2002. Molecular basis of recognition between phytophthora pathogens and their hosts. Annual Review of Phytopathology 40 : 137-67

U

Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms. 2006. Cell Microbiology 8: 668-676.

V

Vanderhofstadt B and Jouan B. 2009. Guide technique de la culture de la pomme de terre en Afrique de l'Ouest. Centre pour le Développement de l'Entreprise. Union Européenne, Hoegaarden, Belgium, 82 p

Vasquez-Robinet C, Mane SP, Ulanov AV, Watkinson JI, Stromberg VK, De Koeyer D, Schafleitner R, Willmot DB, Bonierbale M, Bohnert HJ, Grene R. 2008. Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. Journal of Experimental Botany 59: 2109-23

Verhertbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Ordaz-Ortiz JJ, Knox JP. 2009. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. Carbohydrate Research 344:1858-62

Visser Richard GF, Bachem Christian WB, Christian W. B. Bachem, Jan M. de Boer, Glenn J. Bryan, Swarup K. 2009. Sequencing the Potato Genome: Outline and First Results to Come from the Elucidation of the Sequence of the World's Third Most Important Food Crop. American Journal of Potato Research 86: 417-429

Vicré M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A. 2005. Root border-like cells of Arabidopsis: microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. Plant Physiology 138, 998–1008.

Vincken JP, Schols H.A, Oomen R.J, Beldman F.J, Visser G, R.G.F, and Voragen A.G.J. 2003. "Pectin–the hairy thing," in Advances in Pectin and Pectinase Research, eds A.G. J. Voragen, H.ScholsandR. Visser (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), 47–59

Vorwerk S, Somerville S, Somerville C. 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. Trends in Plant Sciences. 9: 203-9

W

Walker TS, Bais HP, Halligan KM, Stermitz FR, Vivanco JM. 2003. Metabolic profiling of root exudates of Arabidopsis thaliana. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 2548-54

Wang Y, Lin A, Loake GJ, Chu C .2013. H₂O₂ -induced Leaf Cell Death and the Crosstalk of Reactive Nitric/Oxygen Species. Journal of Integrative Plant Biology 55: 202–208

Watson BS, Bedair MF, Urbanczyk-Wochniak E, Huhman DV, Yang DS, Allen SN, Li W, Tang Y, Sumner LW. 2015. Integrated Metabolomics and Transcriptomics Reveal Enhanced Specialized Metabolism in Medicago truncatula Root Border Cells. Plant Physiology 167:1699-716

Weese TL and Bohs L 2007. A three gene phylogeny of the genus Solanum (Solanaceae). Systematic Botany 32:445-463

Wen F, Van Etten H. D, Tsaprailis G, Hawes MC. 2007. Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. Plant Physiology 143: 773–783.

Wen F, White GJ, VanEtten HD, Xiong Z, Hawes MC. 2009. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. Plant Physiology 151: 820–829.

Willats WGT, McCartney L, Steele-King CG, Marcus SE, Mort A, Huisman M, Van Alebeek GJ, Schols HA, Voragen AGJ, Le Goff A, Bonnin E, Thibault JF, Knox JP. 2004. A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment. Planta 218: 673-681

Wolf S, Mouille G and Pelloux J. 2009. Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development Molecular Plant 2: 851–860

Workshop to commemorate the international year of potat – 2008 Bangkok, Thailand, 6 May 2008

Wu L, Chen H, Curtis C and Fu ZQ. 2014. Go in for the kill, Virulence, 5: 710-721,

Wyrsch Ines, Dominguez-Ferreras Ana, Geldner Niko and Boller Thomas. 2015. Tissue-specific FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) expression in roots restores immune responses in Arabidopsis fls2 mutants. New Phytologist 206: 774–784

X

Xie F, Williams A, Edwards A, Downie JA. 2012. A Plant Arabinogalactan-Like Glycoprotein Promotes a Novel Type of Polar Surface Attachment by Rhizobium leguminosarum. Molecular Plant-Microbe Interactions 25: 250–258

Xie D, Ma L, Šamaj J, Xu C. 2011. Immunohistochemical analysis of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins in the roots of resistant and susceptible wax gourd cultivars in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. Benincasae infection and fusaric acid treatment. Plant Cell Reports 30, 1555–1569

Yaganza ES, Tweddell RJ, Arul J. 2014. Postharvest application of organic and inorganic salts to control potato (Solanum tuberosum L.) storage soft rot: plant tissue-salt physicochemical interactions. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 62, 9223-31

Yates EA, Valdor JF, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W, Knox JP. 1996. Characterization of carbohydrate structural features recognized by antiarabinogalactanprotein monoclonal antibodies. Glycobiology 6 : 131-139.

Yao J and Allen C. 2006. Chemotaxis is required for Virulence and Competitive Fitness of the Bacterial Wilt Pathogen Ralstonia solanacearum. JOURNAL OF BACTERIOLOGY p. 3697–3708

Yariv J, Lis H, Katchalski E. 1967. Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. Biochemical Journal 105: 1C–2C

Yazawa T, Kawahigashi H, Matsumoto T, Mizuno H. 2013. Simultaneous Transcriptome Analysis of Sorghum and Bipolaris sorghicola by Using RNA-seq in Combination with De Novo Transcriptome Assembly. PLoS ONE 8: e62460

Young RL, Malcolm KC, Kret JE, Caceres SM, Poch KR, Nichols DP, Taylor-Cousar JL, Saavedra MT, Randell SH, Vasil ML, Burns JL, Moskowitz SM, Nick JA. 2011. Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of Pseudomonas aeruginosa: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. PLoS One 6(9)

Ζ

Zandleven J, Sørensen SO, Harholt J, Beldman G, Schols HA, Scheller HV, Voragen AJ. 2007. Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of Arabidopsis thaliana. Phytochemistry. 68:1219-26

Zandleven, J, Beldman, G, Bosveld M, Schols H.A, Voragen A. 2006. Enzymatic degradation studies of xylogalacturonans from apple and potato, using XGH. Carbohydrates. Polymers. 65: 495–503

Zhang Yan, Chen Bo, Gao Shibin and Rong Tingzhao. 2014. Biological Characters of Root Border Cells Development in Maize (*Zea mays*). Biotechnology 13:89-98

Y

NETOGRAPHIE

- ONU, 2013 http://esa.un.org/wpp/Documentation/pdf/WPP2012_Press_Release.pdf
- FAO, 2008 http://www.fao.org/potato-2008/fr/
- FAO, 2012 http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx

ANNEXES

Annexe 1 : Scripts en codage R 195
Annexe 2 : Séquences de HRGPs d'A. <i>thaliana</i>
Tableau A2.1 : Identification des AGPs d'A. thaliana grâce au pourcentage des acidesaminés P-A-S-T et des motifs répétés AP, PA, SP, TP
Tableau A2.2 : Identification des Extensines d'A. thaliana grâce au nombre des motifs SPPP, SPPPP et SPPPP. 203
Tableau A2.3 : Identification des Proline-rich Proteins (PRPs) d'A. thaliana à travers le
pourcentage des acides aminés P-V-K-C-Y-T ainsi que des motifs répétés KKCPP et PPVX[K,T] et PPV
Annexe 3 : Séquences de HRGPs de S. tuberosum
Tableau A3.1 : Identification des AGPs de S. tuberosum grâce au pourcentage des acidesaminés P-A-S-T et des motifs répétés AP, PA, SP, TP
Tableau A3.2 : Identification des Extensines de S. tuberosum grâce au nombre des motifs SPPP, SPPPP et SPPPP. 216
Tableau A3.3 : Identification des Proline-rich Proteins (PRPs) à travers le pourcentage des
acides aminés P-V-K-C-Y-T ainsi que des motifs repetés KKCPP et PPVX[K,T] et PPV
Annexe 4 : Article 2, soumis à Developmental Cell
The homeotic MADS-domain factor SEEDSTICK controls cell wall structure for the proper development of seeds
Annexe 5 : Article 3 (Revue) publié dans Plant Science Today (2015) Erreur ! Signet non
défini.

O-glycosylation in plant and mammal cells: the use of chemical inhibitors to understand the biosynthesis and function of O-glycosylated proteins Erreur ! Signet non défini.

Annexe 1 : Scripts en codage R

Script AGP

```
SCRIPT-AGP
Library (seginr)
b <- read.fasta("BD1.fasta", seqtype = "AA", as.string = TRUE)
res=class=nbAP=nbPA=nbSP=nbTP=c()
for(i in 1:length(b))
{
        length(words.pos("P", b[[i]])) + length(words.pos("A",
cpt
     =
                                                             b[[i]]))
                                                                     +
length(words.pos("S", b[[i]])) + length(words.pos("T", b[[i]]))
res[i] = cpt / getLength(b[[i]])*100
if (res[i] >= 50)
{
class[i]="AGP"
} else if (res[i] >= 35 && res[i] <50 && getLength(b[[i]]) <90 && getLength(b[[i]])</pre>
>50)
{
class[i]="AGPeptide"
} else {
class[i]="EXT"
}
nbAP[i] = length(words.pos("AP", b[[i]]))
nbPA[i] = length(words.pos("PA", b[[i]]))
nbSP[i] = length(words.pos("SP", b[[i]]))
nbTP[i] = length(words.pos("TP", b[[i]]))
S=data.frame(Name=getName(b),Classe=class,PAST=res,nbAP=nbAP,nbPA=nbPA,nbS
P=nbSP,nbTP=nbTP)
write.table(S,file="Tableau_AGP.txt",sep="\t",row.names=FALSE,col.names=TR
UE)
```

Script ExT

#######################################	SCRIPT-EXT

library (seqinr)	
b <- read.fasta("BD1.fasta", seqtype = "AA", as.string = TRUE)	
class=nbSPPP=nbSPPPP=nbSPPPPP=nbYVY=c()	
for(i in 1:length(b))	
nbSPPP[i] = length(words.pos("SPPP", b[[i]]))	
nbSPPPP[i] = length(words.pos("SPPPP", b[[i]]))	
nbSPPPPP[i] = length(words.pos("SPPPPP", b[[i]]))	
nbYVY[i] = length(words.pos("YVY", b[[i]]))	
<pre>if (nbSPPP[i] >= 2 && getLength(b[[i]]) >200) { class[i] = "EXTs1"</pre>	
<pre>} else if (nbSPPPP[i] >= 2 && getLength(b[[i]]) >200) { class[i] = "EXTs2"</pre>	
<pre>} else if (nbSPPPPP[i] >= 2 && getLength(b[[i]]) >200) { class[i] = "EXTs3"</pre>	
<pre>} else if ((nbSPPP[i] >= 2 nbSPPPP[i] >= 2 nbSPPPPP[i] >= 2) && get <200) {</pre>	tLength(b[[i]])
} else {	
class[i] = "Autres" } } S=data.frame(Name=getName(b),Classe=class,nbSPPP=nbSPPPp,nbSPPPP=n PPPP=nbSPPPPp,nbYVY=nbYVY)	bSPPPP,nbSP
write.table(S,file=''Tableau_EXT.txt'',sep=''\t'',row.names=FALSE,col.na ####################################	ames=TRUE) #########

Script PRPs

```
SCRIPT-PRP
Library (seqinr)
b <- read.fasta("BD1.fasta", seqtype = "AA", as.string = TRUE)
res=class=nbKKPCPP=nbPPVXK.T=nbPPV=c()
for(i in 1:length(b))
{
          length(words.pos("P", b[[i]])) +
                                             length(words.pos("V",
                                                                    b[[i]]))
cpt
     =
                                                                             +
length(words.pos("K", b[[i]])) + length(words.pos("C", b[[i]])) + length(words.pos("Y",
b[[i]])) + length(words.pos("T", b[[i]]))
res[i] = cpt / getLength(b[[i]])*100
nbKKPCPP[i] = length(words.pos("KKPCPP", b[[i]]))
nbPPVXK.T[i] = length(words.pos("PPVXK", b[[i]])) + length(words.pos("PPVXT",
b[[i]]))
nbPPV[i] = length(words.pos("PPV", b[[i]]))
tmp=0
if (res[i] >= 45)
{
 class[i]="PRPs1"
 tmp=1
}
if (nbKKPCPP[i] >= 2)
 if(length(class[i])==0)
 {
  class[i]="PRPs2"
  tmp=1
 } else {
  class[i]=paste(class[i],"PRPs2",sep=",")
  tmp=1
 }
if (nbPPVXK.T[i] >= 2)
Ł
 if(length(class[i])==0)
 {
  class[i]="PRPs3"
  tmp=1
 } else {
  class[i]=paste(class[i],"PRPs3",sep=",")
  tmp=1
 }
}
if (tmp==0)
class[i]="Autre"
}
S=data.frame(Name=getName(b),Classe=class,PVKCYT=res,nbKKPCPP=nbKKPCPP,n
bPPVXK.T=nbPPVXK.T,nbPPV=nbPPV)
write.table(S,file="Tableau_PRP.txt",sep="\t",row.names=FALSE,col.names=TRUE)
```
Annexe 2 : Séquences de HRGPs d'A. thaliana

Identifiant	Classe	% PAST	AP	ΡΑ	SP	ТР
AT1G15825.1	AGP	50	1	1	1	5
AT1G23720.1	AGP	62	2	7	133	3
AT1G26240.1	AGP	63	0	0	47	0
AT1G26250.1	AGP	61	4	4	42	2
AT1G63540.1	AGP	51	9	15	21	7
AT1G35230.1	AGP	63	8	5	7	2
AT1G62760.1	AGP	51	2	0	21	0
AT1G63530.1	AGP	50	3	12	7	6
AT1G44191.1	AGP	56	0	0	32	11
AT1G31250.1	AGP	54	1	2	10	8
AT1G68725.1	AGP	68	19	19	16	5
AT1G36150.1	AGP	54	1	4	20	4
AT2G22470.1	AGP	63	8	5	6	4
AT2G43150.1	AGP	60	0	1	22	1
AT2G24980.1	AGP	57	1	0	81	3
AT2G28671.1	AGP	52	18	19	1	3
AT2G23130.2	AGP	59	13	12	10	5
AT2G27390.1	AGP	55	0	2	5	1
AT2G28440.1	AGP	50	5	5	28	0
AT2G45000.1	AGP	57	15	14	14	16
AT2G14890.2	AGP	75	9	11	13	7
AT2G27380.1	AGP	60	1	0	42	43
AT2G23130.1	AGP	56	13	12	10	5
AT2G22510.1	AGP	54	0	2	0	3
AT2G47930.1	AGP	53	2	2	7	3
AT2G40070.2	AGP	50	6	8	10	13
AT2G14890.1	AGP	71	9	11	13	7
AT3G60280.1	AGP	50	2	2	9	7
AT3G22070.1	AGP	57	4	3	7	3
AT3G28550.1	AGP	58	3	2	154	2
AT3G01700.1	AGP	61	7	3	6	2
AT3G06360.1	AGP	53	3	3	5	0

Tableau A2.1 : Identification des AGPs d'A. thaliana grâce au pourcentage des acidesaminés P-A-S-T et des motifs répétés AP, PA, SP, TP.

Identifiant	Classe	% PAST	AP	ΡΑ	SP	ТР
AT3G22120.1	AGP	55	1	4	1	32
AT3G22142.1	AGP	68	3	14	25	140
AT3G54580.1	AGP	60	2	1	143	2
AT3G54590.1	AGP	58	1	1	103	2
AT3G43431.1	AGP	51	0	1	3	0
AT3G27416.1	AGP	67	6	5	12	4
AT4G22505.1	AGP	68	18	0	37	36
AT4G08400.1	AGP	57	0	0	69	6
AT4G11430.1	AGP	57	0	6	4	3
AT4G08410.1	AGP	56	1	0	95	6
AT4G08370.1	AGP	52	7	0	22	1
AT4G13390.1	AGP	54	1	1	51	4
AT4G27520.1	AGP	52	10	4	20	4
AT4G22470.1	AGP	50	2	9	10	11
AT4G09030.1	AGP	65	6	4	5	8
AT4G16980.1	AGP	54	3	1	8	4
AT4G18670.1	AGP	50	2	8	63	21
AT4G08380.1	AGP	62	0	0	64	0
AT4G22485.1	AGP	66	1	1	17	82
AT5G19810.1	AGP	57	2	1	17	1
AT5G18690.1	AGP	50	1	0	9	0
AT5G47455.1	AGP	53	0	2	3	0
AT5G11740.1	AGP	50	2	1	1	0
AT4G37450.1	AGP	61	13	11	16	3
AT5G35190.1	AGP	52	1	1	41	3
AT5G06640.1	AGP	55	2	0	97	2
AT5G11990.1	AGP	51	0	0	12	2
AT5G53870.1	AGP	54	10	15	32	9
AT5G06630.1	AGP	57	1	1	61	3
AT5G14380.1	AGP	64	9	3	8	1
AT5G10430.1	AGP	72	8	11	4	9
AT5G14920.2	AGP	60	1	2	6	12
AT5G47455.2	AGP	50	0	2	3	0
AT5G47455.5	AGP	50	0	2	3	0
AT5G47455.3	AGP	50	0	2	3	0
AT5G14920.1	AGP	53	1	2	6	12
AT5G47455.6	AGP	53	0	2	3	0
AT5G26080.1	AGP	51	1	1	7	1

Identifiant	Classe	% PAST	AP	ΡΑ	SP	ТР
AT5G47455.7	AGP	53	0	2	3	0
AT4G40090.1	AGP	61	8	7	7	4
AT5G64310.1	AGP	59	7	8	12	1
AT5G65390.1	AGP	66	9	6	6	5
AT1G12665.1	AGPeptide	42	0	1	8	0
AT1G22890.1	AGPeptide	36	1	0	1	0
AT1G30250.1	AGPeptide	37	1	1	1	2
AT1G51915.1	AGPeptide	35	2	1	1	0
AT1G65510.1	AGPeptide	41	1	2	1	1
AT1G55330.1	AGPeptide	46	2	2	1	0
AT1G65500.1	AGPeptide	40	0	2	3	2
AT1G64561.1	AGPeptide	39	1	1	1	1
AT1G65490.1	AGPeptide	38	0	1	3	1
AT1G51920.1	AGPeptide	37	2	2	2	0
AT1G65486.1	AGPeptide	40	1	1	3	1
AT1G58235.1	AGPeptide	35	1	1	1	0
AT1G65486.2	AGPeptide	49	1	1	2	1
AT1G61570.1	AGPeptide	35	0	0	2	0
AT2G46330.2	AGPeptide	42	3	2	0	0
AT2G23120.1	AGPeptide	48	3	1	1	3
AT2G32190.2	AGPeptide	39	1	0	0	2
AT2G32190.1	AGPeptide	40	1	0	0	2
AT2G16835.1	AGPeptide	44	1	2	1	1
AT2G41905.1	AGPeptide	44	2	3	0	0
AT2G32210.1	AGPeptide	40	1	0	0	1
AT2G33690.1	AGPeptide	36	2	0	1	1
AT2G32200.1	AGPeptide	41	2	0	0	1
AT2G46330.1	AGPeptide	41	3	2	0	0
AT2G36881.1	AGPeptide	37	0	1	1	1
AT2G23440.1	AGPeptide	37	0	0	3	0
AT2G10340.1	AGPeptide	42	2	1	0	0
AT2G33847.2	AGPeptide	43	0	0	2	0
AT3G01730.1	AGPeptide	45	1	0	2	1
AT3G04390.1	AGPeptide	37	0	1	1	0
AT2G47720.1	AGPeptide	38	1	0	2	0
AT3G47295.1	AGPeptide	40	0	0	1	1
AT3G13520.1	AGPeptide	43	2	2	1	0
AT3G21352.1	AGPeptide	35	3	1	2	0

Identifiant	Classe	% PAST	АР	ΡΑ	SP	ТР
AT3G20865.1	AGPeptide	48	1	1	2	0
AT3G21351.1	AGPeptide	40	3	1	1	0
AT3G43574.1	AGPeptide	36	0	0	1	0
AT3G61640.1	AGPeptide	43	2	1	2	0
AT3G57690.1	AGPeptide	45	2	3	0	0
AT4G18510.1	AGPeptide	36	0	0	4	0
AT4G33145.1	AGPeptide	43	2	0	0	0
AT4G12731.1	AGPeptide	36	1	0	1	1
AT4G26320.1	AGPeptide	47	2	2	1	0
AT4G11870.1	AGPeptide	44	1	2	0	3
AT5G01075.1	AGPeptide	41	0	0	2	2
AT5G40730.1	AGPeptide	40	3	3	0	0
AT5G24105.1	AGPeptide	38	3	2	0	0
AT5G02550.1	AGPeptide	46	1	2	1	0
AT5G53250.1	AGPeptide	38	2	2	1	0
AT5G24165.1	AGPeptide	37	2	2	0	1
AT5G50361.1	AGPeptide	36	1	0	2	1
AT5G08760.1	AGPeptide	40	0	0	2	1
AT5G56540.1	AGPeptide	41	2	1	1	0
AT5G12880.1	AGPeptide	43	1	0	3	0
AT5G65609.1	AGPeptide	40	0	0	3	0

Identifiant	Classe	SPPP	SPPPP	SPPPPP	Υνγ
AT1G02405.1	shortEXTs	3	3	0	0
AT1G12665.1	shortEXTs	2	0	0	0
AT1G23040.1	shortEXTs	2	2	0	0
AT1G34000.1	shortEXTs	2	0	0	0
AT2G27390.1	shortEXTs	2	0	0	0
AT2G14890.2	shortEXTs	5	1	0	0
AT3G14480.1	shortEXTs	2	1	0	0
AT2G14890.1	shortEXTs	5	1	0	0
AT1G70990.1	shortEXTs	2	2	0	0
AT2G24590.1	shortEXTs	2	1	0	0
AT3G06750.1	shortEXTs	2	2	1	0
AT3G20850.1	shortEXTs	2	1	1	0
AT4G16140.1	shortEXTs	2	2	1	0
AT5G11990.1	shortEXTs	5	1	1	0
AT5G49280.1	shortEXTs	2	2	0	0
AT5G26080.1	shortEXTs	6	4	3	0
AT5G19800.1	shortEXTs	3	3	3	0
AT1G26240.1	EXTs1	43	41	40	39
AT1G26250.1	EXTs1	35	28	28	39
AT3G28550.1	EXTs1	73	70	0	35
AT3G54580.1	EXTs1	70	68	0	33
AT1G23720.1	EXTs1	66	64	3	31
AT4G08380.1	EXTs1	36	2	0	30
AT5G06640.1	EXTs1	44	42	0	24
AT4G08410.1	EXTs1	43	41	0	23
AT3G54590.1	EXTs1	49	47	0	22
AT2G24980.1	EXTs1	40	37	0	20
AT4G08400.1	EXTs1	33	31	0	16
AT5G06630.1	EXTs1	30	29	0	16
AT4G08370.1	EXTs1	17	14	13	15
AT1G21310.1	EXTs1	41	28	1	12
AT4G13390.1	EXTs1	22	22	8	9
AT1G12040.1	EXTs1	25	24	7	7
AT5G35190.1	EXTs1	16	14	2	7
AT3G22800.1	EXTs1	3	2	2	4

Tableau A2.2 : Identification des Extensines d'A. thaliana grâce au nombre des motifsSPPP, SPPPP et SPPPP.

Identifiant	Classe	SPPP	SPPPP	SPPPPP	YVY
AT2G43150.1	EXTs1	22	22	0	1
AT1G10620.1	EXTs1	2	0	0	0
AT1G16610.2	EXTs1	4	2	2	0
AT1G26150.1	EXTs1	7	3	1	0
AT1G20130.1	EXTs1	2	0	0	0
AT1G23540.1	EXTs1	3	2	0	0
AT1G20130.2	EXTs1	2	0	0	0
AT1G16610.3	EXTs1	4	2	2	0
AT1G16610.1	EXTs1	4	2	2	0
AT1G55310.2	EXTs1	2	0	0	0
AT1G49270.1	EXTs1	6	5	1	0
AT1G63550.1	EXTs1	2	0	0	0
AT1G62440.1	EXTs1	22	18	6	0
AT1G68690.1	EXTs1	14	6	2	0
AT1G49490.1	EXTs1	15	14	1	0
AT1G53645.1	EXTs1	2	2	0	0
AT1G55310.3	EXTs1	2	0	0	0
AT1G49750.1	EXTs1	3	1	0	0
AT1G63600.1	EXTs1	2	2	0	0
AT1G61080.1	EXTs1	2	0	0	0
AT1G55310.1	EXTs1	2	0	0	0
AT1G62760.1	EXTs1	4	2	2	0
AT1G70140.1	EXTs1	2	2	1	0
AT1G44191.1	EXTs1	12	7	0	0
AT1G68725.1	EXTs1	7	0	0	0
AT1G43900.1	EXTs1	2	0	0	0
AT1G77260.1	EXTs1	2	0	0	0
AT1G76930.1	EXTs1	17	9	0	0
AT2G20950.1	EXTs1	2	1	0	0
AT2G18470.1	EXTs1	2	1	1	0
AT3G13110.1	EXTs1	2	1	1	0
AT1G71880.1	EXTs1	2	0	0	0
AT1G76930.2	EXTs1	17	9	0	0
AT2G15880.1	EXTs1	27	25	9	0
AT2G34670.2	EXTs1	2	1	1	0
AT2G29210.1	EXTs1	4	0	0	0
AT2G20950.3	EXTs1	2	1	0	0
AT2G27100.1	EXTs1	2	2	1	0

Identifiant	Classe	SPPP	SPPPP	SPPPPP	YVY
AT2G20950.4	EXTs1	2	1	0	0
AT2G46020.1	EXTs1	2	0	0	0
AT2G34670.1	EXTs1	2	1	1	0
AT1G70460.1	EXTs1	7	4	2	0
AT2G27090.1	EXTs1	2	0	0	0
AT3G11385.1	EXTs1	2	0	0	0
AT3G03750.2	EXTs1	2	1	0	0
AT2G20950.2	EXTs1	2	1	0	0
AT2G46020.2	EXTs1	2	0	0	0
AT1G72790.1	EXTs1	2	1	1	0
AT3G47210.1	EXTs1	3	0	0	0
AT3G50580.1	EXTs1	4	3	1	0
AT3G53330.1	EXTs1	3	3	0	0
AT3G19430.1	EXTs1	7	7	0	0
AT3G53380.1	EXTs1	2	0	0	0
AT3G18810.1	EXTs1	4	3	2	0
AT3G03750.1	EXTs1	2	1	0	0
AT3G11030.1	EXTs1	5	5	0	0
AT3G15120.1	EXTs1	2	1	0	0
AT3G24480.1	EXTs1	6	4	3	0
AT3G19020.1	EXTs1	25	24	5	0
AT3G24550.1	EXTs1	3	0	0	0
AT3G24540.1	EXTs1	2	2	1	0
AT3G25500.1	EXTs1	3	1	0	0
AT4G00890.1	EXTs1	2	0	0	0
AT3G59550.1	EXTs1	2	0	0	0
AT4G22505.1	EXTs1	2	1	0	0
AT4G11430.1	EXTs1	4	2	2	0
AT4G33970.1	EXTs1	18	14	4	0
AT4G18760.1	EXTs1	2	0	0	0
AT4G22470.1	EXTs1	3	1	0	0
AT4G34440.1	EXTs1	2	0	0	0
AT4G13340.1	EXTs1	32	28	15	0
AT4G18670.1	EXTs1	11	8	6	0
AT4G22485.1	EXTs1	3	2	1	0
AT5G10550.1	EXTs1	2	0	0	0
AT5G19810.1	EXTs1	17	17	13	0
AT5G57070.1	EXTs1	2	2	2	0

Identifiant	Classe	SPPP	SPPPP	SPPPPP	Υνγ
AT5G54650.2	EXTs1	2	1	1	0
AT5G25550.1	EXTs1	2	1	1	0
AT5G07740.1	EXTs1	9	9	8	0
AT5G23150.1	EXTs1	4	2	1	0
AT5G58160.1	EXTs1	3	2	1	0
AT5G52040.3	EXTs1	3	0	0	0
AT5G21280.1	EXTs1	2	1	1	0
AT4G38550.1	EXTs1	3	1	0	0
AT5G38560.1	EXTs1	9	4	2	0
AT5G52040.2	EXTs1	3	0	0	0
AT5G07770.1	EXTs1	3	2	1	0
AT5G37630.1	EXTs1	2	0	0	0
AT5G52040.4	EXTs1	3	0	0	0
AT5G03140.1	EXTs1	2	0	0	0
AT5G08230.1	EXTs1	2	1	0	0
AT5G52040.1	EXTs1	3	0	0	0
AT5G07770.2	EXTs1	3	2	1	0
AT5G41460.1	EXTs1	2	1	1	0
AT5G15870.1	EXTs1	2	1	0	0
AT5G54650.1	EXTs1	2	1	1	0

Tableau A2.3 : Identification des Proline-rich Proteins (PRPs) d'A. *thaliana* à travers le pourcentage des acides aminés P-V-K-C-Y-T ainsi que des motifs répétés KKCPP et PPVX[K,T] et PPV

Identifiant	Classe	%PVKCYT	ККРСРР	PPVXK.T	PPV
AT2G21140.1	PRPs1,	51	4	0	7
	PRPs2				
AT4G38770.1	PRPs1,		7	0	14
	PRPs2	62			
AT1G02405.1	PRPs1	47	0	0	0
AT1G06760.1	PRPs1	49	0	0	0
AT1G12080.1	PRPs1	50	0	0	0
AT1G12665.1	PRPs1	46	0	0	0
AT1G07747.1	PRPs1	49	0	0	0
AT1G12040.1	PRPs1	47	0	0	7
AT1G09460.1	PRPs1	45	0	0	6
AT1G12080.2	PRPs1	48	0	0	0
AT1G15825.1	PRPs1	52	0	0	5
AT1G28290.1	PRPs1	64	0	0	18
AT1G23050.1	PRPs1	46	0	0	1
AT1G23720.1	PRPs1	75	0	0	0
AT1G21310.1	PRPs1	74	0	0	28
AT1G28290.2	PRPs1	60	0	0	13
AT1G26240.1	PRPs1	79	0	0	0
AT1G26250.1	PRPs1	79	0	0	0
AT1G54970.1	PRPs1	60	0	0	15
AT1G62480.1	PRPs1	46	0	0	0
AT1G44191.1	PRPs1	59	0	0	0
AT1G65845.1	PRPs1	45	0	0	0
AT1G68725.1	PRPs1	50	0	0	4
AT1G62500.1	PRPs1	47	0	0	8
AT1G77093.1	PRPs1	46	0	0	0
AT1G76930.1	PRPs1	53	0	0	16
AT2G23120.1	PRPs1	45	0	0	0
AT2G32190.1	PRPs1	45	0	0	1
AT2G43150.1	PRPs1	72	0	0	11
AT2G30620.1	PRPs1	52	0	0	0
AT2G24980.1	PRPs1	76	0	0	0
AT1G76930.2	PRPs1	57	0	0	16

Identifiant	Classe	%PVKCYT	ККРСРР	PPVXK.T	PPV
AT2G32210.1	PRPs1	46	0	0	1
AT2G15880.1	PRPs1	46	0	0	23
AT2G32200.1	PRPs1	45	0	0	1
AT2G27390.1	PRPs1	55	0	0	0
AT2G13295.1	PRPs1	45	0	0	0
AT2G10940.2	PRPs1	59	0	0	11
AT2G14890.2	PRPs1	56	0	0	7
AT2G27380.1	PRPs1	76	0	0	46
AT2G45180.1	PRPs1	48	0	0	0
AT2G33790.1	PRPs1	48	0	0	2
AT2G10940.1	PRPs1	59	0	0	11
AT2G14890.1	PRPs1	54	0	0	7
AT2G23171.1	PRPs1	47	0	0	0
AT2G30620.2	PRPs1	50	0	0	0
AT2G47530.1	PRPs1	50	0	0	0
AT3G62680.1	PRPs1	63	0	0	14
AT3G50580.1	PRPs1	47	0	0	0
AT3G22070.1	PRPs1	47	0	0	1
AT3G28550.1	PRPs1	75	0	0	0
AT3G19430.1	PRPs1	49	0	0	7
AT3G10974.1	PRPs1	56	0	0	0
AT3G20850.1	PRPs1	54	0	0	1
AT3G22120.1	PRPs1	70	0	0	7
AT3G22142.1	PRPs1	68	0	0	75
AT3G55280.1	PRPs1	48	0	0	0
AT3G54580.1	PRPs1	75	0	0	0
AT3G29633.1	PRPs1	48	0	0	0
AT3G53370.2	PRPs1	47	0	0	0
AT3G55280.3	PRPs1	46	0	0	0
AT3G54590.1	PRPs1	74	0	0	0
AT3G55280.2	PRPs1	48	0	0	0
AT4G22505.1	PRPs1	59	0	0	7
AT4G08400.1	PRPs1	71	0	0	0
AT4G11430.1	PRPs1	52	0	0	2
AT4G16380.2	PRPs1	45	0	0	0
AT4G08410.1	PRPs1	71	0	0	0
AT4G20260.4	PRPs1	45	0	0	0
AT4G20260.2	PRPs1	45	0	0	0

Identifiant	Classe	%PVKCYT	ККРСРР	PPVXK.T	PPV
AT4G08370.1	PRPs1	58	0	0	0
AT4G15160.1	PRPs1	66	0	0	1
AT4G16140.1	PRPs1	47	0	0	0
AT4G13390.1	PRPs1	68	0	0	0
AT4G08570.1	PRPs1	46	0	0	0
AT4G22470.1	PRPs1	48	0	0	1
AT4G13340.1	PRPs1	48	0	0	15
AT4G16380.1	PRPs1	49	0	0	0
AT4G20260.3	PRPs1	45	0	0	0
AT4G15160.2	PRPs1	54	0	0	1
AT4G08380.1	PRPs1	71	0	0	0
AT4G22485.1	PRPs1	64	0	0	2
AT4G20260.1	PRPs1	45	0	0	0
AT5G19810.1	PRPs1	58	0	0	13
AT5G46900.1	PRPs1	45	0	0	0
AT5G32597.1	PRPs1	48	0	0	0
AT4G37450.1	PRPs1	47	0	0	2
AT5G35190.1	PRPs1	66	0	0	0
AT5G06640.1	PRPs1	71	0	0	0
AT5G38160.1	PRPs1	48	0	0	0
AT5G52750.1	PRPs1	47	0	0	0
AT5G06630.1	PRPs1	75	0	0	0
AT5G10430.1	PRPs1	45	0	0	2
AT5G14920.2	PRPs1	72	0	0	9
AT5G49280.1	PRPs1	51	0	0	0
AT5G56330.1	PRPs1	46	0	0	0
AT5G14920.1	PRPs1	70	0	0	9
AT5G43770.1	PRPs1	48	0	0	0
AT5G42591.1	PRPs1	48	0	0	0
AT5G44610.1	PRPs1	50	0	0	0
AT5G38170.1	PRPs1	48	0	0	0
AT5G26080.1	PRPs1	55	0	0	1
AT5G19800.1	PRPs1	48	0	0	1
AT5G12880.1	PRPs1	45	0	0	1
AT5G55507.1	PRPs1	47	0	0	0
AT5G09530.1	PRPs1	51	0	0	0
AT4G40090.1	PRPs1	47	0	0	1
AT5G65390.1	PRPs1	46	0	0	1

Annexe 3 : Séquences de HRGPs de S. tuberosum

Identifiant	Classe	% PAST	AP	ΡΑ	SP	ТР
PGSC0003DMT400002053	AGP	53	1	1	39	6
PGSC0003DMT400002035	AGP	59	2	2	37	28
PGSC0003DMT400002054	AGP	53	1	1	39	6
PGSC0003DMT400002219	AGP	54	0	2	2	0
PGSC0003DMT400002036	AGP	60	1	1	37	28
PGSC0003DMT400002037	AGP	61	1	2	34	30
PGSC0003DMT400002040	AGP	60	8	8	26	11
PGSC0003DMT400002049	AGP	58	2	1	34	20
PGSC0003DMT400006086	AGP	60	3	4	110	6
PGSC0003DMT400009566	AGP	53	1	1	0	2
PGSC0003DMT400011909	AGP	55	2	4	54	3
PGSC0003DMT400017564	AGP	52	3	1	1	0
PGSC0003DMT400022121	AGP	57	1	2	2	19
PGSC0003DMT400021467	AGP	52	4	4	0	1
PGSC0003DMT400017727	AGP	50	0	0	1	1
PGSC0003DMT400011910	AGP	60	3	4	103	4
PGSC0003DMT400011908	AGP	62	5	7	110	2
PGSC0003DMT400015911	AGP	72	0	1	31	1
PGSC0003DMT400020126	AGP	60	2	1	17	96
PGSC0003DMT400035206	AGP	50	0	1	10	23
PGSC0003DMT400031460	AGP	54	32	62	2	0
PGSC0003DMT400030423	AGP	52	1	5	75	8
PGSC0003DMT400036637	AGP	51	2	6	32	9
PGSC0003DMT400032310	AGP	52	43	10	29	16
PGSC0003DMT400035207	AGP	50	0	1	10	23
PGSC0003DMT400034966	AGP	55	4	1	4	2
PGSC0003DMT400025342	AGP	66	23	12	11	11
PGSC0003DMT400026515	AGP	60	11	8	80	2
PGSC0003DMT400039755	AGP	52	10	12	20	14
PGSC0003DMT400034831	AGP	51	5	2	7	5
PGSC0003DMT400029233	AGP	53	0	0	5	3
PGSC0003DMT400032847	AGP	78	3	9	15	7
PGSC0003DMT400041800	AGP	71	8	9	10	10
PGSC0003DMT400045828	AGP	67	6	5	9	3

Tableau A3.1 : Identification des AGPs de S. tuberosum grâce au pourcentage des acidesaminés P-A-S-T et des motifs répétés AP, PA, SP, TP.

Identifiant	Classe	% PAST	AP	ΡΑ	SP	ТР
PGSC0003DMT400046319	AGP	59	0	0	29	2
PGSC0003DMT400045795	AGP	67	6	5	9	3
PGSC0003DMT400045794	AGP	68	5	4	11	3
PGSC0003DMT400044372	AGP	60	8	9	30	22
PGSC0003DMT400045796	AGP	69	6	4	10	3
PGSC0003DMT400047620	AGP	56	3	1	4	1
PGSC0003DMT400060620	AGP	55	0	1	2	0
PGSC0003DMT400055877	AGP	50	1	2	2	0
PGSC0003DMT400061751	AGP	55	3	2	4	1
PGSC0003DMT400064455	AGP	57	2	13	21	3
PGSC0003DMT400057388	AGP	63	8	8	17	5
PGSC0003DMT400060617	AGP	54	0	2	1	1
PGSC0003DMT400064602	AGP	63	18	12	8	10
PGSC0003DMT400060743	AGP	56	0	1	2	0
PGSC0003DMT400057996	AGP	51	1	3	37	8
PGSC0003DMT400062090	AGP	57	6	4	6	1
PGSC0003DMT400064215	AGP	62	25	18	10	6
PGSC0003DMT400065441	AGP	58	1	1	7	1
PGSC0003DMT400057997	AGP	53	2	5	35	6
PGSC0003DMT400065440	AGP	52	2	1	9	0
PGSC0003DMT400060746	AGP	55	0	2	2	0
PGSC0003DMT400055632	AGP	64	2	0	197	3
PGSC0003DMT400060618	AGP	57	0	3	1	1
PGSC0003DMT400061750	AGP	59	3	2	4	1
PGSC0003DMT400057425	AGP	51	2	2	4	1
PGSC0003DMT400057994	AGP	52	2	5	30	5
PGSC0003DMT400056764	AGP	50	1	4	3	1
PGSC0003DMT400054824	AGP	50	3	3	15	25
PGSC0003DMT400058818	AGP	54	3	3	0	0
PGSC0003DMT400065576	AGP	53	1	1	1	0
PGSC0003DMT400057995	AGP	52	1	4	28	6
PGSC0003DMT400061832	AGP	59	1	2	28	9
PGSC0003DMT400058003	AGP	50	2	6	32	6
PGSC0003DMT400064603	AGP	66	18	12	8	10
PGSC0003DMT400059918	AGP	59	3	3	0	0
PGSC0003DMT400057623	AGP	58	19	6	0	0
PGSC0003DMT400066177	AGP	71	19	20	12	11
PGSC0003DMT400067461	AGP	62	5	4	8	4
PGSC0003DMT400066741	AGP	51	3	3	35	7
PGSC0003DMT400066219	AGP	52	0	0	3	1

Identifiant	Classe	% PAST	ΑΡ	ΡΑ	SP	ТР
PGSC0003DMT400076373	AGP	57	11	18	25	13
PGSC0003DMT400076374	AGP	62	10	18	24	12
PGSC0003DMT400078197	AGP	63	3	4	44	9
PGSC0003DMT400081262	AGP	52	1	0	2	1
PGSC0003DMT400081260	AGP	51	1	0	2	1
PGSC0003DMT400081259	AGP	51	1	0	2	1
PGSC0003DMT400081261	AGP	53	1	0	2	1
PGSC0003DMT400079427	AGP	53	6	6	11	6
PGSC0003DMT400079194	AGP	63	5	3	9	5
PGSC0003DMT400087419	AGP	55	0	0	4	16
PGSC0003DMT400082812	AGP	62	2	4	5	2
PGSC0003DMT400087959	AGP	63	5	4	8	0
PGSC0003DMT400087983	AGP	50	2	1	6	2
PGSC0003DMT400085237	AGP	69	6	2	90	10
PGSC0003DMT400082044	AGP	52	10	4	37	22
PGSC0003DMT400086967	AGP	54	0	1	1	1
PGSC0003DMT400087920	AGP	65	7	6	72	4
PGSC0003DMT400081443	AGP	52	0	1	7	0
PGSC0003DMT400087245	AGP	52	1	7	5	8
PGSC0003DMT400095134	AGP	51	0	0	5	2
PGSC0003DMT400091045	AGP	62	1	0	6	21
PGSC0003DMT400096992	AGP	50	0	0	3	3
PGSC0003DMT400093891	AGP	51	3	2	1	3
PGSC0003DMT400000759	AGPeptide	37	0	0	2	0
PGSC0003DMT400000703	AGPeptide	44	0	2	2	3
PGSC0003DMT400003707	AGPeptide	35	1	0	3	0
PGSC0003DMT400004746	AGPeptide	45	0	1	2	2
PGSC0003DMT400007136	AGPeptide	41	1	0	0	2
PGSC0003DMT400007355	AGPeptide	40	0	0	3	1
PGSC0003DMT400008702	AGPeptide	37	0	0	2	0
PGSC0003DMT400007933	AGPeptide	41	0	0	0	3
PGSC0003DMT400009875	AGPeptide	43	1	1	0	1
PGSC0003DMT400021371	AGPeptide	39	0	0	4	0
PGSC0003DMT400012067	AGPeptide	40	0	0	2	0
PGSC0003DMT400019835	AGPeptide	45	1	0	0	2
PGSC0003DMT400019315	AGPeptide	47	2	0	0	0
PGSC0003DMT400016906	AGPeptide	40	0	0	0	2
PGSC0003DMT400012300	AGPeptide	35	1	0	1	0
PGSC0003DMT400021124	AGPeptide	42	3	2	0	0
PGSC0003DMT400015295	AGPeptide	39	2	1	0	0

Identifiant	Classe	% PAST	ΑΡ	ΡΑ	SP	ТР
PGSC0003DMT400022677	AGPeptide	38	0	0	1	1
PGSC0003DMT400016277	AGPeptide	38	0	0	3	0
PGSC0003DMT400016873	AGPeptide	42	0	1	2	1
PGSC0003DMT400021488	AGPeptide	38	1	0	0	1
PGSC0003DMT400014826	AGPeptide	38	0	1	1	3
PGSC0003DMT400012098	AGPeptide	40	1	1	1	0
PGSC0003DMT400021708	AGPeptide	36	1	0	2	0
PGSC0003DMT400011304	AGPeptide	43	2	1	0	0
PGSC0003DMT400017102	AGPeptide	37	0	0	1	1
PGSC0003DMT400021125	AGPeptide	43	3	2	0	0
PGSC0003DMT400012438	AGPeptide	41	2	1	2	1
PGSC0003DMT400017744	AGPeptide	46	2	1	1	0
PGSC0003DMT400014946	AGPeptide	38	3	4	0	0
PGSC0003DMT400021122	AGPeptide	38	1	1	2	0
PGSC0003DMT400028918	AGPeptide	43	0	0	2	0
PGSC0003DMT400034981	AGPeptide	40	1	1	2	0
PGSC0003DMT400026859	AGPeptide	36	1	1	0	2
PGSC0003DMT400026982	AGPeptide	46	0	1	2	0
PGSC0003DMT400024413	AGPeptide	37	0	0	2	1
PGSC0003DMT400031705	AGPeptide	38	3	3	0	0
PGSC0003DMT400025510	AGPeptide	40	2	3	0	1
PGSC0003DMT400036092	AGPeptide	45	1	3	3	0
PGSC0003DMT400039548	AGPeptide	36	0	1	3	0
PGSC0003DMT400026860	AGPeptide	36	1	1	0	2
PGSC0003DMT400038069	AGPeptide	36	2	1	0	0
PGSC0003DMT400023176	AGPeptide	38	3	2	0	3
PGSC0003DMT400024301	AGPeptide	47	0	0	2	1
PGSC0003DMT400033061	AGPeptide	37	1	0	2	0
PGSC0003DMT400024110	AGPeptide	40	1	0	1	0
PGSC0003DMT400028045	AGPeptide	45	0	0	0	3
PGSC0003DMT400024300	AGPeptide	47	0	0	2	1
PGSC0003DMT400033631	AGPeptide	41	0	1	1	0
PGSC0003DMT400030208	AGPeptide	36	0	0	1	1
PGSC0003DMT400035451	AGPeptide	41	0	0	1	1
PGSC0003DMT400036093	AGPeptide	45	1	3	3	0
PGSC0003DMT400024857	AGPeptide	40	1	0	2	0
PGSC0003DMT400036423	AGPeptide	47	1	0	0	1
PGSC0003DMT400029049	AGPeptide	37	0	0	1	1
PGSC0003DMT400029600	AGPeptide	39	3	0	0	0
PGSC0003DMT400030207	AGPeptide	36	0	0	1	1

Identifiant	Classe	% PAST	ΑΡ	ΡΑ	SP	ТР
PGSC0003DMT400037404	AGPeptide	47	0	2	1	0
PGSC0003DMT400037214	AGPeptide	45	1	0	2	1
PGSC0003DMT400036605	AGPeptide	35	1	0	0	1
PGSC0003DMT400032005	AGPeptide	39	0	0	1	1
PGSC0003DMT400026368	AGPeptide	39	0	1	2	0
PGSC0003DMT400041168	AGPeptide	45	2	1	0	0
PGSC0003DMT400041167	AGPeptide	45	2	1	0	0
PGSC0003DMT400043307	AGPeptide	36	0	0	0	1
PGSC0003DMT400047337	AGPeptide	39	0	0	4	0
PGSC0003DMT400046210	AGPeptide	42	1	0	2	0
PGSC0003DMT400045712	AGPeptide	43	0	1	2	0
PGSC0003DMT400053732	AGPeptide	39	1	0	1	1
PGSC0003DMT400053487	AGPeptide	45	0	2	2	0
PGSC0003DMT400053663	AGPeptide	36	0	0	0	2
PGSC0003DMT400049807	AGPeptide	39	2	2	1	1
PGSC0003DMT400049875	AGPeptide	37	3	2	0	0
PGSC0003DMT400047733	AGPeptide	39	2	1	2	0
PGSC0003DMT400050395	AGPeptide	39	0	0	4	0
PGSC0003DMT400052227	AGPeptide	40	1	0	0	1
PGSC0003DMT400049806	AGPeptide	39	2	2	1	1
PGSC0003DMT400053664	AGPeptide	36	0	0	0	2
PGSC0003DMT400061469	AGPeptide	40	0	1	10	1
PGSC0003DMT400065409	AGPeptide	43	0	1	1	1
PGSC0003DMT400056763	AGPeptide	38	0	0	2	1
PGSC0003DMT400060875	AGPeptide	44	2	1	0	1
PGSC0003DMT400060998	AGPeptide	41	0	1	2	1
PGSC0003DMT400061945	AGPeptide	40	0	0	3	1
PGSC0003DMT400061070	AGPeptide	35	0	1	4	0
PGSC0003DMT400055710	AGPeptide	38	2	0	0	0
PGSC0003DMT400055216	AGPeptide	38	0	3	2	1
PGSC0003DMT400063330	AGPeptide	45	0	0	2	1
PGSC0003DMT400065438	AGPeptide	36	1	1	2	0
PGSC0003DMT400065434	AGPeptide	43	1	1	2	1
PGSC0003DMT400056325	AGPeptide	36	1	0	0	2
PGSC0003DMT400065444	AGPeptide	48	1	0	2	1
PGSC0003DMT400061467	AGPeptide	40	0	1	10	1
PGSC0003DMT400054672	AGPeptide	38	0	1	2	0
PGSC0003DMT400054849	AGPeptide	44	2	1	0	1
PGSC0003DMT400061012	AGPeptide	42	2	1	1	0
PGSC0003DMT400060996	AGPeptide	41	0	1	2	1

Identifiant	Classe	% PAST	ΑΡ	ΡΑ	SP	ТР
PGSC0003DMT400058341	AGPeptide	46	2	2	1	0
PGSC0003DMT400065435	AGPeptide	38	0	1	3	1
PGSC0003DMT400062320	AGPeptide	38	3	2	0	0
PGSC0003DMT400065443	AGPeptide	35	0	1	2	0
PGSC0003DMT400065574	AGPeptide	48	1	1	1	0
PGSC0003DMT400065446	AGPeptide	40	0	1	2	1
PGSC0003DMT400061067	AGPeptide	44	2	2	1	1
PGSC0003DMT400056500	AGPeptide	37	0	0	1	1
PGSC0003DMT400056621	AGPeptide	38	4	1	0	0
PGSC0003DMT400074029	AGPeptide	40	0	0	1	3
PGSC0003DMT400067717	AGPeptide	37	2	2	0	1
PGSC0003DMT400066131	AGPeptide	44	2	0	1	0
PGSC0003DMT400069252	AGPeptide	38	2	1	0	1
PGSC0003DMT400070730	AGPeptide	42	1	0	1	0
PGSC0003DMT400071734	AGPeptide	40	0	0	3	0
PGSC0003DMT400069709	AGPeptide	40	0	0	2	0
PGSC0003DMT400067991	AGPeptide	37	2	1	0	1
PGSC0003DMT400066100	AGPeptide	42	1	0	2	0
PGSC0003DMT400072169	AGPeptide	43	3	3	0	1
PGSC0003DMT400070005	AGPeptide	44	3	2	0	0
PGSC0003DMT400074914	AGPeptide	35	2	2	0	0
PGSC0003DMT400066839	AGPeptide	48	1	0	1	0
PGSC0003DMT400072812	AGPeptide	36	1	0	0	1
PGSC0003DMT400071233	AGPeptide	36	1	1	1	0
PGSC0003DMT400076691	AGPeptide	47	0	2	1	1
PGSC0003DMT400077801	AGPeptide	39	0	1	1	0
PGSC0003DMT400078239	AGPeptide	42	1	0	1	1
PGSC0003DMT400078238	AGPeptide	42	1	0	1	1
PGSC0003DMT400078170	AGPeptide	43	1	0	0	3
PGSC0003DMT400078311	AGPeptide	44	1	0	0	3
PGSC0003DMT400078800	AGPeptide	39	0	1	2	1
PGSC0003DMT400079867	AGPeptide	38	0	0	1	2
PGSC0003DMT400089042	AGPeptide	36	3	0	1	0
PGSC0003DMT400083289	AGPeptide	38	0	0	3	1
PGSC0003DMT400085100	AGPeptide	41	1	0	0	1
PGSC0003DMT400087714	AGPeptide	37	1	0	2	1
PGSC0003DMT400084795	AGPeptide	39	1	0	1	1
PGSC0003DMT400084903	AGPeptide	36	1	1	1	1
PGSC0003DMT400082032	AGPeptide	43	3	4	0	0
PGSC0003DMT400083951	AGPeptide	39	1	0	1	0

Identifiant	Classe	% PAST	AP	ΡΑ	SP	ТР
PGSC0003DMT400096121	AGPeptide	38	0	0	3	0
PGSC0003DMT400093834	AGPeptide	35	1	0	0	0
PGSC0003DMT400094033	AGPeptide	40	3	0	0	2
PGSC0003DMT400092964	AGPeptide	45	1	1	1	1
PGSC0003DMT400095970	AGPeptide	42	0	1	1	1
PGSC0003DMT400092293	AGPeptide	46	1	0	0	3
PGSC0003DMT400090490	AGPeptide	41	1	0	2	2
PGSC0003DMT400097571	AGPeptide	36	2	0	0	1
PGSC0003DMT400095490	AGPeptide	38	1	0	0	0
PGSC0003DMT400095641	AGPeptide	37	2	1	1	2
PGSC0003DMT400091066	AGPeptide	37	0	0	1	0
PGSC0003DMT400096734	AGPeptide	38	3	2	0	2
PGSC0003DMT400092100	AGPeptide	36	0	1	2	0
PGSC0003DMT400092317	AGPeptide	36	1	0	0	1

Tableau A3.2 : Identification des Extensines de S. tuberosum grâce au nombre desmotifs SPPP, SPPPP et SPPPP.

Identifiant	Classe	SPPP	SPPPP	SPPPPP	Υνγ
PGSC0003DMT400082013	shortEXTs	2	0	0	0
PGSC0003DMT400081443	shortEXTs	3	3	2	0
PGSC0003DMT400080907	shortEXTs	3	3	0	0
PGSC0003DMT400078460	shortEXTs	3	3	1	0
PGSC0003DMT400067461	shortEXTs	3	0	0	0
PGSC0003DMT400065837	shortEXTs	4	4	1	0
PGSC0003DMT400065441	shortEXTs	5	3	2	0
PGSC0003DMT400065440	shortEXTs	4	2	0	0
PGSC0003DMT400063821	shortEXTs	2	1	1	0
PGSC0003DMT400045373	shortEXTs	2	0	0	0
PGSC0003DMT400015347	shortEXTs	2	2	1	0
PGSC0003DMT400012411	shortEXTs	3	2	2	0
PGSC0003DMT400012410	shortEXTs	3	2	2	0
PGSC0003DMT400012409	shortEXTs	3	2	2	0
PGSC0003DMT400002047	shortEXTs	4	4	0	0
PGSC0003DMT400095618	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400088106	EXTs1	2	1	1	0

Identifiant	Classe	SPPP	SPPPP	SPPPPP	Υνγ
PGSC0003DMT400087920	EXTs1	13	13	3	1
PGSC0003DMT400086007	EXTs1	2	2	0	0
PGSC0003DMT400085237	EXTs1	40	39	21	0
PGSC0003DMT400083794	EXTs1	2	1	0	0
PGSC0003DMT400082044	EXTs1	22	21	20	0
PGSC0003DMT400082043	EXTs1	13	12	11	0
PGSC0003DMT400082016	EXTs1	3	2	2	0
PGSC0003DMT400082014	EXTs1	3	2	2	0
PGSC0003DMT400082012	EXTs1	3	2	2	0
PGSC0003DMT400079410	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400079305	EXTs1	2	1	1	0
PGSC0003DMT400078706	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400078197	EXTs1	16	5	1	0
PGSC0003DMT400076374	EXTs1	11	9	2	0
PGSC0003DMT400076373	EXTs1	11	9	2	0
PGSC0003DMT400076372	EXTs1	5	4	2	0
PGSC0003DMT400075604	EXTs1	2	2	2	0
PGSC0003DMT400072592	EXTs1	2	1	0	0
PGSC0003DMT400072591	EXTs1	2	1	0	0
PGSC0003DMT400072590	EXTs1	2	1	0	0
PGSC0003DMT400072589	EXTs1	2	1	0	0
PGSC0003DMT400069784	EXTs1	2	1	1	0
PGSC0003DMT400069783	EXTs1	2	1	1	0
PGSC0003DMT400066741	EXTs1	9	8	2	0
PGSC0003DMT400066721	EXTs1	31	29	7	0
PGSC0003DMT400066177	EXTs1	3	1	0	0
PGSC0003DMT400064597	EXTs1	15	2	1	0
PGSC0003DMT400064596	EXTs1	15	2	1	0
PGSC0003DMT400064449	EXTs1	3	3	2	0
PGSC0003DMT400063186	EXTs1	2	1	1	0
PGSC0003DMT400061832	EXTs1	18	17	14	0
PGSC0003DMT400061471	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400061470	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400061468	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400061298	EXTs1	2	2	0	0
PGSC0003DMT400061294	EXTs1	2	2	0	0
PGSC0003DMT400058708	EXTs1	3	1	1	0
PGSC0003DMT400058003	EXTs1	8	8	2	0

Identifiant	Classe	SPPP	SPPPP	SPPPPP	Υνγ
PGSC0003DMT400057997	EXTs1	10	10	5	0
PGSC0003DMT400057996	EXTs1	10	10	6	0
PGSC0003DMT400057995	EXTs1	8	8	2	0
PGSC0003DMT400057994	EXTs1	7	7	2	0
PGSC0003DMT400057933	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400055632	EXTs1	136	136	16	33
PGSC0003DMT400055250	EXTs1	2	2	1	0
PGSC0003DMT400052607	EXTs1	3	0	0	0
PGSC0003DMT400050290	EXTs1	10	10	9	0
PGSC0003DMT400050027	EXTs1	12	12	7	0
PGSC0003DMT400049440	EXTs1	2	2	0	0
PGSC0003DMT400046319	EXTs1	20	20	10	0
PGSC0003DMT400045839	EXTs1	13	5	0	0
PGSC0003DMT400045838	EXTs1	13	5	0	0
PGSC0003DMT400045837	EXTs1	13	5	0	0
PGSC0003DMT400044372	EXTs1	4	0	0	0
PGSC0003DMT400043800	EXTs1	2	1	1	0
PGSC0003DMT400043799	EXTs1	2	1	1	0
PGSC0003DMT400043796	EXTs1	2	1	1	0
PGSC0003DMT400043795	EXTs1	2	1	1	0
PGSC0003DMT400041343	EXTs1	5	2	0	0
PGSC0003DMT400041226	EXTs1	8	6	4	0
PGSC0003DMT400040444	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400040158	EXTs1	2	1	0	0
PGSC0003DMT400040157	EXTs1	2	1	0	0
PGSC0003DMT400040010	EXTs1	9	1	0	0
PGSC0003DMT400039939	EXTs1	26	21	4	0
PGSC0003DMT400039938	EXTs1	26	21	4	0
PGSC0003DMT400038574	EXTs1	2	1	1	0
PGSC0003DMT400038573	EXTs1	2	1	1	0
PGSC0003DMT400038572	EXTs1	2	1	1	0
PGSC0003DMT400038554	EXTs1	6	3	0	0
PGSC0003DMT400038553	EXTs1	6	3	0	0
PGSC0003DMT400038519	EXTs1	2	2	1	0
PGSC0003DMT400037327	EXTs1	2	1	1	0
PGSC0003DMT400036637	EXTs1	12	3	0	0
PGSC0003DMT400030423	EXTs1	35	34	12	0
PGSC0003DMT400029231	EXTs1	3	1	1	0

Identifiant	Classe	SPPP	SPPPP	SPPPPP	Υ٧Υ
PGSC0003DMT400029230	EXTs1	3	1	1	0
PGSC0003DMT400028657	EXTs1	5	0	0	0
PGSC0003DMT400026515	EXTs1	48	47	35	0
PGSC0003DMT400026514	EXTs1	3	3	3	0
PGSC0003DMT400026193	EXTs1	13	7	3	0
PGSC0003DMT400025342	EXTs1	6	2	0	0
PGSC0003DMT400020450	EXTs1	3	2	1	0
PGSC0003DMT400019660	EXTs1	3	1	1	0
PGSC0003DMT400019659	EXTs1	3	1	1	0
PGSC0003DMT400019658	EXTs1	3	1	1	0
PGSC0003DMT400019657	EXTs1	3	1	1	0
PGSC0003DMT400019290	EXTs1	12	2	0	0
PGSC0003DMT400016600	EXTs1	2	2	0	0
PGSC0003DMT400015911	EXTs1	23	22	1	0
PGSC0003DMT400015657	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400015439	EXTs1	17	17	2	0
PGSC0003DMT400015176	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400013717	EXTs1	2	2	2	0
PGSC0003DMT400013221	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400013220	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400011911	EXTs1	62	61	0	8
PGSC0003DMT400011910	EXTs1	70	68	3	8
PGSC0003DMT400011909	EXTs1	39	37	0	8
PGSC0003DMT400011908	EXTs1	78	76	0	6
PGSC0003DMT400010353	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400010352	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400010351	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400010350	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400010349	EXTs1	2	0	0	0
PGSC0003DMT400006086	EXTs1	74	65	0	9
PGSC0003DMT400003487	EXTs1	3	1	1	0
PGSC0003DMT400002768	EXTs1	31	28	14	1
PGSC0003DMT400002693	EXTs1	2	1	0	0
PGSC0003DMT400002054	EXTs1	38	38	7	0
PGSC0003DMT400002053	EXTs1	38	38	7	0
PGSC0003DMT400002049	EXTs1	25	24	0	0
PGSC0003DMT400002042	EXTs1	29	28	0	0
PGSC0003DMT400002040	EXTs1	25	21	0	0

Identifiant	Classe	SPPP	SPPPP	SPPPPP	Υνγ
PGSC0003DMT400002037	EXTs1	32	32	0	0
PGSC0003DMT400002036	EXTs1	36	28	0	0
PGSC0003DMT400002035	EXTs1	28	23	0	1
PGSC0003DMT400001033	EXTs1	29	26	14	1
PGSC0003DMT400001024	EXTs1	4	1	0	0

Tableau A3.3 : Identification des Proline-rich Proteins (PRPs) à travers le pourcentage des acides aminés P-V-K-C-Y-T ainsi que des motifs repetés KKCPP et PPVX[K,T] et PPV

Identifiant	Classe	% PVKCYT	ККРСРР	PPVX[K,T]	PPV
PGSC0003DMT400004126	PRPs1,PRPs2	67	7	0	28
PGSC0003DMT400001033	PRPs1	49	0	0	10
PGSC0003DMT400002053	PRPs1	86	0	0	31
PGSC0003DMT400002047	PRPs1	58	0	0	2
PGSC0003DMT400002035	PRPs1	76	0	0	7
PGSC0003DMT400002054	PRPs1	86	0	0	31
PGSC0003DMT400002219	PRPs1	55	0	0	0
PGSC0003DMT400002036	PRPs1	77	0	0	0
PGSC0003DMT400002037	PRPs1	77	0	0	0
PGSC0003DMT400002040	PRPs1	76	0	0	4
PGSC0003DMT400002049	PRPs1	73	0	0	0
PGSC0003DMT400002693	PRPs1	51	0	0	5
PGSC0003DMT400002768	PRPs1	47	0	0	12
PGSC0003DMT400002888	PRPs1	55	0	0	1
PGSC0003DMT400002887	PRPs1	56	0	0	1
PGSC0003DMT400007468	PRPs1	54	1	0	10
PGSC0003DMT400006086	PRPs1	72	0	0	3
PGSC0003DMT400007467	PRPs1	54	1	0	10
PGSC0003DMT400009344	PRPs1	47	0	0	0
PGSC0003DMT400008037	PRPs1	48	0	0	1
PGSC0003DMT400015939	PRPs1	62	0	0	0
PGSC0003DMT400011909	PRPs1	68	0	0	0
PGSC0003DMT400019726	PRPs1	46	0	0	0
PGSC0003DMT400019315	PRPs1	47	0	0	0
PGSC0003DMT400011911	PRPs1	48	0	0	3

Identifiant	Classe	% PVKCYT	ККРСРР	PPVX[K,T]	PPV
PGSC0003DMT400016599	PRPs1	56	0	0	0
PGSC0003DMT400011353	PRPs1	53	0	0	0
PGSC0003DMT400016600	PRPs1	58	0	0	0
PGSC0003DMT400014686	PRPs1	45	0	0	0
PGSC0003DMT400020450	PRPs1	46	0	0	2
PGSC0003DMT400015940	PRPs1	62	0	0	0
PGSC0003DMT400016601	PRPs1	57	0	0	0
PGSC0003DMT400013432	PRPs1	49	0	0	0
PGSC0003DMT400011355	PRPs1	59	0	0	0
PGSC0003DMT400015941	PRPs1	45	0	0	0
PGSC0003DMT400015439	PRPs1	47	0	0	4
PGSC0003DMT400016603	PRPs1	58	0	0	0
PGSC0003DMT400011910	PRPs1	73	0	0	5
PGSC0003DMT400011908	PRPs1	73	0	0	3
PGSC0003DMT400015936	PRPs1	48	0	0	0
PGSC0003DMT400015911	PRPs1	70	0	0	24
PGSC0003DMT400021746	PRPs1	59	0	0	1
PGSC0003DMT400020126	PRPs1	52	0	0	0
PGSC0003DMT400015933	PRPs1	57	0	0	0
PGSC0003DMT400012784	PRPs1	49	0	0	0
PGSC0003DMT400038191	PRPs1	45	0	0	0
PGSC0003DMT400040157	PRPs1	56	0	0	0
PGSC0003DMT400034968	PRPs1	52	0	0	0
PGSC0003DMT400026982	PRPs1	56	0	0	0
PGSC0003DMT400035206	PRPs1	64	0	0	3
PGSC0003DMT400040158	PRPs1	46	0	0	0
PGSC0003DMT400030353	PRPs1	55	0	0	0
PGSC0003DMT400030423	PRPs1	71	0	0	0
PGSC0003DMT400036637	PRPs1	46	0	0	6
PGSC0003DMT400039938	PRPs1	47	0	0	16
PGSC0003DMT400035207	PRPs1	64	0	0	3
PGSC0003DMT400030309	PRPs1	57	0	0	0
PGSC0003DMT400030357	PRPs1	49	0	0	0
PGSC0003DMT400038844	PRPs1	50	0	0	1
PGSC0003DMT400037102	PRPs1	45	0	0	0
PGSC0003DMT400025342	PRPs1	53	0	0	3
PGSC0003DMT400038845	PRPs1	51	0	0	1
PGSC0003DMT400026515	PRPs1	57	0	0	0

Identifiant	Classe	% PVKCYT	ККРСРР	PPVX[K,T]	PPV
PGSC0003DMT400038846	PRPs1	50	0	0	1
PGSC0003DMT400030310	PRPs1	45	0	0	0
PGSC0003DMT400038473	PRPs1	48	0	0	1
PGSC0003DMT400041541	PRPs1	47	0	0	4
PGSC0003DMT400041539	PRPs1	47	0	0	4
PGSC0003DMT400046319	PRPs1	65	0	0	0
PGSC0003DMT400046152	PRPs1	50	0	0	0
PGSC0003DMT400044139	PRPs1	48	0	0	0
PGSC0003DMT400050027	PRPs1	67	0	0	0
PGSC0003DMT400050290	PRPs1	48	0	0	0
PGSC0003DMT400051667	PRPs1	55	0	0	0
PGSC0003DMT400051265	PRPs1	50	0	0	0
PGSC0003DMT400051106	PRPs1	50	0	0	0
PGSC0003DMT400051666	PRPs1	53	0	0	0
PGSC0003DMT400054218	PRPs1	47	0	0	0
PGSC0003DMT400047733	PRPs1	48	0	0	0
PGSC0003DMT400051907	PRPs1	45	0	0	4
PGSC0003DMT400050141	PRPs1	45	0	0	0
PGSC0003DMT400048369	PRPs1	46	0	0	0
PGSC0003DMT400061295	PRPs1	57	0	0	0
PGSC0003DMT400061298	PRPs1	59	0	0	0
PGSC0003DMT400061300	PRPs1	56	0	0	0
PGSC0003DMT400064602	PRPs1	50	0	0	2
PGSC0003DMT400057996	PRPs1	65	0	0	0
PGSC0003DMT400061296	PRPs1	54	0	0	0
PGSC0003DMT400064215	PRPs1	46	0	0	3
PGSC0003DMT400061297	PRPs1	54	0	0	0
PGSC0003DMT400065441	PRPs1	53	0	0	1
PGSC0003DMT400057997	PRPs1	67	0	0	0
PGSC0003DMT400055632	PRPs1	75	0	0	3
PGSC0003DMT400065434	PRPs1	48	0	0	0
PGSC0003DMT400061292	PRPs1	50	0	0	0
PGSC0003DMT400055648	PRPs1	46	0	0	1
PGSC0003DMT400060491	PRPs1	49	0	0	0
PGSC0003DMT400057994	PRPs1	66	0	0	0
PGSC0003DMT400057995	PRPs1	70	0	0	0
PGSC0003DMT400061294	PRPs1	59	0	0	0
PGSC0003DMT400061832	PRPs1	70	0	0	0

Identifiant	Classe	% PVKCYT	ККРСРР	PPVX[K,T]	PPV
PGSC0003DMT400058003	PRPs1	65	0	0	0
PGSC0003DMT400057329	PRPs1	54	0	0	0
PGSC0003DMT400054592	PRPs1	46	0	0	0
PGSC0003DMT400061299	PRPs1	53	0	0	0
PGSC0003DMT400064603	PRPs1	56	0	0	2
PGSC0003DMT400057623	PRPs1	50	0	0	0
PGSC0003DMT400066177	PRPs1	52	0	0	8
PGSC0003DMT400065837	PRPs1	48	0	0	0
PGSC0003DMT400069288	PRPs1	46	0	0	0
PGSC0003DMT400066131	PRPs1	55	0	0	1
PGSC0003DMT400066559	PRPs1	47	0	0	1
PGSC0003DMT400066741	PRPs1	66	0	0	0
PGSC0003DMT400067292	PRPs1	53	0	0	0
PGSC0003DMT400069120	PRPs1	48	0	0	19
PGSC0003DMT400071036	PRPs1	50	0	0	5
PGSC0003DMT400066132	PRPs1	57	0	0	1
PGSC0003DMT400069289	PRPs1	45	0	0	0
PGSC0003DMT400076373	PRPs1	54	0	0	8
PGSC0003DMT400076372	PRPs1	51	0	0	5
PGSC0003DMT400076374	PRPs1	56	0	0	8
PGSC0003DMT400076370	PRPs1	53	0	0	38
PGSC0003DMT400076367	PRPs1	49	0	0	1
PGSC0003DMT400076376	PRPs1	47	0	0	5
PGSC0003DMT400076691	PRPs1	55	0	0	0
PGSC0003DMT400078197	PRPs1	53	0	0	0
PGSC0003DMT400078459	PRPs1	49	0	0	0
PGSC0003DMT400080907	PRPs1	52	0	0	0
PGSC0003DMT400080633	PRPs1	59	0	0	0
PGSC0003DMT400078648	PRPs1	46	0	0	0
PGSC0003DMT400078384	PRPs1	47	0	0	0
PGSC0003DMT400087668	PRPs1	45	0	0	0
PGSC0003DMT400087419	PRPs1	52	0	0	0
PGSC0003DMT400083792	PRPs1	59	0	0	0
PGSC0003DMT400086007	PRPs1	59	0	0	0
PGSC0003DMT400082012	PRPs1	50	0	0	0
PGSC0003DMT400081471	PRPs1	54	0	0	0
PGSC0003DMT400087983	PRPs1	49	0	0	1
PGSC0003DMT400084795	PRPs1	47	0	0	0

Identifiant	Classe	% PVKCYT	ККРСРР	PPVX[K,T]	PPV
PGSC0003DMT400085237	PRPs1	60	0	0	2
PGSC0003DMT400082044	PRPs1	70	0	0	0
PGSC0003DMT400083793	PRPs1	58	0	0	1
PGSC0003DMT400087871	PRPs1	45	0	0	0
PGSC0003DMT400081470	PRPs1	54	0	0	0
PGSC0003DMT400082014	PRPs1	50	0	0	0
PGSC0003DMT400082043	PRPs1	66	0	0	0
PGSC0003DMT400083791	PRPs1	55	0	0	0
PGSC0003DMT400087920	PRPs1	51	0	0	0
PGSC0003DMT400088456	PRPs1	46	0	0	0
PGSC0003DMT400081443	PRPs1	53	0	0	1
PGSC0003DMT400082016	PRPs1	51	0	0	0
PGSC0003DMT400097615	PRPs1	46	0	0	1
PGSC0003DMT400093539	PRPs1	47	0	0	0
PGSC0003DMT400091045	PRPs1	50	0	0	0
PGSC0003DMT400093516	PRPs1	45	0	0	2

Annexe 4 : Article 2, soumis à Developmental Cell

The homeotic MADS-domain factor SEEDSTICK controls cell wall structure for the proper development of seeds

Ignacio Ezquer, Chiara Mizzotti, Eric Nguema-Ona, Léna Beauzamy, Vivian Ebeling Viana, Antonio Costa de Oliveira, Elisabetta Caporali , <u>Abdoul-Salam Koroney</u>, Arezki Boudaoud, Azeddine Driouich and Lucia Colombo

La paroi constitue un élément essentiel qui caractérise les cellules végétales. Cette paroi joue plusieurs rôles cruciaux pour la plante notamment son maintien, la communication entre ses différentes cellules, l'adaptation aux changements environnementaux et le développement de la plante (Oikawa *et al.*, 2013).

Dans cette étude, nous avons procédé à l'analyse du gène *SEEDSTICK*, un facteur de transcription MADS qui est un des principaux régulateurs de la différentiation de l'embryon et de la graine. Le mutant *SEEDSTICK* a la particularité d'être déficient dans la production de mucilage.

Mon apport dans cette étude a consisté à mettre au point les techniques d'immunomarquage pour l'observation du mucilage issu des graines d'*Arabidopsis thaliana* au microscope confocal à balayage laser ainsi que des marquages histochimiques en microscopie optique.

Developmental Cell

The homeotic MADS-domain factor SEEDSTICK controls cell wall structure for the proper development of seeds --Manuscript Draft--

Manuscript Number:			
Full Title:	The homeotic MADS-domain factor SEEDSTICK controls cell wall structure for the proper development of seeds		
Article Type:	Research Article		
Keywords:	MADS-box genes; Arabidopsis thaliana; seed coat; cell wall; mucilage; atomic force microscopy; biomechanics; germination		
Corresponding Author:	Lucia Colombo Università degli Studi di Milano Milan, ITALY		
First Author:	Ignacio Ezquer		
Order of Authors:	Ignacio Ezquer		
	Chiara Mizzotti		
	Eric Nguema-Ona		
	Léna Beauzamy		
	Vivian Ebeling Viana		
	Antonio Costa de Oliveira		
	Elisabetta Caporali		
	Abdoul-Salam Koroney		
	Arezki Boudaoud		
	Azeddine Driouich		
	Lucia Colombo		
Abstract:	Many transcription factors involved in cell wall (CW) morphogenesis have been identified and studied; however it is still unknown how genetic and molecular regulation of CW biosynthesis integrates into a developmental program. Here we present a study of SEEDSTICK (STK), an Arabidopsis transcriptional regulator of ovule and seed identity, which provided insight into how CW biosynthesis and developmental programming are coordinated. Genetic and molecular analyses show that STK directly regulates the biogenesis of CW components of the cellulose-pectin matrix. Loss of STK activity results in a significant modification of the matrix leading to altered mechanical properties of the seed coat as revealed by atomic force microscopy, immunocytochemistry and chemical analysis of the CW. In addition, our findings show that structural modifications of the CW-matrix in the stk mutant are correlated with alteration of physiological properties of seed coat including mucilage release that is important for seed germination under water-stress conditions.		
Suggested Reviewers:	Darren Wells University of Nottingham darren.wells@nottingham.ac.uk Expert in plant development and in regulation of growth Andrew Fleming University of Sheffield a.fleming@sheffield.ac.uk		
	Expert in plant development and in regulation of growth Joseph Turner University of Nebraska-Lincoln jaturner@unl.edu		

	Expert in plant biomechanics
	Paul Knox University of Leeds j.p.knox@leeds.ac.uk Expert in immunostaining of cell wall
	John Harada University of California Davis jjharada@ucdavis.edu Expert in gene networks in seed development
	Loïc Lepiniec Institut Jean-Pierre Bourgin Loic.Lepiniec@versailles.inra.fr Expert in molecular networks and seed development
Opposed Reviewers:	

Dear Editor of Developmental cell,

Hereby we propose the manuscript entitled: "The homeotic MADS-domain factor SEEDSTICK controls cell wall structure for the proper development of seeds" for publication in Developmental cell.

Our manuscript presents a complete new and innovative view on the control of seed coat differentiation in Arabidopsis. We provide a comprehensive description of the genetic, biochemical and biophysical mechanisms underlying the differentiation processes of mucilage secretory cells in the seed coat.

We describe the identification of SEEDSTICK (STK), a homeotic gene controlling ovule identity, as a key regulator of downstream pathways that are important for seed coat development and function. This finding illustrates that a master regulator that controls the identity of an organ or cell-type and stands at the top of a cascade of events that unroll when a homeotic gene gets activated, also controls specific processes that are crucial for the correct functional properties of a tissue, like cell wall biosynthesis. Our study that uses genetic, biochemical and physical approaches clearly shows how STK controls cell wall properties and it provides an unique mechanistic understanding of how mechanical patterns accompany cell wall modifications during the formation of the seed coat.

By its deep mechanistic and multidisciplinary insight that our manuscript provides in the action of a floral homeotic gene belonging to the MADS-box gene family, we believe that it is providing an important contribution to those studying developmental processes. Therefore, we hope that you will consider our manuscript for publication in Developmental cell.

Sincerely yours,

Prof. Dr. Lucia Colombo Phone +39 02 50314772 Fax +39 02 50314764 lucia.colombo@unimi.it http://users.unimi.it/plantdevumil/ TITLE: The homeotic MADS-domain factor *SEEDSTICK* controls cell wall structure
 for the proper development of seeds

3

AUTHORS: Ignacio Ezquer^{1,5}, Chiara Mizzotti¹, Eric Nguema-Ona², Léna Beauzamy³,
Vivian Ebeling Viana⁴, Antonio Costa de Oliveira⁴, Elisabetta Caporali¹, Abdoul-Salam
Koroney², Arezki Boudaoud³, Azeddine Driouich², and Lucia Colombo^{1,5}

7

8 **AFFILIATIONS:**

¹ Dipartimento di BioScienze, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milan,
Italy

² Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, UPRES EA 4358,
 PRIMACEN, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, Grand Réseau de
 Recherche-Végétal, Agronomie, Sol, Innovation, UFR des Sciences et Techniques,
 Normandie Université – Université de Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

³ Laboratoire de Reproduction et Développement des Plantes, INRA, CNRS, ENS, UCB Lyon

16 1, Université de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

⁴ Plant Genomics and Breeding Center, Technology Development Center, Federal University
 of Pelotas, RS, Brazil

⁵ Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Biofisica, 20133 Milan, Italy

20

21 CONTACT INFORMATION: lucia.colombo@unimi.it

1 SUMMARY

Many transcription factors involved in cell wall (CW) morphogenesis have been 2 identified and studied; however it is still unknown how genetic and molecular regulation of 3 CW biosynthesis integrates into a developmental program. Here we present a study of 4 SEEDSTICK (STK), an Arabidopsis transcriptional regulator of ovule and seed identity, 5 which provided insight into how CW biosynthesis and developmental programming are 6 7 coordinated. Genetic and molecular analyses show that STK directly regulates the biogenesis of CW components of the cellulose-pectin matrix. Loss of STK activity results in a significant 8 modification of the matrix leading to altered mechanical properties of the seed coat as 9 revealed by atomic force microscopy, immunocytochemistry and chemical analysis of the 10 CW. In addition, our findings show that structural modifications of the CW-matrix in the stk 11 mutant are correlated with alteration of physiological properties of seed coat including 12 mucilage release that is important for seed germination under water-stress conditions. 13

14

1 INTRODUCTION

It is commonly accepted that the two essential underlying mechanisms of patterning 2 and growth are tightly constrained by genetic regulation, and this constitutes the basis of 3 morphogenesis. Although molecular approaches continue to reveal more about the genetic 4 mechanisms of pattern formation, understanding the link between genetic regulators and 5 global shape control remains a central question in developmental biology. Modeling tissue 6 growth is performed through a complex molecular regulatory network controlling both the 7 composition and mechanical properties of the cell wall (CW) (Boudon et al., 2015). As a 8 matter of fact, many CW-modifying enzymes such as expansins, xyloglucan endo-9 transglycosylases or pectin modifying enzymes have been discovered to act downstream from 10 key transcription factors controlling plant morphogenesis such as APETALA2 (Yant et al., 11 2010), MONOPTEROS (Schlereth et al., 2010) and AGAMOUS (Gómez-Mena et al., 2005). 12 Notably, the action of such enzymes can modulate the viscosity and/or the rigidity of the wall, 13 and the consequent alterations in wall extensibility may be sufficient to affect growth, which 14 depends upon wall composition and interactions among CW components (Cosgrove, 2001). 15 Growth by cell elongation involves an irreversible increase in cell volume in parallel to 16 relaxation of the CW. The biochemical processes involved in CW loosening during extension 17 growth are only partially understood (Cosgrove, 2001; Keegstra, 2010). For instance, many 18 physiological processes during plant development have already been associated with CW-19 modifying enzymes such as pectin methylesterases (PMEs) in plant development (for review, 20 see Pelloux et al., 2007). More importantly, hormonal regulation of seed germination in 21 Arabidopsis has clearly been linked to PMEs and their respective inhibitors (Müller et al., 22 2013; Saez-Aguayo et al., 2013). 23

The seed coat (SC) protects the embryo and plays important roles in dormancy, dispersal mechanisms and longevity (Bueso et al., 2014; Windsor et al., 2000). In

Arabidopsis, the SC is derived from the ovule inner and outer integuments (Haughn and 1 Chaudhury, 2005; Skinner et al., 2004). Upon fertilization, cells derived from the two layers 2 of the outer integument and from the three layers of the inner integument go through a rapid 3 cell growth process. During the first days following fertilization, this rapid growth entails both 4 cell division and expansion (Windsor et al., 2000). These five different cell layers follow 5 distinct fates (Haughn and Chaudhury, 2005): on one hand, cells of the innermost layer, called 6 the endothelium, synthesize proanthocyanidins (PAs) flavonoid compounds, which later 7 oxidize, and impart the typical brown color to the SC (Mizzotti et al., 2014; Pourcel et al., 8 2005). On the other hand, in the apoplast of the outermost layer (also called mucilage 9 secretory cell (MSC)) (Western et al., 2000) pectinaceous mucilage is accumulated. (Haughn 10 and Chaudhury, 2005; North et al., 2014). 11

Mucilage formation by the epidermal SC layer is a characteristic feature of several 12 flowering plants (including many of agricultural value), which has attracted much attention 13 (Western, 2012; Yang et al., 2012). Although mucilage is not required for seed germination 14 under normal conditions, it provides ecological advantages under extreme conditions by 15 facilitating water imbibition, adherence to soil particles, and maintenance of adequate 16 moisture (Western et al., 2000; Yang et al., 2012). The release of mucilage is critical to allow 17 germination in drought conditions as was shown by low germination efficiency under arid 18 conditions in reduced mucilage mutants like myb61, transparent testa glabra1 (ttg1), glabra2 19 (gl2), the bi-functional β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase (bxl1), and the subtilisin-like 20 serine protease (*sbt1.7*) (Arsovski et al., 2009; Penfield et al., 2001; Rautengarten et al., 2008; 21 Willats et al., 2001). In addition, a correlation between mucilage formation and seed longevity 22 has recently been discovered (Bueso et al., 2014). 23

One of the major regulators of ovule and seed differentiation is *SEEDSTICK (STK)*, a MADS transcription factor that, along with *SHATTERPROOF1 (SHP1)* and *SHP2*, control

ovule integument identity (Brambilla et al., 2007; Pinyopich et al., 2003). STK, in association 1 2 with another MADS-domain gene ARABIDOPSIS B SISTER (ABS), is required for proper formation of the endothelium, the innermost layer of the SC (Mizzotti et al., 2012). Recently, 3 it has been demonstrated that STK controls PA metabolism in the seed coat by regulating the 4 expression of BANYULS/ANTHOCYANIDIN REDUCTASE, a gene encoding for a key 5 enzyme involved in PA biosynthesis (Mizzotti et al., 2014). Interestingly, STK also repressed 6 the expression of key regulators of the SC, specifically TT8 and EGL3, binding directly to the 7 promoters of these members of the WD40-bHLH-MYB complex (Mizzotti et al., 2014). 8 These factors not only control the synthesis of anthocyanin in the endothelial layer of the 9 developing SC, they also regulate outer SC differentiation, consistent with their expression in 10 the developing testa epidermis (Baudry et al., 2006). 11

There is a substantial lack of knowledge regarding how mechanical and biochemical 12 changes of the SC's properties (which ultimately lead to testa formation) can influence seed 13 coat functions. Here, we show that the role of homeotic gene STK in differentiation hinges on 14 control of CW structure. We discovered that in *stk* mutants, the modification of the biogenesis 15 of CW components changed the mechanical properties of the seed coat structure, strongly 16 affecting mucilage extrusion and consequently germination under arid conditions. The 17 mechanistic model presented herein integrates molecular, biochemical and physical elements, 18 providing a wider view of the role of developmental regulators in the differentiation of the 19 CW. 20

21

RESULTS AND DISCUSSION 1

2

SEEDSTICK is required for proper seed coat development and function

3 To study the STK expression pattern we imaged the surface (epidermal cells) of Arabidopsis ovules and seeds expressing the pSTK::STK-GFP reporter line (Mizzotti et al., 4 2014). Before fertilization, STK-GFP is localized in the outer integuments of the ovule 5 (Figure 1A). After fertilization, STK-GFP is expressed in the epidermal cells of the SC at the 6 7 center of the columella (around linear cotyledon stage) (Figure 1B). This suggested that STK might have a function in developing MSCs. 8

In Arabidopsis, SC development leads to the formation of columellae in MSCs, and to 9 the synthesis and deposition of a pectin-enriched mucilage in the MSC apoplast (for review, 10 see North et al., 2014). The mucilage is organized into two distinct domains: an inner, dense 11 mucilage tightly attached to seed, and an outer, water-soluble, more diffuse mucilage that can 12 be easily extracted from the seed (Macquet et al., 2007a; North et al., 2014). Mutations in 13 genes coding for biosynthetic enzymes involved in the production of CW polysaccharides 14 have been shown to cause defects in mucilage release upon hydration (for review, see North 15 et al., 2014). 16

In order to determine if STK mutation affects epidermal SC development, we tested 17 the ability of *stk* seeds to release mucilage upon water imbibition (Figures 1C and 1D). 18 Ruthenium Red staining revealed the presence of a thick, pink-staining capsule of mucilage 19 around wild-type (WT) seeds upon water imbibition (Figure 1C), while stk seeds showed a 20 significant reduction (or even absence) of mucilage release (Figure 1D). The WT and stk 21 22 seeds were treated with ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA), known to chelate calcium ions and thus facilitate the extrusion of water-insoluble mucilage. This caused mucilage 23 extrusion both in WT (Figure 1E) and *stk* seeds (Figure 1F). This phenotype has already been 24
observed in a number of Arabidopsis mutants deficient in metabolic aspects of mucilage 1 2 deposition and extrusion (Haughn and Chaudhury, 2005; North et al., 2014). We imaged the surface of dry, water-imbibed or EDTA-treated stk and WT seeds by scanning electron 3 microscopy (SEM) (Figure 1G-L). The epidermal layer of WT seeds displayed a reticulate 4 appearance (Figure 1G). In stk seeds, the size of epidermal cells was reduced compared to the 5 WT, but there were no other apparent morphological differences (Figure 1J). After water 6 imbibition, deep hollows were visible around the columellae of WT epidermal cells (Figure 7 1H), while in *stk*, water imbibition did not change SC morphology (Figure 1K), indicating that 8 mucilage has not been extruded. On the contrary, EDTA imbibition caused mucilage release 9 10 in both WT and *stk* seeds and showed no significant differences in cell morphology between stk and WT (Figures 1I and 1L). 11

12

SEEDSTICK induces major changes in composition and partitioning of the seed coat mucilage affecting seed germination

15 To understand the structural basis of the phenotypes, we performed a comparative biochemical analysis of mucilage extracted from WT and stk seeds. Sequential extractions of 16 different mucilage-enriched fractions were performed in this case with water, 0.2 M and 2 M 17 NaOH and the sugar contents of the extracted mucilage were compared in each fraction 18 (Figures 2 and S1). Following water imbibition, as expected, we found that the total sugar 19 content of stk seeds was considerably low, representing ~5% of the WT seed total sugar 20 content (Figure 2). After 0.2 M NaOH treatment, the amount of total sugar content extracted 21 was higher in the stk seeds, when compared to the WT. This additional amount of sugars 22 probably originated from mucilage, which did not extrude with water. In this fraction, the 23 amount of neutral sugars was comparable between WT and stk, while the amount of acidic 24 sugars was higher in *stk*. Finally, the 2 M NaOH fractions (corresponding to the strongly 25

1 adherent mucilage) did not show significant differences.

In order to gain a better insight on the nature of the polymers being extracted, we 2 performed a compositional monosaccharide analysis of the different mucilage-enriched 3 4 fractions by using gas liquid chromatography (Table S1). Our results showed that the watersoluble fractions of both stk and WT consist predominantly of rhamnose (Rha) and 5 galacturonic acid (GalA), and their composition, very similar in mutant versus WT, consists 6 of 60% for GalA and 35% for Rha. This suggests the presence of a mixture of unbranched 7 rhamnogalacturonan I (RG-I) and (homogalacturonan) HG in the extract. It is well 8 9 documented that Arabidopsis seed water-soluble mucilage consists exclusively of unbranched RG-I (Macquet et al., 2007a). It is thus possible that the vigorous shaking applied to seeds 10 under our conditions has also solubilized some HGs that are weakly associated to MSC walls. 11 12 A 0.2 M NaOH-soluble fraction was also prepared and analyzed using gas chromatography. It consisted mainly of glucose (Glc), Rha and GalA. Interestingly, the overall composition 13 differed between the WT and stk seeds. First, stk seeds contained a higher proportion of Rha 14 15 and GalA compared to the WT (probably the unbranched RG-I which could not be extruded upon water imbibition, and HGs). Glc content, possibly originating from cellulose, was 16 significantly altered in the 0.2 M NaOH soluble fraction of the stk relative to the WT (Table 17 S1). Alkaline treatment is known to release cellulose by disruption of hydrogen bonds 18 between sugars entrapping the mucilage within seed epidermal CW (Harpaz-Saad et al., 2011; 19 Macquet et al., 2007a; Mendu et al., 2011; Sullivan et al., 2011). The cellulose synthases 20 CESA2 and CESA9 serve in SC epidermal radial wall reinforcement, much like CESA5, 21 although CESA5 also functions in mucilage biosynthesis (Mendu et al., 2011; Sullivan et al., 22 2011). The presence of low levels of glucose in stk 0.2 M NaOH fraction suggests a low 23 amount of cellulose in the stk mucilage adherent layer (discussed below). Gal and Ara 24 residues levels, likely to be associated with branched RG-I and/or with AGPs, were also 25

shown to be significantly altered in the *stk* 0.2 M NaOH soluble fraction, when compared to the WT (Table S1). Arabinan (Arsovski et al., 2009) and galactan (Dean et al., 2007; Macquet et al., 2007b) chains associated with RG-I are known to be trimmed in *Arabidopsis* seed epidermal CW. Such a trimming is supposed to improve mucilage hydrophilic properties. In addition, disruption of the SOS5 AGP, leads to a reduction in the rays of cellulose observed across the seed mucilage inner layer, which alters the structure of the mucilage in response to hydration (Harpaz-Saad et al., 2011).

8 Finally, the 2 M NaOH extraction yielded very little mucilage (comparable in terms of 9 content and composition) from WT and *stk* seeds (Figure 2; Table S1). Altogether, these data 10 indicate that *STK* mutation alters seed mucilage release via a modification of mucilage 11 composition and organization of CW in the MSCs

Since the hygroscopic properties of mucilage could alter water uptake during 12 germination in reduced water potential conditions (for review, see Western, 2012), we tested 13 the germination in water stress conditions in WT and *stk* respectively (Figures 3A and 3B). 14 Germination and seedling establishment of *stk* seeds were significantly inhibited on media 15 containing 18% polyethylene glycol (PEG) (Figure 3B). Stk seeds displayed levels of 16 germination of 60% under this condition, while WT plants displayed a level of 90% (compare 17 Figures 3A with 3B). We observed germination inhibition under water-limiting stress 18 conditions for the WT seeds when exposed to 21% PEG (Figure 3A). This is consistent with 19 observations of Penfield and colleagues (2001) showing that germination was compromised in 20 different mutants altered in mucilage release under conditions of reduced water potential. 21 Overall, these observations supported the role of STK in germination by controlling this 22 phenomenon under water-limited conditions. 23

SEEDSTICK directly controls *PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR 6* required for HG methyl-esterification

Although informative and powerful, gas liquid chromatography does not provide 3 information on minor modifications occurring in CW and mucilage components, such as 4 pectin methyl-esterification/de-esterification and formation of egg-boxes, which impact CW 5 physical properties (Seymour and Knox, 2002). These modifications were recently shown to 6 be crucial to the adherent mucilage extrusion properties of Arabidopsis MSCs (see Saez-7 Aguayo et al., 2013; Voiniciuc et al., 2013). In order to determine whether STK influences the 8 methyl-esterification status of HGs, immunolabeling studies with the specific monoclonal 9 antibodies (mAb) LM19 and LM20 (recognizing low- and high methyl-esterified HGs 10 respectively; see supplemental methods) were performed (Figure 4A to 4H). 11

When WT seeds, pre-imbibed in water, were immunolabeled with the mAb LM19, the 12 inner mucilage layer appeared labeled consistently as previously described in Macquet et al., 13 2007a (Figure 4A). Arrays, likely to be associated with cellulose-enriched columellae, were 14 also strongly labeled. However, the surface of the outermost mucilage layer was not labeled. 15 In contrast, stk seeds imbibed in water were not labeled with the same antibody LM19 (Figure 16 4B). WT and stk seeds were subsequently imbibed in 0.2 M NaOH, washed and 17 immunolabeled with the mAb LM19. Treatment with 0.2 M NaOH seemed to make the 18 LM19-recognized epitopes (associated with low-esterified HG) present in the CW and the 19 inner mucilage layer more accessible to the antibody. In the WT seeds, we observed labeling 20 of a 0.2 M NaOH-soluble mucilage, surrounding the seeds, and over the arrays of cellulose-21 enriched columellae (Figure 4C). Interestingly, unlike in the WT, stk seeds remained un-22 labeled (Figure 4D). 23

We have also used the mAb LM20 in our labeling studies. Using this antibody, we 1 2 observed a clear staining of the outer edges of the inner mucilage of pre-imbibed WT seeds consistent with the data from Macquet et al., 2007a (Figure 4E). stk seeds however, showed a 3 very weak irregular labeling (Figure 4F). As a control series, we also probed WT and stk 4 seeds, subsequently imbibed in 0.2 M NaOH, with the mAb LM20. Given that 0.2 M NaOH 5 saponifies ester groups, no labeling was expected. Indeed, the inner mucilage layer did not 6 show no labeling neither in WT nor in the stk mutant (Figures 4G and 4H). Similarly, in the 7 PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR6 (pmei6) mutant of Arabidopsis, no labeling of 8 HG (either weakly or highly methyl-esterified) was observed using the mAbs JIM5 and JIM7 9 10 by Saez-Aguayo et al., 2013 concluding that PMEI6 promotes mucilage release by controlling methylesterification of HG in seed coat epidermal cells. Altogether, our observations indicate 11 that STK mutation impacts HG esterification. 12

13 Consequently, we investigated the expression of different genes known to influence 14 HG methylesterification in SC epidermal cells. Pectin methylesterase inhibitors (PMEIs) 15 control the action of pectin methylesterases (PME) (Jolie et al., 2010). In order to find out 16 wether *PMEI6* gene expression was under the control of *STK*, we performed a qRT-PCR 17 expression analysis on WT and *stk* siliques (Figure 4I). We found that the expression of 18 *PMEI6* in the *stk* siliques was strongly reduced.

Finally, we crossed a WT line expressing a pPMEI6::PMEI6-GFP (Saez-Aguayo et al., 2013) with *stk*, and we visualized the surface (epidermal cells) of seeds at the linear cotyledon stage (Figure 4J). While the surface of the line expressing the *pPMEI6::PMEI6-GFP* in WT background was clearly labeled, the surface of *stk* background was not (Figure 4J). These data strongly suggest that *STK* positively regulates the expression of *PMEI6* gene. We analyzed the sequence of the *PMEI6* locus and found 5 putative CArG boxes (Figure 4K), which are MADS-recognition motifs (Tilly et al., 1998). In order to investigate whether this regulation involved direct interaction between the STK protein and *PMEI6* we performed a
ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) assay using GFP antibodies to examine developing
siliques (up to 6 DAP) expressing *pSTK::STK-GFP*, compared to WT control plants (Figure
4 L). Among the five CArG boxes in the promoter and genomic region, we found through
Chip-qRT assays a significant enrichment for the regions spanning CArGs 1-2 and CArG 4 in
plants expressing *pSTK::STK-GFP*.

7

8 SEEDSTICK controls the transcriptional network required for pectin modification in 9 MSCs

10 Finally, we decided to study the expression of genes shown to play a role in different aspects of MSC functionality, including mucilage extrusion, pectin metabolism and 11 hydrophilic properties, and also in SC differentiation. We focused on the transcription factors 12 LEUNIG HOMOLOG/MUCILAGE MODIFIED 1 (LUH/MUM1; Huang et al., 2011) and 13 MYB61 (Penfield et al., 2001), the β -galactosidase MUM2, the bi-functional β -D-xylosidase/ 14 α-L-arabinofuranosidase BXL1, (Arsovski et al., 2009; Dean et al., 2007), and the subtilisin-15 like serine protease SBT1-7 (Rautengarten et al., 2008). The expression of these genes in WT 16 and *stk* was analyzed by qRT-PCR using developing siliques (Figure S2A). The data show 17 that all genes were up-regulated in *stk*, suggesting that STK could act as a repressor at this 18 specific stage of development. We also performed a ChIP assay on these targets to determine 19 whether STK indeed binds to the selected CArG-containing regions and found that STK was 20 not directly targeting these (Figure S2B). 21

The transcription regulators GL2 and LUH/MUM1 have also been proposed as regulators of *PMEI6* expression (Saez-Aguayo et al., 2013). In order to find out if the MADSbox transcription factor *STK* is controlled by LUH/MUM1 and GL2, we analyzed the

expression of STK in developing siliques of *luh/mum1* and *gl2* mutants. Interestingly, we 1 found that STK transcripts were upregulated in *luh/mum1* (Figure S3). Therefore, a reciprocal 2 repression between STK and LUH/MUM1 seems to occur. Expression analysis in gl2 3 developing siliques indicated no differences in STK expression between the WT and gl2 4 (Figure S3). Therefore it seems that GL2 is not required to control STK expression. Overall, 5 these data are consistent with a fine tuned control of STK over the demethylesterification in 6 HG. Recent advances have highlighted the importance of methyl-esterification of CW pectins 7 in determining a variety of important biological functions, such as cell elongation and fruit 8 ripening (Peaucelle et al., 2012). Interestingly, Peaucelle and coworkers showed that PME 9 activity influences stiffness in the CW thereby controlling tissue growth and emergence of 10 organ primordia (Peaucelle et al., 2008; 2011). The genetic and biochemical processes 11 involved in cellulose-pectin matrix biosynthesis are critical in determining organ growth. The 12 13 importance of CW structure is consistent with previous observations showing that the stk mutant displays a reduced growth and seed size phenotype (Pinyopich et al., 2003). Therefore, 14 the question arises whether in this context, STK control of SC HG de-esterification could 15 regulate, completely or at least in part, seed growth. 16

From a mechanistic view, a high number of negatively charged carboxyl groups on low methylesterified HG in *stk* could enhance Ca²⁺ cross-linking, thereby inhibiting the diffusion of pectins when compared to highly and partially methylesterified HG in WT. Therefore, we propose a role for *STK* in the modulation of the pathway involving pectin modification, with *PMEI6*, *MUM2*, *BXL1*, *LUH* and *SBT1*.7 as downstream targets, involving a direct control over *PMEI6*.

23

24 The importance of cellulose deposition in packaging mucilage

Cellulose is a constitutive component of SC mucilage and has been shown to interact 1 2 with other components of the mucilage, thus influencing its extrusion properties (Macquet et al., 2007a; Mendu et al., 2011; Sullivan et al., 2011). In order to determine whether STK 3 mutation affects cellulose deposition and organization in Arabidopsis MSCs, as well as its 4 synthesis, Arabidopsis WT and stk seeds were successively imbibed with water and 0.2 M 5 NaOH, and stained with Calcofluor-white stain (Figure 5A to 5F). In contrast to WT seeds, 6 7 water-treated, stk seeds were not stained (compare Figures 5A with 5B). Following imbibition with 0.2 M NaOH, stk seeds released a mucilaginous material. To an even greater extent, 8 labeling with Calcofluor-white was almost absent in stk seeds and was located only at the base 9 10 of the rays just above the columellae, and not diffused in a ray-like manner as seen in WT (Figures 5C to 5F). The stk seeds showed an irregular pattern of staining around the 11 columellae. The decrease in staining was seemingly localized around the abscission zone. 12 13 Interestingly, stk seeds have been characterized by a propensity to remain attached to the maternal funiculus, in the abscission zone. Our sugar analysis data showed that stk-derived, 14 0.2 M NaOH-soluble mucilage fraction contained half as much (or 50% less) Glc, when 15 compared to the WT (Table S1), which is consistent with a decrease in cellulose content 16 (Harpaz-Saad et al., 2011). We then tested the transcript abundance of CESA5 gene, known to 17 be expressed during SC maturation (Sullivan et al., 2011) (Figure 5G). We found that in 18 developing seeds, the expression of CESA5 in the stk background was repressed. In order to 19 determine whether STK interacts directly with CESA5 genomic region, we analyzed this 20 region and found 8 putative CArG boxes located starting from the promoter of the gene till 21 the last exon (Figure 5H). ChIP-qRT assays showed a significant enrichment of CArG4, of 22 the 5 CArG boxes tested (Figure 5I). We also tested the expression of the genes FEI2 and 23 SOS5, known to play a role in cellulose synthesis and release in the MSCs (Harpaz-Saad et 24 al., 2011). We found that the expression of FEI2, like CESA5, was repressed, while that of 25

SOS5 was unaltered (Figure 5G). CESA5 and SOS5 control cellulose-mediated mucilage 1 adherence independently (Griffiths et al., 2014). Therefore, the observation that levels of 2 SOS5 were unaffected in stk when compared to the WT is interesting; it suggests that STK 3 mutation impacts cellulose deposition independently through the control of CESA5. Overall, 4 these observations suggest that the predominant roles of STK are to limit the rupturing of the 5 radial primary CW and to encapsulate mucilage in an altered cellulose-pectin matrix. 6 7 Therefore a critical relationship seems to exist between these polymers and normal functioning of the SC. 8

9

10 CW modifications impact on seed coat stiffness

The alteration of CW structures in *stk* seeds could determine a higher mechanical 11 resistance that might be one of the causes of retaining mucilage in MSCs. To test this 12 hypothesis, we took advantage of recent advances in atomic force microscopy (AFM), which 13 has provided relevant insights into the mechanics of growth and development in plants 14 (Peaucelle et al., 2012). We used this technique to monitor mechanical changes in the 15 epidermal cells in developing seeds (see supplemental methods). AFM is based on the ability 16 of a small flexible element (the cantilever) to be bent when forced to indent a sample (Figure 17 S5A). Since the mechanical properties of the cantilever are known, those of the sample can be 18 deduced. At the same time, AFM provides topographic maps (height maps, as shown in 19 Figure S5B and S5C), where higher regions were depicted with lighter colours. During the 20 scanning process, the AFM performed force-curves on the seed surface, and these force-21 curves were stored in a map where each pixel corresponds to a force-curve. These AFM 22 force-curves were fitted with the Sneddon model (see supplemental methods), in order to 23 extract the apparent Young's modulus (E) of the seeds CW (unit, MPa). The results are shown 24

in Figure 6. Each square represents the average per seed of over 300 force-curves, with the
associated standard deviation. Our experiment showed a mean value for the 5 WT seeds of
0.66 +/- 0.35 MPa, and a mean value for the 4 *stk* seeds of 3.98 +/- 1.11 MPa. Overall, the
data indicate that *stk* seeds exhibit higher elastic moduli than WT seeds, suggesting that CW
of *stk* MSC is harder (i.e., stiffer). Thus, it seems that alterations in the biophysical properties
of the CW might play a role in the mechanical rupture of the SC upon water imbibition.

7

8 Conclusions

Biophysical strategies are increasingly used in plants to unravel the mechanisms 9 controlling organ growth and shape determination. However, despite this tendency, there is a 10 11 substantial gap of knowledge regarding how developmental control is connected to the gene network regulating CW structure and function, a main determinant of tissue properties. Our 12 13 studies revealed that the transcription factors controlling organ differentiation, such as the homeotic MADS-domain factor STK, directly regulate genes encoding for enzymes involved 14 in CW biosynthesis. We show that the biophysical properties of the CW, due to both the 15 methylesterification status of pectins and cellulose deposition, are determined by STK. For 16 instance, we show that PMEI6 is directly regulated by STK and that its down-regulation in the 17 stk mutant resulted in an increased global stiffening of the CW. This is due to a reinforcement 18 of the pectin structures due most likely to Ca²⁺ cross-links. Finally the result of this increased 19 rigidity of the CW is a disruption of mucilage extrusion which influences the germination 20 properties of seeds especially under drought conditions. 21

Based on our results, we propose a model wherein the maintenance of CW integrity throughout seed development, which is essential for proper seed coat biogenesis (presented schematically in Figure 7), is under control of the master developmental regulator STK. This

is the first example showing a direct relation between a differentiation process and the
molecular mechanisms that underlay properties related to mechanical stress responses in a
tissue, in this case the seed coat.

Our studies of the stk mutant suggest that seed coat properties, such as stiffness, can 4 be fine-tuned by genetic factors thus impacting processes such as primary cell wall rupture, 5 mucilage swelling and testa rupture upon germination in water limiting conditions. Both of 6 these processes are important for seed germination and of enormous importance for 7 agriculture. Furthermore, it also shows how changes in the expression of master 8 developmental regulator impacts seed properties, underlining the important role these 9 10 transcription regulators might have in the evolution of a species or during domestication by 11 humans.

1 EXPERIMENTAL PROCEDURES

2

A detailed overview of the experimental procedures can be found in the extended
experimental procedures

5 **Plant material and growth conditions**

Arabidopsis thaliana WT (ecotype Columbia) and *stk* plants were grown at 22°C under shortday (8 h light/16 h dark) or long-day (16 h light/8 h dark) conditions. *Arabidopsis stk* seeds
were kindly given by M. Yanofsky (Pinyopich et al., 2003). The *stk-2* allele contains a 74nucleotide insertion near the splice site of the third intron. The marker line *pSTK::STK-GFP*used in this work was described in Mizzotti et al., 2014. The *pPMEI6::PMEI6-GFP* marker
line and the mutants *luh-3* (SALK_107245C) and *gl2-6* (SM_3.16350) were kindly provided
by the Helen North lab.

13

14 PCR-based genotyping

15 Identification of the *stk* and WT alleles were performed as described in Mizzotti et al., 2014.

16

17 Morphological analysis

For mucilage release, whole seeds were stained by shaking in a 0.01% (w/v) Ruthenium Red (Sigma) solution for 90 min. Seeds treated with EDTA (0.5 M) were imbibed for 2 hours before staining with ruthenium red. After ruthenium red staining, the samples were rinsed in dH₂O prior to visualization. Seeds were observed and photographed using a stereomicroscope. For mucilage extrusion, SEM was performed on WT and mutant seeds before and after imbibition. The dried seeds were put overnight at 37°C before proceeding with the analysis. Imbibed seeds were air dried overnight on filter paper and then treated the same as dry seeds.
 Dried and imbibed seeds were gold coated using a sputter coater (SEMPREP2; Nanotech) and
 observed with a LEO 1430 SEM (LEO Electron Microscopy).

4

5 Germination tests on polyethylene glycol

6 Seeds from 3 independent batches from *stk* and WT were harvested on the same day from 7 plants grown side by side in identical environmental conditions. Seeds were placed on paper 8 discs and sealed in Petri dishes and moistened with 1 mL of water or PEG 8000 solution from 9 12 to 25% concentration (Sigma) and were stratified for 3 days at 4°C. Seeds were scored as 10 germinated when testa rupture was visible, preceding to radicle protrusion.

11

12 Quantitative real-time PCR analysis and ChIP assays

qRT-PCR experiments were performed on cDNA obtained from 3 to 6 DAP siliques. Total RNA was extracted using the LiCl method (Verwoerd et al., 1989). ChIP experiments were performed as a modified version of a previously reported protocol (Gregis et al., 2008) using a GFP polyclonal antibody (Living Colors Polyclonal antibody raised in rabbit, Clontech, cat no. 632460). A detailed overview of these procedures can be found in the extended experimental procedures.

19

Sequential extraction of water soluble, 0.2 M NaOH soluble and 2 M NaOH soluble mucilage

Sequential extractions of different mucilage-enriched fractions were performed following the
protocol developed by Huang et al (2011). Briefly, 125 mg of WT and *stk* seeds were weighed

out and transferred to 2 ml test tubes before addition of 2 ML of water for 2 h. To facilitate 1 2 mucilage extrusion, the tubes were vortexed every 5 min during one hour. Water-extracted seeds were further sequentially extracted with 0.2 M and 2 M NaOH and stored at 4°C. The 3 material collected was used to perform comparative total and acidic sugar contents, as well as 4 compositional monosaccharide analyses. Mild and strong alkaline solutions were neutralized 5 with glacial acetic acid, dialyzed against water and lyophilized. All the fractions (6) were used 6 7 to quantify total, neutral and acidic sugar content, and to perform a monosaccharide compositional analysis (see the extended experimental procedures). 8

9

10 Atomic force microscopy in seeds

Four stk and five WT Arabidopsis thaliana developing seeds were analysed. They were 11 isolated from *stk* and WT independent siliques, at 2 DAP. After dissection, the silique was 12 mounted on double-sided tape, and the replum was gently removed with tweezers in order to 13 detach seeds without damaging them. Tape was placed on the bottom of a Petri dish filled 14 with water to prevent dehydration during AFM measurements. An optical microscope allowed 15 us to position the AFM cantilever at the desired location on seed epidermal surface for AFM 16 scanning. Details of AFM scanning and measurements are detailed in the extended 17 18 experimental procedures.

19

20 Accession numbers

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under the
following accession numbers: *SEEDSTICK*, At4g09960; *GL2*, At1g79840; *LUH/MUM1*,

At2g32700; *PMEI6*, At2g47670; *SBT1.7*, At5g67360; *BXL*, At5g49360; *SOS5*, At3g46550;
 CESA5 At5g09870; *FEI2*, At2g35620; *MYB61*, At1g09540.

3

4 AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: IE CM ENO LB. Performed the experiments: IE
CM ENO LB VEV AK. Analyzed the data: IE CM ENO LB. Contributed
reagents/materials/analysis tools: AB AD ACO EC LC. Wrote the paper: IE CM ENO AD
AB LC. All authors read and contributed to the finalization of the paper.

9

10 ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Edward Kiegle for assistance in preparing the manuscript and to 11 12 Ogier Surcouf for technical help. This work was supported by the International European Fellowship-METMADS project and the Centro Nazionale di Ricerca Italiano (Fondo IBF-13 AR-01-2014Mi) to I.E.; by the Cariplo Foundation (Seefruit grant number 2011-2257) to 14 C.M.; by Institut Universitaire de France to A.B; the Coordination for the Improvement of 15 Higher Education Personnel (CAPES) and EVO-CODE project to V.E.V.; l'Université de 16 Rouen and le Réseau de Recherche VASI de Haute Normandie (France) are also 17 acknowledged for their financial support to A.D. 18

1 **REFERENCES**

Arsovski, A. a, Popma, T.M., Haughn, G.W., Carpita, N.C., McCann, M.C., and Western,
T.L. (2009). AtBXL1 encodes a bifunctional beta-D-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase
required for pectic arabinan modification in Arabidopsis mucilage secretory cells. Plant

5 Physiol. 150, 1219–1234.

Baudry, A., Caboche, M., and Lepiniec, L. (2006). TT8 controls its own expression in a
feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a
strong and cell-specific accumulation of flavonoids in Arabidopsis thaliana. Plant J. 46, 768–
779.

Boudon, F., Chopard, J., Ali, O., Gilles, B., Hamant, O., Boudaoud, A., Traas, J., and Godin,
C. (2015). A Computational Framework for 3D Mechanical Modeling of Plant
Morphogenesis with Cellular Resolution. PLoS Comput. Biol. *11*, e1003950.

- 13 Brambilla, V., Battaglia, R., Colombo, M., Masiero, S., Bencivenga, S., Kater, M.M., and
- 14 Colombo, L. (2007). Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS box
- 15 factors support ovule development in Arabidopsis. Plant Cell *19*, 2544–2556.
- Bueso, E., Muñoz-Bertomeu, J., Campos, F., Brunaud, V., Martínez, L., Sayas, E., Ballester,
 P., Yenush, L., and Serrano, R. (2014). ARABIDOPSIS THALIANA HOMEOBOX25
- uncovers a role for Gibberellins in seed longevity. Plant Physiol. *164*, 999–1010.
- Cosgrove, D.J. (2001). Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards.
 Plant Physiol. *125*, 131–134.
- 21 Dean, G.H., Zheng, H., Tewari, J., Huang, J., Young, D.S., Hwang, Y.T., Western, T.L.,
- Carpita, N.C., McCann, M.C., Mansfield, S.D., et al. (2007). The Arabidopsis MUM2 gene
 encodes a beta-galactosidase required for the production of seed coat mucilage with correct
 hydration properties. Plant Cell *19*, 4007–4021.
- Gómez-Mena, C., de Folter, S., Costa, M.M.R., Angenent, G.C., and Sablowski, R. (2005).
 Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene AGAMOUS during early
 organogenesis. Development *132*, 429–438.
- Gregis, V., Sessa, A., Colombo, L., and Kater, M.M. (2008). AGAMOUS-LIKE24 and
 SHORT VEGETATIVE PHASE determine floral meristem identity in Arabidopsis. Plant J.
 56, 891–902.
- 31 Griffiths, J.S., Tsai, A.Y.-L., Xue, H., Voiniciuc, C., Sola, K., Seifert, G.J., Mansfield, S.D.,
- and Haughn, G.W. (2014). SALT-OVERLY SENSITIVE5 Mediates Arabidopsis Seed Coat
 Mucilage Adherence and Organization through Pectins. Plant Physiol. *165*, 991–1004.
- Harpaz-Saad, S., McFarlane, H.E., Xu, S., Divi, U.K., Forward, B., Western, T.L., and
 Kieber, J.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. Plant J. 68, 941–
 953.

- Haughn, G., and Chaudhury, A. (2005). Genetic analysis of seed coat development in
 Arabidopsis. Trends Plant Sci. 10, 472–477.
- Huang, J., DeBowles, D., Esfandiari, E., Dean, G., Carpita, N.C., and Haughn, G.W. (2011).
- 4 The Arabidopsis transcription factor LUH/MUM1 is required for extrusion of seed coat 5 mucilage. Plant Physiol. *156*, 491–502.
- Jolie, R.P., Duvetter, T., Van Loey, A.M., and Hendrickx, M.E. (2010). Pectin methylesterase
 and its proteinaceous inhibitor: a review. Carbohydr. Res. *345*, 2583–2595.
- 8 Keegstra, K. (2010). Plant cell walls. Plant Physiol. 154, 483–486.
- 9 Macquet, A., Ralet, M.-C., Kronenberger, J., Marion-Poll, A., and North, H.M. (2007a). In
- situ, chemical and macromolecular study of the composition of Arabidopsis thaliana seed coat
- 11 mucilage. Plant Cell Physiol. 48, 984–999.
- 12 Macquet, A., Ralet, M.-C., Loudet, O., Kronenberger, J., Mouille, G., Marion-Poll, A., and
- 13 North, H.M. (2007b). A naturally occurring mutation in an Arabidopsis accession affects a
- beta-D-galactosidase that increases the hydrophilic potential of rhamnogalacturonan I in seed
- 15 mucilage. Plant Cell *19*, 3990–4006.
- 16 Mendu, V., Griffiths, J.S., Persson, S., Stork, J., Downie, A.B., Voiniciuc, C., Haughn, G.W.,
- and DeBolt, S. (2011). Subfunctionalization of cellulose synthases in seed coat epidermal
- cells mediates secondary radial wall synthesis and mucilage attachment. Plant Physiol. 157,
- 19 441–453.
- 20 Mizzotti, C., Mendes, M.A., Caporali, E., Schnittger, A., Kater, M.M., Battaglia, R., and
- 21 Colombo, L. (2012). The MADS box genes SEEDSTICK and ARABIDOPSIS Bsister play a
- 22 maternal role in fertilization and seed development. Plant J. 70, 409–420.
- Mizzotti, C., Ezquer, I., Paolo, D., Rueda-Romero, P., Guerra, R.F., Battaglia, R., Rogachev,
 I., Aharoni, A., Kater, M.M., Caporali, E., et al. (2014). SEEDSTICK is a Master Regulator of
 Development and Metabolism in the Arabidopsis Seed Coat. PLoS Genet. *10*, e1004856.
- Müller, K., Levesque-Tremblay, G., Bartels, S., Weitbrecht, K., Wormit, A., Usadel, B.,
 Haughn, G., and Kermode, A.R. (2013). Demethylesterification of cell wall pectins in
 Arabidopsis plays a role in seed germination. Plant Physiol. *161*, 305–316.
- North, H.M., Berger, A., Saez-Aguayo, S., and Ralet, M.-C. (2014). Understanding
 polysaccharide production and properties using seed coat mutants: future perspectives for the
 exploitation of natural variants. Ann. Bot. *114*, 1251–1263.
- Peaucelle, A., Louvet, R., Johansen, J.N., Höfte, H., Laufs, P., Pelloux, J., and Mouille, G.
 (2008). Arabidopsis phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall
 pectins. Curr. Biol. *18*, 1943–1948.
- Peaucelle, A., Braybrook, S. a, Le Guillou, L., Bron, E., Kuhlemeier, C., and Höfte, H. (2011). Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in
- 37 Arabidopsis. Curr. Biol. 21, 1720–1726.

- Peaucelle, A., Braybrook, S., and Höfte, H. (2012). Cell wall mechanics and growth control in
 plants: the role of pectins revisited. Front. Plant Sci. *3*, 121.
- Pelloux, J., Rustérucci, C., and Mellerowicz, E.J. (2007). New insights into pectin
 methylesterase structure and function. Trends Plant Sci. 12, 267–277.
- Penfield, S., Meissner, R.C., Shoue, D.A., Carpita, N.C., and Bevan, M.W. (2001). MYB61 Is
 Required for Mucilage Deposition and Extrusion in the Arabidopsis Seed Coat. Plant Cell *13*,
 2777–2791.
- Pinyopich, A., Ditta, G.S., Savidge, B., Liljegren, S.J., Baumann, E., Wisman, E., and
 Yanofsky, M.F. (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and
 ovule development. Nature 424, 85–88.
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Kerhoas, L., Caboche, M., Loic Lepiniec, and Isabelle, D.
 (2005). TRANSPARENT TESTA10 Encodes a Laccase-Like Enzyme Involved in Oxidative
 Polymerization of Flavonoids in Arabidopsis Seed Coat. Plant Cell *17*, 2966–2980.
- Rautengarten, C., Usadel, B., Neumetzler, L., Hartmann, J., Büssis, D., and Altmann, T.
 (2008). A subtilisin-like serine protease essential for mucilage release from Arabidopsis seed
- 16 coats. Plant J. *54*, 466–480.
- Saez-Aguayo, S., Ralet, M.-C., Berger, A., Botran, L., Ropartz, D., Marion-Poll, A., and
 North, H.M. (2013). PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR6 Promotes Arabidopsis
- Mucilage Release by Limiting Methylesterification of Homogalacturonan in Seed Coat
- 20 Epidermal Cells. Plant Cell 25, 308–323.
- Schlereth, A., Möller, B., Liu, W., Kientz, M., Flipse, J., Rademacher, E.H., Schmid, M.,
 Jürgens, G., and Weijers, D. (2010). MONOPTEROS controls embryonic root initiation by
 regulating a mobile transcription factor. Nature 464, 913–916.
- 24 Seymour, G.B., and Knox, J.P. (2002). Pectins and Their Manipulation.
- Skinner, D.J., Hill, T.A., and Gasser, C.S. (2004). Regulation of Ovule Development. Plant
 Cell *16*, S32–S45.
- Sullivan, S., Ralet, M.-C., Berger, A., Diatloff, E., Bischoff, V., Gonneau, M., Marion-Poll,
 A., and North, H.M. (2011). CESA5 is required for the synthesis of cellulose with a role in
 structuring the adherent mucilage of Arabidopsis seeds. Plant Physiol. *156*, 1725–1739.
- Tilly, J.J., Allen, D.W., and Jack, T. (1998). The CArG boxes in the promoter of the
 Arabidopsis floral organ identity gene APETALA3 mediate diverse regulatory effects.
 Development *125*, 1647–1657.
- Verwoerd, T., Dekker, B., and Hoekema, A. (1989). A small-scale procedure for the rapid
 isolation of plant RNAs. Nucleic Acids Res *17*, 2362.
- Voiniciuc, C., Dean, G.H., Griffiths, J.S., Kirchsteiger, K., Hwang, Y.T., Gillett, A., Dow, G., Western, T.L., Estelle, M., and Haughn, G.W. (2013). Flying saucer1 is a transmembrane

- RING E3 ubiquitin ligase that regulates the degree of pectin methylesterification in
 Arabidopsis seed mucilage. Plant Cell 25, 944–959.
- Western, T.L. (2012). The sticky tale of seed coat mucilages: production, genetics, and role in
 seed germination and dispersal. Seed Sci. Res. 22, 1–25.
- Western, T.L., Skinner, D.J., and Haughn, G.W. (2000). Differentiation of mucilage secretory
 cells of the Arabidopsis seed coat. Plant Physiol. *122*, 345–356.
- Willats, W.G., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H.C., van Alebeek, G.J., Voragen, a G.,
 Marcus, S.E., Christensen, T.M., Mikkelsen, J.D., Murray, B.S., et al. (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. J. Biol.
 Chem. 276, 19404–19413.
- Windsor, J.B., Symonds, V. V, Mendenhall, J., and Lloyd, A.M. (2000). Arabidopsis seed
 coat development: morphological differentiation of the outer integument. Plant J. 22, 483–
 493.
- Yang, X., Baskin, J.M., Baskin, C.C., and Huang, Z. (2012). More than just a coating:
 Ecological importance, taxonomic occurrence and phylogenetic relationships of seed coat
 mucilage. Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst. *14*, 434–442.
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T.T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X., and Schmid, M.
 (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in Arabidopsis by the
 bifunctional transcription factor APETALA2. Plant Cell 22, 2156–2170.
- 21

22

1 FIGURE AND TABLE LEGENDS

Figure 1. Visualization of *pSTK::STK-GFP* fluorescence, water and EDTA-treated seed mucilage extrusion, and seed surface morphology

(A-B) Confocal laser-scanning imaging of the *pSTK::STK-GFP* line in developing ovules (A)
and in seeds (B) at the linear cotyledon stage. STK-GFP signal is expressed in the ovule outer
integuments and in the epidermal outer layer of the SC, most likely in the center of each
epidermal cell.

8 (C-F) Whole-mounted WT and *stk* mutant seeds stained with ruthenium red. Seeds were 9 treated with water (C-D) and EDTA (E-F). *stk* mutant seeds are defective in mucilage 10 extrusion.

(G-L) Scanning electron microscopy (SEM) of dried, water- and EDTA-treated WT and *stk*mutant seeds. G, J: surface of dried WT (G) and *stk* mutant (J) seeds. H, K: water-imbibed
WT (H) and *stk* mutant (K) seeds. I, L: EDTA-imbibed WT (I) and *stk* mutant (L) seeds.
mi, micropyle; fu, funiculus.

15 Scale bars = $30 \ \mu m$ (A, C-F), $150 \ \mu m$ (B) and $20 \ \mu m$ (G-L).

16

Figure 2. Determination of sugar content of water, 0.2 M NaOH and 2 M NaOH mucilage-enriched fractions of the *Arabidopsis stk* seeds

Seeds were sequentially treated with water, 0.2 M NaOH and 2 M NaOH. Neutral and acidic
sugar content was determined by colorimetric assays. Error bars represent SD values of four
independent extractions.

22

23 Figure 3. Effects of STK on seed germination on media containing polyethylene glycol

Comparison of the germination rate of the WT (A) and *stk* (B) on increasing concentrations of
 PEG during a 7-day time course. Data points represent average and SD of three independent
 experiments in both panels.

4

Figure 4. STK impacts on biochemical and molecular pathways involved in pectin metabolism and mucilage extrusion, in mucilage secretory cells

(A-H) Inmunolabelling of partially un-esterified and methyl-esterified HG inner adherent
mucilage released from WT (A, C, E, G) and *stk* (B, D, F, H) and visualized by confocal
microscopy. Whole-mounted mature seeds imbibed in water (A, B, E, F) and subsequently
treated with 0.2 M NaOH (C, D, G, H) were labeled with the mAbs LM19 (A-D), and LM20
(E-H), which recognizes low-esterified HGs and highly methyl-esterified HGs respectively.

Note that *stk* mutant seeds remained un-labeled by LM19 mAb (suggesting the absence of unesterified HG in its adherent, inner mucilage), when compared to the WT. However, *Stk* mutant seeds displayed a weaker, irregular labeling with LM20, when compared to the WT.

(I) Analysis of *PMEI6* and *STK* expression in WT and *stk* developing siliques from 3 to 6
DAP. Relative mRNA levels indicate that the expression of *PMEI6* is down-regulated in the
absence of *STK*. Error bars represent the propagated error value of three replicates.

(J) Confocal laser-scanning imaging of WT and a *stk* seed expressing *pPMEI6::PMEI6-GFP*at the linear cotyledon stage. Protein is visible and expressed in the epidermal outer layer of
the SC, likely in WT SC epidermal cell. This signal is not present in *stk* background.

(K) Schematic representation of the location of putative CArG boxes in the *PMEI6* locus.
Note the presence of five MADS-recognition motifs CArG boxes. ChIP enrichment assay
showed that SEEDSTICK binds to two CArG box regions (asterisk; see also below). White
boxes: exons; triangles indicate CArG boxes.

(L) ChIP enrichment tests by qRT-PCR show that STK-GFP binds to the selected regions of *PMEI6* containing CArG boxes 1, 2 and 4. Fold enrichment was calculated against signal in
WT. Error bars represent the propagated error value using three replicates. The binding of
STK to the *VERDANDI* (*VDD*) promoter (see experimental procedures) was used as a positive
control.

6 Scale bars for (A-H and J) = $100 \ \mu m$

7

8 Figure 5. STK impact on biochemical and molecular pathways involved in cellulose 9 synthesis and mucilage extrusion, in mucilage secretory cells

(A-F) Cellulose staining of water-imbibed and 0.2 M NaOH-imbibed WT and *stk* seeds.
Confocal imaging using Calcofluor dye of whole-mounted WT (A, C, E) and *stk* (B, D, F)
seeds observed after water (A-B) and 0.2 M NaOH imbibition (C-F). Detail SC labelling with
0.2 M NaOH is presented in E and F, magnification of WT and *stk* respectively.

(G) Analysis of *CESA5*, *FEI2* and *SOS5* expression in developing siliques of WT and *stk*plants from 3 to 6 DAP. Relative mRNA levels indicate that *CESA5* and *FEI2* are downregulated in the mutant. *SOS5* expression levels are not significantly different. Error bars
represent the propagated error value using three replicates.

(H) Schematic representation of CArG box locations in the *CESA5* locus. Note the presence
of up to 8 MADS-recognition motif CArG boxes. A ChIP enrichment assay showed that
SEEDSTICK binds to the CArG box 4 region (asterisk; see also below). White boxes: exons;
triangles indicate CArG boxes.

(I) ChIP enrichment tests by qRT-PCR show that STK-GFP binds to the selected region of the
 CESA5 locus containing CArG box 4. Fold enrichment was calculated versus signal in WT
 background. Error bars represent the propagated error value using three replicates. As a

positive control, we tested the binding of STK to the *VERDANDI* (*VDD*) promoter (see
experimental procedures).

- 3 Scale bars for $(A-F) = 50 \ \mu m$
- 4

Figure 6. Average elastic moduli of the epidermal seed CW of WT and *stk* developing
seeds

Each square represents the average per seed of over 300 force-curves, with the associated
standard deviation. More than 300 curves per seed were analyzed, allowing the computation
of an average apparent elastic modulus and of its standard deviation (SD) for each seed. These
modulus most likely accounts for the properties in the direction perpendicular to the CW (see
experimental procedures).

12

Figure 7. Schematic model integrating STK regulation and action into developmental processes in seed coat epidermal cells

The transcription factor STK promotes a complex regulatory network involving pectin 15 maturation and cellulose synthesis, driving the strengthening of the CW in the SC. STK 16 promotes the methyl-esterification status of the cell wall in the SC. STK represses players 17 involved in pectin maturation like LUH, BXL, SBT1.7 and MUM2. As a transcription factor, 18 LUH appears to oppose STK function since they repress each other's activity. At the same 19 time, STK promotes the expression of the inhibitor PMEI6, via direct control. This could 20 explain the low PMEI6 transcript levels and the parallel lack of high and moderated 21 methylesterified pectines in stk seeds. This results on higher levels of demethylesterified HG, 22 thereby exposing more negative charges, are involved in Ca²⁺ binding that might, directly or 23 indirectly, strengthen the CW. The effects of induced stiffness in the SC might delay primary 24 cell wall rupture with the described consequences in mucilage swelling. STK may play a 25

parallel role in the positive regulatory control of cellulose synthesis by the *FEI2-CESA5* pathway. STK directly controls *CESA5* and does not induce changes in *SOS5* expression. STK promotes cellulose deposition to fulfill the need for a structural link required for the assembly/organization of pectin in SC epidermal cell wall. The formation of this matrix may require the pectin matrix to be organized around cellulose rays in the columella.

- 6
- 7

8 SUPPLEMENTAL INFORMATION

9 Supplemental information includes extended experimental procedures, 5 supplemental figures
10 and 2 supplemental tables.

11





















Figure В С D E F G Η I 1,4 1,2 Normalized expression 1 0,8 0,6 0,4 0,2 0 wt = stk

PMEI6



J

pPMEI6::PMEI6-GFP



stk/stk x pPMEI6::PMEI6-GFP



Figure 5









Figure 6







SUPPLEMENTAL INFORMATION

SUPPLEMENTAL FIGURES AND LEGENDS



Figure S1: Seed swelling and mucilage extrusion properties of the *stk* seeds.

(A-B) 125 mg of WT and *stk* seeds were sequentially treated for 2 hours in water, in 0.2 M NaOH and 2 M NaOH and extracted residues were used for monosaccharide quantification.

(A) Visualization of swelling properties of WT and *stk*. 125 mg of both WT and *stk* dried seeds initially occupy the same volume.

(B) Visualization of extruded mucilage in WT and *stk* water-, 0.2 M NaOH- and 2 M NaOH-treated seeds. Seeds were stained with ruthenium red after each treatment.

Scale bars = $100 \ \mu m$



Figure S2. STK regulates the expression of MYB61, MUM2, SBT1.7 and LUH/MUM1.

(A) Analysis of *MYB61*, *MUM2*, *SBT1.7* and *LUH/MUM1* expression in WT and *stk* developing siliques from 3 to 6 DAP. Relative mRNA levels indicate that the expression of all four genes is upregulated in the absence of the STK. Error bars represent the propagated error value using three replicates.

(B) quantitative RT-PCR analysis of the ChIP-enriched, CArG-box regions associated to *SBT1.7*, *MUM2*, *MYB61* and *LUH* loci, in WT and *pSTK::STK-GFP* lines. The results indicated that relative levels of *MUM2-*, *MYB61-* and *LUH-*loci associated CArG-boxes were not affected in the *pSTK::STK-GFP* with respect to WT. Only the relative levels of *SBT1.7-*locus associated CArG-box slightly increased in the *pSTK::STK-GFP*, when compared to the WT. Fold enrichment was calculated against signal in WT background. Three independent ChIP assays were performed. Error bars represent the propagated error value using three replicates. As a positive control, we tested the binding of STK to the *VERDANDI* (*VDD*) promoter (Matias-Hernandez et al., 2010).



Figure S3. Gene expression analysis of STK in Arabidopsis luh and gl2 mutant.

qRT-PCR analysis of the expression of *STK* in WT and *luh* and *gl2* mutant developing siliques from 3 to 6 DAP. Relative mRNA levels indicate that the expression of *STK* is up-regulated in the *luh* siliques when compared to the WT. *STK* transcript levels were not significantly different in *gl2* compared to WT. Error bars represent the propagated error value using three replicates.





Bright-field images of WT and *stk* water-imbibed seeds, and 0.2 M NaOH-imbibed seeds corresponding to the Calcofluor dye-stained seeds presented in Figure 5.

Scale bars = $50 \ \mu m$









(A) Image taken with an optical microscope in order to position the AFM cantilever at the desired location on seed epidermal surface for AFM scanning.

(B-C) Topographical reconstruction of measured seed surfaces, as estimated by AFM point-ofcontact, with the height maps of *stk* (B) and WT (C) respectively.
Table S1. Monosaccharide distribution in mole percentage of carboxyl-reduced mucilage polysaccharides from seeds successively extracted with water 0.2 M NaOH and 2 M NaOH.

Extract	Water		0.2 M NaOH		2 M NaOH	
	wt	stk	wt	stk	wt	stk
Ara	1.49 ± 0.22	1.59 ± 0.3	2.04 ± 0.45	1.14 ± 0.08	5.3 ± 1.11	5.97 ± 1.76
Rha	35.57 ± 1.6	35.53 ± 1.64	17.39 ± 1.73	27.07 ± 1.03	50.22 ± 4.21	60.88 ± 6.7
Fuc	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.18 ± 0.07	0.33 ± 0.06
Xyl	1.46 ± 0.03	1.55 ± 0.16	1.27 ± 0.13	1.54 ±	4.45 ± 0.89	4.08 ± 1.51
Gal A	60.31 ± 1.9	60.05 ± 1.86	25.15 ± 1.38	44.18 ± 1.23	30.23 ± 1.49	14.42 ± 1.6
Glc UA	0.19 ± 0.11	0.06 ± 0.08	0.95 ± 0.13	0.088 ± 0.18	0	6.36 ± 5
Man	0.00	0	0.17 ± 0.34	0	0	0.78 ± 0.34
Gal	0.96 ± 0.08	1.33 ± 0.67	12.74 ± 0.80	8.44 ± 0.47	9.62 ± 1.8	7.18 ± 2.31
Glc	0.3 ± 0.025	0.15 ± 0.26	40.14 ± 2.38	17.46 ± 1.66	0	0

Monosaccharide distribution in mole % of extracted mucilage polysaccharides from seeds successively treated with water, 0.2M NaOH, and 2.0 M NaOH, The error bars represent SD values from four independently extracted samples from two biological repeats. Ara, arabinose; Rha, rhamnose; Fuc, fucose; Xyl, xylose; GalA; galacturonic acid; Glc UA; glucuronic acid, Man, mannose; Gal, galactose; Glc, glucose.

Table S2. List of primers used for the ChIP-PCR experiments and the qRT-PCR experiments.

Primers for ChIP experiment			
ACT7	5'-CGTTTCGCTTTCCTTAGTGTTAGCT-3'		
	5'-AGCGAACGGATCTAGAGACTCACCTTG-3'		
VDD	5'-GGAAATATGACGCTTGTCTTTTTAG-3'		
carg3	5'-CAGAAACAGCAATATGCTCGTG-3'		
PMEI6	5'-TTGATTCGGACCCCCTAGGTATCTC -3'		
carg 1-2	5'-GAGGAAGCAAGAGAAAGGTGAGAAGC -3'		
PMEI6	5'-TCTCTCTCGATCTCCATTTG -3'		
carg 4	5'-AGAGTAAACGTGATAGGAGA -3'		
CESA 5	5'-AAAGTTTGTGTCGGTGGGGA -3'		
carg4	5'-AGCAGAGAATTATGAGAAACACACA -3'		
MYR61	5'-TTGAAGCGTGTTTTATACGTCA -3'		
milb01	5'-ATTGCGTTCATCATTGTTCTTC -3'		
SBT17	5'-TAGAACAGTTTTGGAGAGCC -3'		
5011.7	5'-TGACTCACGAATGCATTACG -3'		
	5'-GCAAAACCTCAACACCTAGG -3'		
MUMZ	5'-AATGGTCCAATCTTGTTTTG -3'		
1 1 111	5'-GGCAGGGACATTCCTCAAATGT -3'		
LUH	5'-CTGATAGCCACCGATGACCAAGAG -3'		
Primers for e	expression analysis experiment		
ACT8	5'-CTCAGGTATTGCAGACCGTATGAG-3'		
	5'-CTGGACCTGCTTCATCATACTCTG-3'		
UBQ	5'-CTGTTCACGGAACCCAATTC-3'		
	5'-GGAAAAAGGTCTGACCGACA-3'		
SAND	5'-CAGACAAGGCGATGGCGATA-3'		
	5'-GCTTTCTCTCAAGGGTTTCTGGGT-3'		
PP2a	5'-CAGCAACGAATTGTGTTTGG-3'		
	5'-AAATACGCCCAACGAACAAA-3'		
PMEI6	5'-GAGATCGCTTATCTGCCGCT-3'		
	5'-CGTGGACTCTCTCGACAACC-3'		
CESA5	5'-CTCATTTTCCTGACCCCGCT-3'		
	5'-CCATACGATCCTTCCACGCA-3'		
MYB61	5'-ACTCGCTGGTTTGCAGAGAT-3'		
	5'-GTGTTTGGGTCAATGCCTCT-3'		
SBT1.7	5'-AGGCCGGAACCAATTTCACCGC -3'		
	5'-ACGAGCTGTTCCTGAAGCGTAGC-3'		
MUM2	5'-ACCCTGCACGAACCCGTCTATC-3'		
1101112	5'-CAGAGTCCGGTAGACCAACCATGC-3'		
LUH	5'-GGGCTTTTATTCAGCAGCTCG-3'		
	5'-AGCATCITGTCAGCTTCCCAA-3'		
FEI2	5'-GCAGCAGCGCTTCATTAGAC-3'		
	5'-CCGGAGGCTGTTCTTTCAGA-3'		
SOS5	5'-GCGACGTTGAAGTTGTGTCC-3'		
	5'-CGCATCGGAGACTCTCACTC-3'		

EXTENDED EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chromatin immuno-precipitation (ChIP) assay

The genomic regions located 3 kb upstream of the ATG, 1 kb downstream of the stop codon and in the exons and introns of the selected genes were analyzed to identify the CArG-box sequences allowing up to one mismatch. ChIP experiments were performed as a modified version of a previously reported protocol (Gregis et al., 2008) using a GFP polyclonal antibody (Living Colors Polyclonal antibody raised in rabbit, Clontech, cat no. 632460). Enrichment of the target region was determined using a Sybr Green Assay (iQ_ SYBR Green Supermix; Bio-Rad). The qRT-PCR assay was conducted in triplicate and was performed in a Bio-Rad iCycler iQ optical system (software version 3.0a). Relative enrichment was calculated by normalizing the amount of immunoprecipitated DNA against an ACTIN7 (ACT7) fragment and against total INPUT DNA. In particular, for the binding of STK to the selected genomic regions, the affinity of the purified sample obtained from pSTK::STK-GFP inflorescence and siliques was compared to the affinity-purified sample obtained from WT inflorescence and siliques, which was used as a control. To determine the efficiency of the Chromatin immunoprecipitations we used the third CArG-box of VDD as a positive control (Matias-Hernandez et al., 2010). Three independent ChIP assays were performed. Fold enrichment was calculated using previously reported formulas (Matias-Hernandez et al., 2010). Sequences of oligonucleotides used for ChIP analyses are listed in Table S2.

Quantitative real-time PCR analysis

qRT-PCR experiments were performed on cDNA obtained from 3 to 6 DAP siliques. Total RNA was extracted using the LiCl method (Verwoerd et al., 1989). DNA contamination was removed using the Ambion TURBO DNA-free DNase kit according to the manufacturer's instructions

(http://ambion.com/). The treated RNA was subjected to reverse transcription using the ImProm-IITM reverse transcription system (Promega). Diluted aliquots of the reverse-transcribed cDNAs were used as templates in the qRT-PCR reactions containing the iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). The qRT-PCR assay was conducted in triplicate and was performed in a Bio-Rad iCycler iQ Optical System (software version 3.0a). Relative transcript enrichment of genes of interest was calculated by normalizing the amount of mRNA against different house-keeping genes (ubiquitin, actin, PPa2 and SAND (Hong et al., 2010)). The $2^{-\Delta\Delta C}_{T}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) was used to analyze the data. The primers used are listed in Table S2.

Determination of acidic and neutral sugar content

For the determination of uronic acid content, we followed the protocol described by Filisetti-Cozzi and Carpita (1991). Lyophilized material was dissolved in 2 mL of distilled water, and 0.4 mL was transferred into 10 mL glass tubes. 40 µl of 4 M sulfamic acid-potassium sulfamate (pH 1.6) was added, mixed thoroughly, before a final addition of 2.4 mL of 96% H₂SO₄ solution containing 75 mM sodium tetraborate. The tubes were stirred vigorously, heated at 100°C for 20 min in a boiling water bath, and then placed in an ice bath. After cooling, 80 µl of 0.15% (w/v) m-hydroxy-diphenyl in 0.5% (w/v) NaOH was added, the tubes were vortexed, and the absorbance was read at 525 nm. A standard curve was prepared using galacturonic acid. For the determination of total sugar content, we performed an anthrone-sulfuric acid assay. 0.4 mL of freshly re-solubilized material was transferred to 10 mL glass tubes, and the tubes transferred onto ice. 2 mL of 75% H₂SO₄ solution was added to each sample. The tubes were capped, vortexed, and 4 mL of a chilled 0.2% (w/v) anthron solution in 75% H₂SO₄ were added. Tubes were again vortexed, and heated at 100°C for 20 min. Tubes were cooled at room temperature, and the absorbance read at 578 nm. A standard curve was made with glucose. Both assays were applied to the different mucilage-enriched fractions collected.

Monosaccharide compositional analysis of the different mucilage-enriched fractions

A gas liquid chromatography method (Nguema-ona et al., 2006; Nguema-Ona et al., 2012; York et al., 1985) was used to determine the monosaccharide content of the different mucilage-enriched fractions. Approximately 0.5 - 1 mg of mucilage was hydrolyzed (2 M TFA, 110°C, 2 h) and the liberated monosaccharides converted to methoxy sugars using 1 M methanolic HCl at 80°C for 24 h. Silylation was performed at 80°C (20 min) to produce trimethyl-silyl-glycosides which were dissolved in cyclohexane. The derivatives were separated and analyzed in a Varian 3500 gas chromatographer, equipped with a flame ionization detector (FID), and a 30 m × 0.25 mm (i.d.) HPS-MS column. The oven temperature program was stabilized at 120°C for 2 min, ramped at 10°C/min to 160°C, then at 1.5°C/min to 220°C and finally at 20°C/min to 280°C. Myo-inositol (0.5 μ mol) was used as the internal standard. Derivatives were identified based on their retention time and quantified by determination of their peak areas. Monosaccharides (from Sigma-Aldrich) were used as standards to determine the retention time of the nine main monosaccharides found in plant CW. The sugar composition was expressed as mole percentage of each monosaccharide. Error bars in the histograms represent the standard deviation of the mean of two biological samples and two technical replicates per biological sample.

Cytochemical staining and immunolabeling procedures

Bright-field microscopy was used to observe whole-mounted seeds, stained with 0.05% (w/v) ruthenium red dye (Sigma-Aldrich) in deionized water for 15 min. After the staining, the seeds were gently washed in deionized water and observed, according to Durand et al (2009). Staining of β -glucans including cellulose, was performed using Calcofluor White M2R (Sigma-Aldrich; 1 mg/ml) for 30 min in the dark (Andème-Onzighi et al., 2002). After having been gently washed in deionized water, seeds were observed using a microscope equipped with a UV lamp (excitation filter, 359 nm;

barrier filter, 461 nm). Images were acquired with a Leica DFC 300 FX camera and fluorescence microscope. Laser scanning confocal microscopy was used to observe whole-mounted seeds, labeled with either with the LM19 or the LM20 mAbs (Verhertbruggen et al., 2009; Plant Probes, Leeds, UK). The immunolabelling protocol was performed according to (Macquet et al., 2007), with minor modifications. Briefly, intact mature seeds were imbibed in water without shaking for 30 min at room temperature, and then fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde for 1 h. Seeds were then incubated for 2 h at room temperature, or overnight with the primary antibody diluted 10-fold in PBS containing 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA). Then washed with PBS (three time, 3 min per wash), and finally incubated for 2 h at 37°C with the secondary, goat anti-rat-IgG antibody coupled to fluorescein isothiocyanate (Sigma-Aldrich), diluted 1:5000 in PBS 1% (w/v) BSA. After washing in PBS (three times, 3 min per wash), seeds were mounted on slides. An anti-fading agent (Citifluor; Agar Scientific) was incorporated before examination. For the labeling of 0.2 M NaOH-treated seeds, a similar protocol was followed, except that seeds were successively imbibed in water and 0.2 M NaOH.

Measurement of the elastic (Young's) modulus of the CW by AFM and analysis of data

A Bruker Catalyst Atomic Force Microscope was used, in the Quantitative Nanomechanical Property Mapping (QNM) mode that allows acquisition of AFM force curves on a two-dimensional grid of points. All the force-curves are stored and can be extracted for fitting. We used cantilevers with a pyramidal tip from Bruker (Scanasyst-air, nominal stiffness 0.4 N/m). The spring constant was calibrated before each experiment using the thermal tune mode and was found to be in the range between 0.16 and 0.47 N/m. All measurements were done in water. The positioning of the cantilever on each seed was made using an upright Leica microscope (MacroFluo). We chose seeds that seemed to be well positioned on their side, and placed the cantilever tip above the center. 60 μ m x 60 μ m scans were performed, using default QNM parameters (a scan rate of 0.5Hz per line, 128x128 pixels,

ScanAsyst Auto Control On). The typical maximal force applied was 20 nN, resulting in typical maximal indentation depth ranging from 0.1 μ m (*stk*) to 0.4 μ m (WT) depending on the seed. The AFM force curves chosen for analysis were extracted from regions in the middle of centrally located cells (2 to 3 successive box selections). The fit was applied using Bruker's NanoScope Analysis software. In order to extract the mechanical properties of the CW (Milani et al., 2011), we analyzed force-displacement curves between contact and 100 nm depth. As the tip is pyramidal, we applied a Sneddon fit on the curves (Milani et al., 2014). Because the Sneddon fit to the retract curves was more robust than fit to the extend ones, we chose to analyze the retract curves, and possible adhesion was taken into account. Only the fits with a coefficient of determination R² higher than 0.99 were considered, which was the case most of the time. More than 300 curves per seed were analyzed, allowing the computation of an average apparent elastic modulus and of its standard deviation (SD) for each seed. This modulus most likely accounts for the properties in the direction perpendicular to the CW (Milani et al., 2011).

SUPPLEMENTAL REFERENCES

Andème-Onzighi, C., Sivaguru, M., Judy-March, J., Baskin, T.I., and Driouich, A. (2002). The reb1-1 mutation of Arabidopsis alters the morphology of trichoblasts, the expression of arabinogalactan-proteins and the organization of cortical microtubules. Planta *215*, 949–958.

Durand, C., Vicré-Gibouin, M., Follet-Gueye, M.L., Duponchel, L., Moreau, M., Lerouge, P., and Driouich, A. (2009). The organization pattern of root border-like cells of Arabidopsis is dependent on cell wall homogalacturonan. Plant Physiol. *150*, 1411–1421.

Filisetti-Cozzi, T.M., and Carpita, N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. Anal. Biochem. *197*, 157–162.

Gregis, V., Sessa, A., Colombo, L., and Kater, M.M. (2008). AGAMOUS-LIKE24 and SHORT VEGETATIVE PHASE determine floral meristem identity in Arabidopsis. Plant J. *56*, 891–902.

Hong, S.M., Bahn, S.C., Lyu, A., Jung, H.S., and Ahn, J.H. (2010). Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in Arabidopsis. Plant Cell Physiol. *51*, 1694–1706.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method. Methods 25, 402–408.

Macquet, A., Ralet, M.-C., Kronenberger, J., Marion-Poll, A., and North, H.M. (2007). In situ, chemical and macromolecular study of the composition of Arabidopsis thaliana seed coat mucilage. Plant Cell Physiol. *48*, 984–999.

Matias-Hernandez, L., Battaglia, R., Galbiati, F., Rubes, M., Eichenberger, C., Grossniklaus, U., Kater, M.M., and Colombo, L. (2010). VERDANDI is a direct target of the MADS domain ovule identity complex and affects embryo sac differentiation in Arabidopsis. Plant Cell *22*, 1702–1715.

Milani, P., Gholamirad, M., Traas, J., Arnéodo, A., Boudaoud, A., Argoul, F., and Hamant, O. (2011). In vivo analysis of local wall stiffness at the shoot apical meristem in Arabidopsis using atomic force microscopy. Plant J. *67*, 1116–1123.

Milani, P., Mirabet, V., Cellier, C., Rozier, F., Hamant, O., Das, P., and Boudaoud, A. (2014). Matching Patterns of Gene Expression to Mechanical Stiffness at Cell Resolution through Quantitative Tandem Epifluorescence and Nanoindentation. Plant Physiol. *165*, 1399–1408.

Nguema-ona, E., Andème-Onzighi, C., Aboughe-angone, S., Bardor, M., Ishii, T., Lerouge, P., and Driouich, A. (2006). The reb1-1 Mutation of Arabidopsis. Effect on the Structure and Localization of Galactose-Containing Cell Wall Polysaccharides. Plant Physiol. *140*, 1406–1417.

Nguema-Ona, E., Moore, J.P., Fagerström, A., Fangel, J.U., Willats, W.G.T., Hugo, A., and Vivier, M. a. (2012). Profiling the main cell wall polysaccharides of tobacco leaves using high-throughput and fractionation techniques. Carbohydr. Polym. *88*, 939–949.

Verhertbruggen, Y., Marcus, S.E., Haeger, A., Ordaz-Ortiz, J.J., and Knox, J.P. (2009). An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. Carbohydr. Res. *344*, 1858–1862.

Verwoerd, T., Dekker, B., and Hoekema, A. (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. Nucleic Acids Res *17*, 2362.

York, W., Darvill, A., McNeil, M., Stevenson, T., and Albersheim, P. (1985). Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. Methods in Enzymology 1985, 118: 3-40. Methods Enzymol. *118*, 3–40.

Annexe 1 : Article 3 (Revue) publiée dans Plant Science Today (2015)

O-glycosylation in plant and mammal cells: the use of chemical inhibitors to understand the biosynthesis and function of O-glycosylated proteins

Ludovic Mewono, Eric Nguema-Ona, Maxime Gotté, <u>Abdul Salam Koroney</u>, Marie-Laure Follet Gueye, Azeddine Driouich, Maïté Vicré-Gibouin, Sophie Aboughe-Angone

La glycosylation correspond à une modification post-traductionnelle essentielle chez les eucaryotes qui consiste à l'ajout d'oligosaccharides pendant le processus de biosynthèse de protéines qui peuvent être membranaires ou sécrétées. Les protéines ayant subi une glycosylation sont appelées des glycoprotéines.

Deux types de glycosylation sont principalement étudiés, la N-glycosylation et la Oglycosylation. La N-glycosylation correspond à l'ajout d'un glycane sur un résidu asparagine au sein d'une séquence consensus Asn-X-Serine/Thréonine, où X peut correspondre à n'importe quel acide aminé en dehors de la proline. Quant à la O-glycosylation elle correspond à l'ajout d'un glycanne sur le groupement hydroxyle d'une sérine, d'une thréonine, d'une hydroxylysine ou d'une hydroxyproline (Hyp) (Gomord *et al.*, 2010).

Un tiers des médicaments commercialisés actuellement sont des glycoprotéines. En effet la glycosylation permet de disposer de protéines fonctionnelles à travers l'ajout de sucres spécifiques tels que l'acide sialique qui contrôle la demi-vie des glycoprotéines formées.

Cette revue s'est principalement intéressée à la O-glycosylation, la N-glycosylation étant largement étudiée dans la littérature. Chez les plantes, les protéines riches en hydroyprolines (HRGP) constituent les principales protéines O-glycosylées. Les HRGP sont constituées d'AGP, d'extensines et des protéines riches en prolines (PRPs) (Showalter *et al.*, 2010). Chez les animaux, la majorité des glycanes résultant de la O-glycosylation sont de type mucine. Ceux-ci forment un groupe très hétérogène de glycoprotéines et sont classés en fonction de la structure de leur core glycannique.

Dans cette revue, nous avons fait une synthèse des différentes molécules chimiques susceptibles de perturber la O-glycosylation chez les plantes et les animaux.

REVIEW ARTICLE

O-glycosylation in plant and mammal cells: the use of chemical inhibitors to understand the biosynthesis and function of *O*-glycosylated proteins

Ludovic Mewono³, Eric Nguema-Ona², Maxime Gotté², Abdul Salam Koroney², Marie-Laure Follet Gueye², Azeddine Driouich², Maïté Vicré-Gibouin², Sophie Aboughe-Angone¹

Abstract

Glycosylation the common is most posttranslational modification of proteins and consists of the addition of sugar moiety to proteins. The resulting glycosylated proteins are often secreted to the extracellular compartment or integrated into different cell organelles. This modification was identified in plant as well as in mammalian cells. A number of plant and mammal proteins are either N- or O-glycosylated. This review focuses on O-glycosylation which refers to linkage of a glycan to hydroxyl group of serine, threonine or proline residues. O-glycosylation can be altered by the action of chemical inhibitors. For instance. 3,4-dehydro-L-proline, ethyl 3,4-dehydroxy benzoate and α,α -dipyridyl inhibit the activity of prolyl4-hydroxylase, a key enzyme

Received: 31 May 2014 Accepted revised version: 18 July 2014 Published online: 01 April 2015

© Mewono et al. (2015)

Publisher: Horizon e-Publishing Group

CITATION

Mewono, L., E. N. Maxime Gotté, A. S. Koroney, M. F. Gueye, A. Driouich, M. Vicré-Gibouin, and S. Aboughe-Angone. 2015. O-glycosylation in plant and mammal cells: the use of chemical inhibitors to understand the biosynthesis and function of O-glycosylated proteins. Plant Science Today 2(2): 43-51. doi: 10.14719/pst.2015.2.2.67

AUTHORS' AFFILIATION

- 1 Institut de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelle CENAREST, BP: 5011 Libreville (Gabon)
- 2 Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, EA4358, GRR VASI PRES Normandie Université, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France
- 3 Groupe de recherche en immunologie et microbiologie appliquée (GRIMA), Département des Sciences de la Vie et de la Terre-Ecole Normale Supérieure, BP: 17009 Libreville

CORRESPONDENCE

🖾 Sophie Aboughe Angone Email: sophie.aboughe@gmail.com

ISSN: 2348-1900

for plant *O*-glycosylation. In addition, a small molecule inhibitor designated 1-68A inhibits the polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases of mammalian cells. The aim of this review is to summarize the role and mechanism of action of these inhibitors of *O*-glycosylation and their impact on cell development in plants and mammals.

Keywords: *O*-glycosylation; 3,4-dehydro-L-proline; 3,4-dehydroxybenzoate; prolyl-hydroxylase; N-acetyl-galactosaminyltransferases; α, α -dipyridyl

Abbreviations:

PTM: posttranslational modification ER: endoplasmic reticulum HRGPs: hydroxyproline-rich glycoproteins AGPs: arabinogalactan-proteins Hyp: hydroxyproline P4-Hs: prolyl-4-hydroxylases Ser/Thr: serine/threonine GalNAc-Ts: N-acetylgalactosaminyltransferases 3,4-DHP: 3,4-dehydro-L-proline 3,4-EDHB: ethyl-3,4-dehydroxy benzoate DP: α,α -dipyridyl GalNAc-O-bn: benzyl-N-acetyl-a-galactosamide ppGNTases: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases

Introduction

Protein glycosylation is one of the major posttranslational modification (PTM) occurring in eukaryotic cells (from unicellular to multicellular organisms). This PTM which generally follows/ accompanies the synthesis of polypeptides in the endoplasmic reticulum (ER) is initiated in this same compartment, and completed in the Golgi apparatus. Glycosylated proteins follow the secretory pathways and are either released in the extracellular compartments (plasma membrane, cell wall, cell surface matrix) or destined to different organelles within the cell (e.g., lysosomes, vacuoles). Both *N*-linked and *O*-linked glycosylation processes have been found and studied in plant and animal cells. *N*-glycosylation is very well described and has been the object of many studies, reviews and biotechnological applications (Strasser, 2009; Bardor *et al.*, 2010; Gomord *et al.*, 2010), whereas *O*-glycosylation is less studied in general, and is the focus of this paper. *O*-glycosylated proteins are known to play important functions in animal and plant cells including cell-cell interactions, signaling, recognition, and scaffolding. Protein glycosylation is also required for maintaining the folding, the stability and the activity of (summarized in Fig. 1).

In plants, *O*-glycosylated proteins have been abundantly reported within a family of secreted cell wall proteins, the hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs). HRGPs constitute a superfamily composed of arabinogalactan-proteins (AGPs), extensins, and proline-rich proteins (Showalter *et al*, 2010; Xu *et al*, 2008; Velasquez *et al*, 2011). HRGPs are variably glycosylated (Showalter, 1993). These proteins undergo an essential modification namely the conversion of

Plant				
Ara-Ara- Gal β 1-6Gal β 1 Gal β 1 Gal β 1 6 Gal β 1-3 Gal β 1-3Gal β 1	Type II arabinogalactan			
Araα1-3Araβ1-2 Araβ1-2 Araβ1-O-Hyp	Extensin type O-glycan			
Gala1-3Gala1-O-Ser	Solanaceous lectin-type O-glycan			
Animal				
GLcAβ1-3Galβ1-3Galβ1-4Xylβ1-O-Ser	Glycosaminoglycan (core region)			
GlcNAcβ1-3Fucβ1- O-Ser	O-linked fucose			
Galβ1-3 GalNAcα1- O-Ser/Thr	Mucin-type core 1 glycan (fly)			
$ \begin{array}{c} Glc\beta1 \\ Glc\beta1 \\ 6 \\ Glc\beta1-4Gal\beta1 \end{array} Glc\beta1 $ $ \begin{array}{c} Glc\beta1 \\ Glc\beta1 \end{array} $	Mucin-type (worm, example)			
2-O-Me Fucα1-2 Galβ1-3 GalNAcα1- O-Ser/Thr	Mucin-type core 1 glycan (Toxocara)			
GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Ser/Thr	Mucin-type core 2 glycan			
GlcNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc α -Ser/Thr	Mucin-type core 3 glycan			
GlcNAc β 1 \rightarrow 3(GlcNAc β 1 \rightarrow 6) GalNAc α Ser/Thr	Mucin-type core 4 glycan			

Fig. 1. O-linked glycans in the process of general O-glycosylation in the plant and mammalian cells (Wilson Iain, 2002; Kirk Bergstrom and Xia, 2013)

secreted proteins (Apweiler *et al.*, 1999; Haltiwanger and Lowe, 2004). The structure of *O*-linked glycans of plant versus animal glycoproteins is quite different

proline residues into hydroxyproline (Hyp) by a multigene family of enzymes, the prolyl-4-hydroxylases (P4-Hs) (Vlad *et al.*, 2007) that act within the

endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. The Hyp glycosylated residues are then either with arabinogalactan chains, with short arabinan chains, or with single galactose residues by different glycosyltransferases in the Golgi apparatus (Shpak et al., 1999; Showalter, 2001; Wilson Iain, 2002; Velasquez et al., 2011; Velasquez et al., 2012). Molecular genetics approaches coupled to analytical techniques have shown that glycosylation of Hyp residues is dependent on a variety of consensus motifs widespread within the peptide amino acid sequence. O-glycosylation leading to arabinosylation occurs on clustered Ser-(Hyp)4 contiguous sequences (contigs), whereas *O*-glycosylation leading to arabinogalactosylation occurs on Hyp-alanine, Hyp-serine, Hyp-threonine and Hyp-valine contigs (Kieliszewski and Shpak, 2001; Shpak et al, 2001; Tan et al, 2003; Tan et al, 2004; Estévez et al., 2006; Xu et al., 2008).

In mammals, O-glycosylation is not predominantly found on proline residues; it does also occur on serine/threonine (Ser/Thr), tyrosine and hydroxylysine amino acids. The most common of these modifications is the mucin-type O-glycosylation, which is widespread in the animal kingdom (Bennett et al., 2012). In mammals, initiation of mucin-type O-glycosylation can be performed by up to 20 different UDP-GalNac polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-Ts) which catalyze the transfer of a single N-acetylgalactosamine (GalNAc) residue to serine/threonine amino acids (GalNAcα Ser/Thr). Further elongation of GalNAc residues is performed by Golgi-located glycosyltransferases and results in different O-glycan structures including core 1 to core 4 structures. Mucin-type O-linked glycoproteins are involved in many biological processes such as the regulation of serum half-life of cytokine, the alteration of glycans on cancer cells and the lubrication of variety of intestinal tissues. Mucins play structural role and contribute to mechanical properties, organization, and shape of tissues, and interact with cells via different receptors. They also regulate their migration, proliferation, and differentiation (Ricard-Blum, 2010). O-glycosylation has also been well studied on collagen, which is the most abundant proteins in mammals (\sim 30% of total protein mass in certain cells). Collagen contains more than 10% of proline residues. It does also contain lysine residues. The enzymes which hydroxylate these amino acids are the prolylhydroxylase and lysylhydroxylase (Ricard-Blum, 2010; Rosenbloom and Prockop, 1970).

Understanding *O*-protein glycosylation has direct implications in basic research but also in several areas of biotechnology, including molecular pharming, or novel strategies of plant/crop protection. Progress in such an understanding has been facilitated by different approaches including molecular genetics and pharmacological approaches. Here, we have chosen to present some drugs/inhibitors which have been used to unravel plant and mammal *O*-glycosylation. Prospects in application, especially in plant biotechnology, are also presented.

Inhibiting *O*-glycosylation in plants using chemical inhibitors

P4-Hs perform a key step in plant *O*-glycosylation, which is the hydroxylation of proline residues. Direct or indirect inhibition of the action of this enzyme has been used to study the function of *O*-glycosylation in plants. To interfere with the process of *O*-glycosylation, various substances have been employed including 3,4-dehydro-L-proline (3,4-DHP), ethyl-3,4-dehydroxy benzoate (3,4-EDHB) and α,α -dipyridyl

3,4-DHP is an analog of proline which can be incorporated into the polypeptide chain, and rapidly irreversibly inhibits peptidyl proline and hydroxylation. 3,4-DHP has been shown to inhibit P4-Hs action in plant cells when applied at micromolar concentrations (Cooper and Varner, 1983). The authors have shown that treatment of discs of phloem parenchyma tissue from roots of Daucus carota with 5µM and 50µM 3,4-DHP inhibits the hydroxylation of proline by 70% and 90%, respectively. An unpublished study has shown that 3,4-DHP-treated tobacco BY-2 cells were able to alter the molecular weight as well as the carbohydrate composition of secreted AGPs (Aboughe-Angone Sophie, Nguema-Ona Eric, Azeddine Driouich, article in preparation). 3,4-DHP treatment of soybean cells was also shown to induce disappearance of the major PRPs from the cell wall of cultured cells (Schmidt et al., 1991), and 3,4-DHP-treated protoplasts do not develop osmotic stability and do initiate mitosis. 3,4-DHP-treated carrot root cells continue to synthesize and secrete structurally abnormal extensin HRGPs that might be expected to function abnormally (Cooper et al., 1994). Others studies showed that treatment of onion root cells by 3, 4-DHP resulted on a 56% decrease in hydroxyproline content (Tullio et al., 1999). Recently, Xu et al. (2011), have shown that 3,4-DHP inhibited the proliferation of embryogenic cells of banana and decreased the rate of embryo germination. In the context of plant microbe interactions, 3,4-DHP has been used to investigate the role of plant AGPs in root colonization by soil rhizobacteria (Vicré et al., 2005). It has been shown that 3,4-DHP induced alteration of AGP glycosylation and altered rhizobacteria ability to colonize Arabidopsis roots (Nguema-Ona et al., 2013). Altogether, these studies showed that inhibition/alteration of plant

O-glycosylation by 3,4-DHP treatment affects many aspects of plant development and interaction with microbes. Interestingly, in mammalian cells, proline hydroxylation in collagen is also inhibited by 3,4-DHP treatment (see below).

O-glycosylation in the plant cells can also be inhibited by ethyl-3,4-dehydroxy benzoate (3-4-EDHB) and α,α -dipyridyl (DP) (Velasquez *et al.*, 2011). 3,4-EDHB binds to the active site of prolyl4-hydroxylase, while α,α -dipyridyl (DP) chelates a co-factor required for P4-Hs activity. Velazquez *et al.* have shown that transgenic *Arabidopsis* roots expressing the fusion LeAGP1::GFP treated at nanomolar range (48 to 219 nM) with these two drugs exhibited 50% growth inhibition of their root hairs. These treatments also caused the accumulation of non-glycosylated ~ 42 KD forms of LeAGP1-GFP and fully *O*-glycosylated ~ 150 to 200 KD form. The authors also linked the absence of *O*-glycosylation of extensins in the *p4-h Arabidopsis* mutants to the abnormal root hair phenotype observed.

Altogether, these studies show that the use of *O*-glycosylation inhibitors in plants affect considerably various aspects of growth and survival supporting the importance of the *O*-glycosylation in the function of plant cells.

Inhibiting O-glycosylation in mammals using chemical inhibitors

In mammals, proline, but also serine, threonine, and tyrosine amino acids can be *O*-glycosylated. Different enzymes perform the addition of glycosidic residues on

O-glycosylation. Collagens and mucins are well studied mammal-*O*-glycosylated proteins. Interestingly, collagen *O*-glycosylation often occurs on Hyp residues while mucin *O*-glycosylation occurs on serine or threonine residues.

Rosenbloom and Prockop (1970) have studied the effect of 3,4-DHP treatment on collagen O-glycosylation. They have found that 3,4-DHP decreased the hydroxylation of proline and lysine residues in collagen and that the altered collagen could not be extruded from cartilage cells as rapidly as that of control samples. The effects observed following 3,4-DHP treatment were comparable those observed to with azetidine-2-carboxylic acid and cis-4-fluoroproline (analog of proline) but were slightly less pronounced (Takeuchi and Prockop, 1969, Takeuchi et al., 1969). In the study on collagen synthesis and prolyl hydroxylase activity in mammalian cell cultures, Kerwar and Felix (1976) showed that, in addition to decreasing the hydroxylation of proline residues and the secretion of collagen from cells, 3,4-DHP also inhibited the incorporation of glycine and lysine into collagen. 3,4-DHP also prevented excessive collagen deposition during wound healing and inhibited fibrosis development (Kerwar and Felix, 1976).

By contrast with collagen-type *O*-glycosylation, mucin-type *O*-glycosylation occurs on serine and threonine residues, and occurs also on many other glycoproteins (Tarp and Clausen, 2008). This type of *O*-glycosylation constitutes the most common type of *O*-linked glycosylation found in mammals and other eukaryotes (Hang and Bertozzi, 2005). Here,



Fig. 2. Initiation of mucin-type *O*-linked glycosylation biosynthesis by the ppGalNAc-Ts which utilize UDP-GalNAc as the nucleotide sugar donor and modify protein substrates (Hang and Bertozzi, 2005; Tian *et al.*, 2004)

the polypeptidic backbones. Therefore, different drugs targeting different key enzymes have also been identified and used to study mammal-specific glycosylation is initiated by the ppGNTases. These are enzymes that initiate mucin-type *O*-linked glycosylation by transfer of GalNAc from the nucleotide donor UDP-GalNAc to Ser/Thr residues of a polypeptide substrate, as shown in Fig. 2 (Tian *et al.*, 2004). This enzyme plays a pivotal role in cell-cell communication and tissue protection (Hang *et al.*, 2004). They have identified a small molecule (1-68A) from a uridine-based library, which inhibits N-acetylgalactosaminyltransferases in mammalian cells and consequently disrupts *O*-glycosylation. To define the *O*-glycans increase HRGPs solubility and thermal stability as well as resistance to proteolytic degradation (Ferris *et al.*, 2001; Kieliszewski *et al.*, 2010; Lamport *et al.*, 2011). In recent studies, it has been shown that *O*-glycosylation of hydroxyproline residues increase the thermal stability of the prolyproline type II helix and the presence of β -*O*-glycosylated proteins indicated an increase in conformational stability (Owens *et al.*, 2010;

Table 1: Possible functions in	plant and mammalian cells
--------------------------------	---------------------------

Role of O-glycosylation in Plant cell walls	Role of <i>O</i> -glycosylation in mammalian cells		
- protein stability	- protein stability		
- somatic embryogenesis	- heat resistance		
- cell division and cell expansion	- protein expression and processing		
- reproductive development	- protease resistance		
- abiotic stress responses	- cellular interactions		
- xylem differentiation	- hydrophilicity and antigenicity		
- hormone signaling pathways	- modulation of enzymes activity		

biological roles of the GalNAc-Ts, Tian *et al.* (2004) subjected NIH3T3 mouse fibroblast cells to 1-68A. The authors observed a marked decrease of protein glycosylation and induction of cell apoptosis. Over-expression of certain isoforms of GalNAc-Ts restored cell surface glycosylation and rescued the inhibitor-induced apoptosis suggesting that the enzymes and *O*-glycosylation have an important role in the regulation of apoptosis. Also, inhibition of *O*-glycosylation seems to play a key role in the growth of cancer cells (Patsos *et al.*, 2005). For instance, benzyl-N-acetyl-a-galactosamide (GalNAc-O-bn) inhibits the *O*-gykosylation of KL-6 mucin which is implicated in the development of aggressive metastasis in human pancreatic carcinoma (Xu *et al.*, 2008).

Comparative functional aspects of plant and mammal *O*-glycosylated proteins

Plant and mammalian *O*-glycans are usually considered as structurally different, but the studies of *O*-glycosylation inhibitors in the mammalian and plant cells show that both plant and animal *O*-glycosylations are involved in the stability and the conformation of glycoproteins. In the case of extensins, *O*-glycosylation appears to stabilize the helical conformation whereas incomplete hydroxylation of *O*-glycosylation would promote a flexible and disorganized conformation (Velasquez *et al.*, 2011). It has been suggested that Velasquez et al., 2011). Interestingly plant *O*-glycosylated proteins are also suggested to play active role in plant defense mechanisms and signaling (Nguema-Ona et al., 2013). PTMs of O-glycosylated cell wall proteins are important to cell differentiation and plant development. O-glycosylated proteins like arabinogalactan-proteins and extensins are involved in the regulation of plant growth, somatic embryogenesis, and development processes, cell division and cell expansion, reproductive development, biotic and abiotic stress responses, xylem differentiation, and hormone signaling pathways (Seifert and Roberts, 2007; Zhang et al., 2008; Ellis et al., 2010; Velasquez et al., 2011; Xu et al., 2011; Velasquez et al., 2012). The slightest inhibition or the disruption of this PTM affects the process in which these molecules are involved in plant development. However, O-glycosylation type defines the glycomodules responsible for their shape, size, stability, and biological functions in HRGPs.

These functions are similar in the mammalian cells. Several examples can illustrate the role of *O*-glycosylation in mammalian cells. In general, *O*-linked glycans maintain protein stability, heat resistance, antigenicity, cellular interactions, hydrophilicity, and modulation of enzymatic activity and protease resistance by steric hindrance, protein expression and processing (Van den Steen *et al.*, 1998; Wopereis *et al.*, 2006). *O*-glycosylation would induce the extended and rigid conformation in the mucin-1 which is a polymorphic, highly glycosylated, type I transmembrane glycoprotein and this allows this molecule to interfere with cell-cell and cell-matrix interactions (Tarp and Clausen, 2008). Another important function of *O*-linked sugars is to mediate recognition between proteins. *O*-glycosylation is also essential for the expression or biological activity of many proteins. For example, Wiskott-Aldrich syndrome and cancer (Tsuboi and Fukuda, 2001; Berger, 1999; Brockhausen, 1999). *O*-linked glycans are also known to have an effect on immunologic recognition, for example, the ABO blood group antigens and recognition by antibodies (van den Steen *et al*, 2000). In addition, *O*-glycosidic structures play an important role in the localization and traffic of proteins, and make them more resistant to proteases,

Table 2: Chemical structures of inhibitors that are commonly used to inhibit plants or mammalians *O*-glycosylation

STRUCTURES	NAMES	ABBREVIATIONS
O OH	PROLINE	Р
OH H O	3,4-DEHYDRO-L-PROLINE	3,4-DHP
O O O O O O O O O O O O O O O O O O O	ETHYL-3,4-DEHYDROXY BENZOATE	3,4-EDHB
	α,α-DIPYRIDYL	DP
	BENZYL-N-ACETYL-a-GALACTOSAMIDE	GalNAc-O-bn
ОН	AZETIDINE-2-CARBOXYLIC ACID	ACA
HN F	CIS-4-FLUOROPROLINE	FP

O-glycans influence the expression of glycophorin A at the cell surface of human erythrocytes (Remaley *et al.*, 1991), or the biological activity of interleukin-5 (Kodama *et al.*, 1993) and human lactase phlorizin hydrolase (Naim and Lentze, 1992). Altered glycosylation directly leads to development of certain diseases such as hematological disorders,

increase their stability, avoid or reduce the effects related to oxidation, denaturation by pH, precipitation or aggregation. A specific glycan may be involved in several functions in different places and different times (Varki, 1993). The different possible functions of *O*-glycosylation are summarized in Table 1.

In Table 2, we summarize also the structure of

chemical inhibitors commonly used to inhibit plant or mammalian *O*-glycosylation.

General Conclusions

Protein glycosylation in general and O-glycosylation in particular, is a fundamental process for the function plant and mammalian cells. O-glycosylation alteration in directly impacts cell development and survival of living organisms. In plants, such an alteration affects plant development. Moreover O-glycosylated plant cell wall proteins play an important role in plant survival. In mammals, O-glycosylation accompanies many secreted proteins that have important roles in signaling and communication. Proper O-glycosylation is also often directly responsible for the biological activities of these proteins. The use of chemical inhibitors, in combination with molecular genetics approaches and analytical chemistry, has largely contributed to the study of the structure and function of O-glycosylated proteins.

Understanding and harnessing O-glycosylation has of implications in production 0-glycosylated biopharmaceuticals for mammal therapy. Given their natural ability to perform O-glycosylation, plants are suitable candidate for the production of therapeutic glycoproteins requiring O-glycans (Gomord et al., 2010; Sola and Griebenow, 2010; Strasser, 2013). A recent study has described O-glycosylation of a recombinant human IgA1 expressed in transgenic maize (Karnoup et al., 2005). Addition of small arabinan chains (via an addition of Hyp residues to the polypeptide sequence) to therapeutic polypeptides expressed in plants was also shown to increase the half-life of the recombinant molecule and its activity.

Plant *O*-glycosylated proteins such as AGPs have also emerged as interesting players in plant defense against soil pathogens (Nguema-Ona *et al.*, 2013). Thus, future applied research in plants should evaluate the possibility of massive production of *O*-glycosylated proteins of interest.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

We would like to thank present and former colleagues who contributed to the work described in this review and for their comments on the manuscript.

References

Apweiler, R., H. Hermjakob, and N. Sharon. 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochemica et* *Biophysica Acta* 1473: 4-8. doi: 10.1016/S0304-4165 (99) 00165-8.

- Bardor, M., J.A. Cremata, and P. Lerouge. 2010. Glycan Engineering in Transgenic Plants. Annual Plant Reviews: Plant Polysaccharides, Biosynthesis and Bioengineering 41: 409 – 424. doi: 10.1002/9781444391015.ch17.
- Bennett, E.P., U. Mandel, H. Clausen, T.A. Gerken, T.A. Fritz, and L.A. Tabak. 2012. Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* 22: 736-756. doi: 10.1093/glycob/cwr182. Epub 2011 Dec 18.
- Berger, E.G. 1999. Tn-syndrome. *Biochemica et Biophysica Acta* 1455: 255-268. doi: 10.1016/S0925-4439 (99) 00069-1.
- Brockhausen, I. 1999. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochemica et Biophysica Acta* 1473: 67-95. doi: 10.1016/S0304-4165 (99) 00170-1.
- Cooper, J.B, and J.E. Varner. 1983. Selective inhibition of proline hydroxylation by 3,4-dehydroproline. *Plant Physiology* 73: 324-328. doi: 10.1104/pp.73.2.324.
- Cooper, J.B., J.E. Heuser, and J.E. Varner. 1994. 3,4-Dehydroproline inhibits cell wall assembly and cell division in tobacco protoplasts. *Plant Physiology* 104: 747-752. doi: 10.1104/pp.104.2.747.
- Ellis, M., J. Egelund, C. Schultz, and A. Bacic. 2010. Arabinogalactan-proteins (AGPs): key regulators at the cell surface? *Plant Physiology* 153: 403-419. doi: 10. 1104/pp.110.156000.
- Estévez, J., M.J. Kieliszewski., N. Khitrov, and C. Somerville. 2006. Characterization of synthetic hydroxyproline-rich proteoglycans with arabinogalactan-protein and extensin motifs in *Arabidopsis. Plant Physiology* 142: 458-470. doi: 10.1104/pp.106.084244.
- Ferris, P.J., J.P. Woessner, S. Waffenschmidt., S. Kilz., J. Drees, and U.W. Goodenough. 2001. Glycosylated polyproline II rods with kinks as a structural motif in plant hydroxyproline-rich glycoproteins. *Biochemistry* 40: 2978-2987. doi: 10.1021/bi0023605.
- Gomord, V., A.C. Fitchette., L. Menu-Bouaouiche., C. Saint-Jore-Dupas, C. Plasson., D. Michaud, and L. Faye. 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal* 8: 564-587. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00497.x.
- Haltiwanger, R.S, and J.B Lowe. 2004. Role of Glycosylation in Development. *Annual Review of Biochemistry*. 73: 491-537. doi: 10.1146/annurevbiochem.73.011303.074043
- Hang, H.C, and C.R. Bertozzi. 2005. The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13: 5021-5034. doi: 10.1016/j.bmc.2005.04.085.
- Hang, H.C., C. Yu., K.G. Ten Hagen., E. Tian., K.A. Winans., L.A. Tabak, and C.R. Betozzi. 2004. Small Molecule Inhibitors of Mucin-Type *O*-Linked Glycosylation from a Uridine-Based Library. *Chemistry Biology.* 11: 337-345. doi: 10.1016/j.chembiol.2004.02.023.

- Karnoup, A.S., V. Turkelson, and W.H.K. Anderson. 2005. O-Linked glycosylation in maize-expressed human IgA1. *Glycobiology*. 15: 965-981. doi: 10.1093/GLYCOB/CWI077.
- A.M. Felix. 1976. Effect Kerwar, S.S, and of L-3,4-Dehydroproline on Collagen Synthesis and Hydroxylase Activity in Mammalian Cell Cultures Proly. The Journal of Biological Chemistry. 251: 503-509. PMID: 173719.
- Kieliszewski, M.J. and E. Shpak. 2001. Synthetic genes for the elucidation glycosylation codes of for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins. Cellular and Molecular Life Sciences. 58: 1386-1398. PMID: 11693521.
- Kieliszewski, M.J., D.T.A. Lamport., L. Tan, and M.C. Cannon. 2010 Plant Polysaccharides, Biosynthesis and Bioengineering. In: Annual Plant Reviews. P. Ulvskov, Ed. p. 321-342. doi: 10.1002/9781444391015.
- Kirk Bergstrom, S.B, and L. Xia. 2013. Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis. *Glycobiology*. 0: 1-12. doi: 10.1093/glycob/cwt045.
- Kodama, Y., C.J. Boreiko., S.C. Maness, and T.W. Hesterberg. 1993. Cytotoxic and cytogenetic effects of asbestos on bronchial epithelial cel1s culture. human in Carcinogenesis. 14: 691-697. doi: 10.1093/carcin/14.4.691.
- Lamport, D.T.A., M.J. Kieliszewski., Y. Chen, and M.C. Cannon. 2011. Role of the Extensin Superfamily in Primary Cell Wall Architecture. Plant Physiology. 156: 11-19. doi: 10. 1104/pp.110.169011.
- Naim, H.Y, and M.J. Lentze. 1992. Impact of 0-glycosylation on the function of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase.Characterization of glycoforms varying in enzyme activity and localization of 0-glycoside addition. The Journal of Biological Chemistry. 267: 25494-504.
- Nguema-Ona, E., M. Vicré-Gibouin., M.A. Cannesan, and A. Driouich. 2013. Arabinogalactan proteins in root-microbe Trends in Plant Science. interactions. 18: 440-449.doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.03. 006.
- Owens, N.W., J. Stetefeld., E. Lattová, and F. Schweizer. 2010. Contiguous O-galactosylation of 4(R)-hydroxy-l-proline residues forms very stable polyproline II helices. Journal of the American Chemical Society. 132: 5036-5042. doi: 10.1021/ja905724d.
- Patsos, G., V. Hebbe-Viton., R. San Martin., C. Paraskeva., T. Gallagher, and A. Corfield. 2005. Action of a library of O-glycosylation inhibitors on the growth of human colorectal cancer cancer cells in culture. Biochemical 721-723. Society Transactions. 33: doi: 10.1042/BST0330721.
- Remaley, A.T., M. Ugorski., N. Wu., L. Litzky., S.R. Burger., J.S. Moore., M. Fukuda, and S.L. Spitalnik. 1991. Expression of human glycophorin A in wild type and glycosylation-deficient Chinese hamster ovary cells. Role of N- and O-linked glycosylation in cell surface expression. The Journal of Biological Chemistry. 266: 24176-83. PMID: 1748686.
- Ricard-Blum, S. 2010. The collagen family. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. p. 1-19. Cold Spring Harb Perspect

Biol doi: 10.1101/cshperspect.a004978.

- Rosenbloom, J. and D.J. Prockop. 1970. Incorporation of 3,4-Dehydroproline into Protocollagen and Collagen. The journal of Biological Chemistry. 245: 3381-3368. PMID: 5459639.
- Schmidt, A., K. Datta, and A. Marcus. 1991. Peptidyl proline hydroxylation and the growth of a soybean cell culture. Plant Physiology. 96: 656-659. doi: 10.1104/pp.96.2.656
- Seifert, G.J, and K. Roberts. 2007. The biology of Arabinogalactan proteins. Annual Review of Plant Biology. 58 137-161. doi: 10.1146/annurev.arplant. 58.032806.103801.
- Showalter, A.M. 1993. Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. Plant Cell. 59-23. doi: 10.1105/tpc.5.1.9.
- Showalter, A.M. 2001. Arabinogalactan proteins: structure, expression and function. Cellular and Molecular Life Sciences. 58: 1399-1417. PMID: 11693522.
- Showalter, A.M., B. Keppler, J. Lichtenberg., D. Gu, and L.R. Welch. 2010. A bioinformatics approach to the classification, and identification. analvsis of hydroxyproline-rich glycoproteins. Plant Physiology. 153: 485-513. doi: 10.1104/pp.110.156554. Epub 2010 Apr 15.
- Shpak, E., E. Barbar., J.F. Leykam, and M.J. Kieliszewski. 2001. Contiguous hydroxyproline residues direct hydroxyproline arabinosylation in Nicotiana tabacum. The Journal of Biological Chemistry. 276: 11272-11278. doi:10.1074/jbc.M011323200.
- Shpak, E., J.F. Leykam, and M.J. Kieliszewski. 1999. Synthetic genes for glycoprotein design and the elucidation of hydroxyproline-O-glycosylation codes. Proceedings of the National Academy of Sciences 96: 14736-14741. PMCID: PMC2471.
- Sola, R.J, and K. Griebenow. 2010. Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy. BioDrugs. 24: 9-21. doi: 10.2165/11530550-00000000-00000.
- Strasser, R. 2009. Localization of plant N-glycan processing enzymes along the secretory pathway. Plant Biosystems. 143: 636-642. doi: 10.1080/11263500903233391.
- Strasser, R. 2013. Engineering of human-type O-glycosylation in Nicotiana benthamiana plants. Bioengineered. 4: 1-6. doi: 10.4161/bioe.22857. Epub 2012 Nov 12.
- Takeuchi, T, and D.J. Prockop. 1969. Biosynthesis of abnormal collagens with amino acid analogues: I. Incorporation of l- azetidine-2-carboxylic acid and cis-4-fluoro-l-proline into protocollagen and collagen. Biochemica et 142-155. Biophysica Acta. 176: doi 10.1016/0005-2795(69)90153-6.
- Takeuchi, T., J. Rosenbloom, and D.J. Prockop. 1969. Biosynthesis of abnormal collagens with amino acid analogues: II. Inability of cartilage cells to extrude collagen polypeptides containing l-azetidine-2-carboxylic acid or cis-4-fluoro-l-proline. Biochemica et Biophysica Acta. 175: 156-164. doi: 10.1016/0005-2795(69)90154-8.
- Tan, L., F. Qiu., D.T.A. Lamport, and M.J. Kieliszewski. 2004. Structure of a hydroxyproline (Hyp)-arabinogalactan polysaccharide from repetitive Ala-Hyp expressed in

transgenic Nicotiana tabacum. The Journal of Biological Chemistry. 279: 13156-13165. doi:10.1074/jbc.M311864200.

- Tan, L., J.F. Leykam, and M.J. Kieliszewski. 2003. Glycosylation motifs that direct arabinogalactan addition to arabinogalactan-proteins. *Plant Physiology*. 132: 1362-1369. doi: 10.1104/pp.103.021766.
- Tarp, M.A, and H. Clausen. 2008. Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1780: 546-563. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.09.010.
- Tian, E., G.T. Hagen Kelly, L. Shum., H.C. Hang., Y. Imbert., W.W. Young Jr., C.R. Bertozzi, and L.A. Tabak. 2004. An Inhibitor of O-Glycosylation Induces Apoptosis in NIH3T3 Cells and Developing Mouse Embryonic Mandibular Tissue. *The Journal of Biological Chemistry*. 48: 50382-50390. doi: 10.1074/jbc.M406397200.
- Tsuboi, S, and M. Fukuda. 2001. Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *Bioessays*. 1: 46-53.doi: 10.1002/1521-1878(200101)23:1<46::AID-B IES1006>3.0.C0;2-3.
- Tullio, M.C.D., C. Paciolla., F.D. Vecchia., N. Rascio., S. D'Emerico., L.D. Gara., R. Liso, and O. Arrigoni. 1999. Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydro-xyllase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta*. 209: 424-434. PMID: 10550623.
- van den Steen P., P. Rudd, M. Wormald, R. Dwek and G. Opdenakker. 2000. O-Linked glycosylation in focus. *Trends Glycoscience Glycotechnology.* 63: 35-49.
- van den Steen, P., P.M. Rudd., R.A. Dwek, and G. Opdenakker. 1998. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 33: 151-208. PMID: 9673446.
- Varki, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3: 97-130. doi: 10.1093/glycob/3.2.97.
- Velasquez, S.M., J.S. Salter, J. Gloazzo Dorosz., B.L. Petersen, and J.M. Estevez. 2012. Recent advances on the post-translational modifications of EXTs and their roles in cell expansion. *Frontier Plant Physiology* 3:1-6. doi: 10.3389/fpls.2012.00093.
- Velasquez, S.M., M.M. Ricardi., D.J. Gloazzo., P.V. Fernandez., A.D. Nadra., L. Pol-Fachin., J. Egelund, S. Gille., M. Ciancia., H. Verli., M. Pauly., A. Bacic., E.C. Olsen., P. Ulvskov, L.B. Petersen., C. Somerville., N.D. Iusem, and J.M. Estevez. 2011. Essential role of *O*-glycosylated plant cell wall extensins for polarized root hair growth. *Science* 332: 1401-1403. doi: 10.1126/science.1206657.
- Vicré, M., C. Santaella, S. Blanchet, A. Gateau, and A. Driouich. 2005. Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiology* 138: 998-1008. doi: 10. 1104/pp.104.051813.
- Vlad, F., T. Spano., D. Vlad, F. Bou Daher., A. Ouelhadj, and P. Kalaitzis. 2007. Arabidopsis prolyl 4-hydroxylases are differentially expressed in response to hypoxia, anoxia and mechanical wounding. Plant Signaling & Behavior 2:

368-369. doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.00915.x.

- Wilson Iain, B.H. 2002. Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. *Current Opinion in Structural Biology* 12: 569-577. doi: 10.1016/S0959-440X (02) 00367-6.
- Wopereis, S., D.J. Lefeber, E. Morava, and R.A. Wevers. 2006. Mechanisms in protein *O*-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein *O*-glycan biosynthesis defects: a *review Clinical Chemistry* 52: 574-600. doi: 10.1373/clinchem.2005.063040.
- Xu C., T. Takáč., C. Burbach., D. Menzel, and J. Šamaj. 2011. Developmental localization and the role of hydroxyproline rich glycoproteins during somatic embryogenesis of banana (Musa spp. AAA). *BMC Plant Biology* 11: 38. doi: 10.1186/1471-2229-11-38.
- Xu, J., L. Tan., D.T.A. Lamport., A.M. Showalter, and M.J. Kieliszewski. 2008. The O-Hyp glycosylation code in tobacco and *Arabidopsis* and a proposed role of Hyp-glycans in secretion. *Phytochemistry* 69: 1631-1640. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.02.006. Epub 2008 Mar 25.
- Zhang, X., Y. Ren, and J. Zhao. 2008. Roles of extensins in cotyledon primordium formation and shoot apical meristem activity in Nicotiana tabacum. *Journal of Experimental Botany* 59: 4045-4058. doi: 10.1093/jxb/ern245.

RÉSUMÉ

La pomme de terre (*Solanum tuberosum*) représente la principale denrée alimentaire non céréalière et a été déclarée comme « aliment du futur » en 2008 par la FAO. De nos jours, la production mondiale de la pomme de terre a atteint 374 millions de tonnes (FAO). Cependant la pomme de terre est sensible à de nombreuses maladies racinaires comme la maladie de la jambe noire causée par *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Latour *et al.*, 2008). A ce jour, il n'existe aucun traitement chimique ou biologique efficace pour lutter contre ces pathogènes telluriques. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques, cellulaires et moléculaires impliqués dans les interactions racines/pathogènes s'avèrent nécessaires pour proposer de nouvelles stratégies de défense contre ces pathogènes.

Cependant, la réponse immunitaire au niveau de la racine reste très peu étudiée. Or, il a été démontré que les cellules bordantes (BC) de racines et les exsudats racinaires jouent un rôle clé dans la défense racinaire. Les BC sont des cellules qui dérivent de la coiffe racinaire et qui sont libérées dans la rhizosphère à l'interface sol/microorganismes suggérant un rôle dans la défense racinaire.

L'objectif de ces travaux de thèse est de caractériser le système racinaire de la pomme de terre en se focalisant sur les BC et les exsudats racinaires. Nous avons ainsi caractérisé pour la première fois les BC de pomme de terre. Ces dernières se présentent comme des BC classiques se détachant individuellement de la racine (Cannesan *et al.*, 2012). Nous avons également montré que les BC de pomme de terre sont capables de percevoir un éliciteur et de développer une réponse immunitaire spécifique.

Par ailleurs les BC de pomme de terre sont enrobées dans un important mucilage dont la composition polysaccharidique a été déterminée. Nous avons ainsi montré que ces exsudats sont riches en glycoprotéines de type arabinogalactanes protéines (AGP) et extensines. Suite à ces résultats, nous avons initié une analyse fonctionnelle des exsudats racinaires de pomme de terre sur le développement de la bactérie *Pectobacterium atrosepticum*, ainsi qu'une analyse bioinformatique de l'ensemble des HRGPs (Hyprodroxyprolines-rich glycoprotéines) de la pomme de terre. Ce dernier objectif à nécessité la mise en place d'un outil bioinformatique basée sur l'utilisation du logiciel R (R Development Core Team).

Mot clés: *Solanum tuberosm*; Cellules bordantes (BC); Exsudats racinaires; *Pectobacterium atrosepticum*; Arabinogalactan proteins (AGP), Hydroxyproline-rich glycoprotéines (HRGPs).