Thèse de Doctorat

Spécialité Biologie Cellulaire et Moléculaire

présentée à

L'Université de Picardie Jules Verne

par

Christopher WATTIER

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

Pucerons et paroi végétale : implication directe ou indirecte de pectine méthylestérases dans la résistance d'Arabidopsis thaliana ?

Soutenue le 30.09.2013, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

Mme E. JAMET, Directrice de Recherche au CNRS de Toulouse	**Rapporteur**
M. Y. RAHBE, Directeur de Recherche à l'INRA de Lyon	**Rapporteur**
Mme V. BRAULT, Directrice de Recherche à l'INRA de Colmar	**Examinateur**
Mme M.H. SAUGE, Ingénieur de Recherche à l'INRA d'Avignon	**Examinateur**
M. C. CLEMENT, Professeur à l'URCA	**Examinateur**
M. J. PELLOUX, Professeur à l'UPJV	**Examinateur**
Mlle C. RUSTERUCCI, Maître de Conférences à l'UPJV	**Co-directrice de thèse**
M. A. CHERQUI, Maître de Conférences HDR à l'UPJV	**Directeur de thèse**

Remerciements

Thèse, *nom féminin* : *Ensemble des travaux présentés, sous forme d'ouvrage, en vue de l'obtention du grade de docteur* (Larousse). Que cette définition est incomplète ! La thèse est avant tout LA formation ultime, LE premier vrai travail (étudiant et salarié en même temps, un peu déroutant quand même parfois) et ne représente en aucun cas un travail solitaire… L'aide et les conseils apportés par certaines personnes, ainsi que la communication avec l'ensemble des collègues/amis nous entourant constituent à mon avis la clé permettant de bien réussir sa phase « d'apprenti-chercheur ».

Un grand merci à mes encadrants CHRISTINE RUSTERUCCI et ANAS CHERQUI pour m'avoir guidé constamment vers la lumière pendant ces quatre années de thèse, pour m'avoir appris à aiguiser ma rigueur scientifique et aussi pour leur qualités humaines inestimables. CHRISTINE nous n'oublierons jamais nos grandes discussions où nous étions prêts à refaire le monde. Une chose est sûre, à trois nous étions (j'étais ?) plus forts.

J'adresse mes remerciements à GENEVIEVE PREVOST, Directrice de l'équipe BIPE, ERIC GONTIER, Directeur de l'EA 3900 BIOPI et GUILLAUME DECOCQ, Directeur de l'UMR FRE3498 EDYSAN, pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires.

Je voudrais remercier ELISABETH JAMET, Directrice de recherche au CNRS de Toulouse et YVAN RAHBE, Directeur de recherche à l'INRA de Lyon, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également VERONIQUE BRAULT, Directrice de recherche à l'INRA de Colmar, MARIE-HELENE SAUGE, Ingénieure de recherche à l'INRA d'Avignon et CHRISTOPHE CLEMENT Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardenne d'avoir accepté de juger de mes travaux de recherche. Et bien sûr je tiens particulièrement à remercier JEROME PELLOUX, Professeur à l'UPJV, pour ses conseils pertinents durant mon projet de thèse, sa bonne humeur et l'attention portée à mon travail.

Je tiens à remercier les membres de BIOPI, en particulier CORINNE PAU-ROBLOT et son aide précieuse pour mes expériences de biochimie, je me souviendrai toujours des caprices de la colonne Dionex (d'ailleurs merci aussi à MICHELLE LEQUART pour nous avoir aidé à les résoudre !). Mille mercis à FRANÇOISE FOURNET pour son incroyable patience et sa minutie lorsqu'il s'agit de faire des coupes au microtome et surtout pour l'attention régulière qu'elle a portée sur moi. Merci aux autres personnes de l'axe dynamique des pectines pour leur soutien durant ces années de thèse, notamment OLIVIER, VALERIE, CATHERINE, SOPHIE, FRANÇOISE, KARINE, JEAN-MARC. Et bien sûr… dédicace spéciale à mes amis doctorants et le soutien que l'on s'apportait constamment pour tenir le coup dans les moments plus difficiles (mes gâteaux y contribuaient n'est-ce pas LAËTITIA, LUDIVINE et FABIEN S. ? ☺ et merci à HYACINTHE et FABIEN M. pour le courage qu'ils m'ont aussi apporté) mais aussi pour les bons moments que l'on a passé en dehors du labo, en particulier AMELIE, qui, en dehors de sa précieuse aide dans

le cadre de mon projet de thèse, m'a accueilli à Arras comme si j'étais un salarié de P&G (avec ROMAIN mon pâtissier/boulanger préféré de tous les temps).

Mes remerciements vont aussi naturellement aux membres d'EDYSAN et au laboratoire BIPE, pour leur grande générosité, leur bonne humeur, leurs sourires. En particulier FRANÇOISE DUBOIS (avec qui j'ai notamment découvert la préparation de séance de TP !), MARIE (pour son efficacité et sa rapidité à gérer des situations administratives semblant compliquées pour tout le monde !), AUDE (pour ses talents de cuisinière et son Just Dance !), GERALDINE (et ses dons d'organisation de module pour trouver des solutions lors de rattrapage de TP !), CAROLINE (pour m'avoir prêté son appart pour mon anniv ☺ et pour son grand dévouement veillant au bon déroulement du module Biologie de la cellule), PATRICE (même s'il m'a souvent taquiné ☺) et surtout ma chère LAURENCE (toujours prête à m'aider et me soutenir sans faille, à m'accompagner RU (ahlala le RU… c'était notre rituel !) et MOUNIA (pour ses précieux conseils et son aide concernant les phytovirus). Et bien sûr les anciens membres comme SOLENE et SEBASTIEN BOQUEL, pour la maison rue Pinsard (lol) et surtout pour leur grand cœur et les bons moments passés ensemble (et il y en aura encore !) mais aussi SOPHIE et IBRAHIM, pour qui j'ai toujours une pensée.
Un grand merci aussi aux personnes travaillant aux plateformes de l'UPJV, notamment le CRRBM et LAURENT GUTIERREZ où j'ai été accueilli pendant de nombreuses semaines dans des conditions vraiment idéales pour travailler (bonne humeur, bons conseils et surtout un matériel vraiment top pour faire mes analyses moléculaires et biochimiques). D'ailleurs merci GAËLLE pour tes précieux conseils pour la manip microarrays. Merci aussi à DOMINIQUE CAILLEUX de la plateforme de chimie pour son aide pour la Dionex. Merci aussi à JUSTIN HOUESSOU, du laboratoire des Technologies Innovantes (EA3899, UPJV), pour la collaboration effectuée afin que je réalise mes analyses de spectroscopie infra-rouge (FT-IR).

Mes remerciements s'adressent aussi aux personnes de l'école doctorale Sciences, Technologie, Santé (ED547) dirigée par CHRISTIAN MASQUELIER, que j'ai été amené à voir régulièrement en étant membre élu au Conseil de l'ED : merci à VIRGINIE PECOURT, VIRGINIE LEFEVRE, IRENE RASOARINOVO et AUDREY LECOMPTE pour leur bonne humeur et leur efficacité.
Je tiens à remercier aussi mes amis québécois, DENIS et SUGIR, qui m'ont donné goût à la recherche lors de mon stage de Licence 3 à l'Institut de Recherche en Biologie Végétale de Montréal et ma très chère CATHY qui m'a fait découvrir ce qu'est une thèse et m'a donné l'envie d'en faire une lorsque j'étais en stage de Master 2 au CIRAD de la Réunion ☺.
Mes remerciements les plus profonds vont à ma famille, tout particulièrement à mon FRERE, qui a toujours été soucieux de mon bien être en restant à mes côtés, à mes PARENTS, qui m'ont appris à être persévérant, à mes GRANDS-MERES (spéciale dédicace à ma MAMIE qui a cousu les pochons en tulle pour mes suivis physiologiques de pucerons !) et mon GRAND-PERE, même s'il n'est plus là car il m'a construit et m'a toujours donné l'envie de me battre. Mes remerciements vont aussi à AURELIE, mon amie d'enfance, qui me soutient sans faille depuis 20 ans et sans qui tout aurait été différent. Mille mercis aussi à SYLVAIN pour sa gentillesse, son soutien et ses conseils. Et un énorme merci à mon JOHAN pour son soutien moral sans faille.

Liste des figures

Figure 1 La paroi des cellules végétales et ses différents niveaux d'organisation....4
Figure 2 Paroi primaire végétale de cellule d'onion (*Allium cepa*) sans sa matrice pectique....5
Figure 3 Représentation schématique de la structure de la paroi primaire....5
Figure 4 Structure d'une fibrille de cellulose....6
Figure 5 Représentation schématique des structures des principaux polysaccharides pariétaux....6
Figure 6 Modèle structural des polysaccharides pariétaux associés en réseau....7
Figure 7 Structure en boîte à œufs des chaînes d'acide galacturonique....8
Figure 8 Dimère formé par 2 chaînes de rhamnogalacturonane II reliées par une liaison 1:2 borate diol ester....9
Figure 9 Modes d'action des pectine méthylestérases....9
Figure 10 Illustration de l'action de protéines capables de modifier la distance entre fibrilles de cellulose et la rigidité de la paroi primaire....10
Figure 11 Site d'action des pectinases impliquées dans la dégradation des homogalacturonanes....11
Figure 12 Action des pectine méthylestérases sur les homogalacturonanes....11
Figure 13 Motifs structuraux des pectine méthylestérases....12
Figure 14 Structure tridimensionnelle d'un PMEI de kiwi seul ou associé à une PME de tomate....13
Figure 15 Production de fragments pectiques après l'action des polygalacturonases sur les homogalacturonanes....13
Figure 16 Production de fragments pectiques après l'action des pectine lyases ou pectate lyases sur les homogalacturonanes....13
Figure 17 Mode d'action des rhamnogalacturonases impliquées dans la dégradation des rhamnogalacturonanes I....14
Figure 18 Représentation tridimensionnelle d'une PME d'*Erwinia chrysanthemi* et d'une PME de carotte....16
Figure 19 Interaction de la paroi végétale de cellules épidermiques d'une feuille d'orge avec le champignon biotrophe *Blumeria graminis*, l'oïdium des céréales....18
Figure 20 Interaction de la paroi végétale de cellules d'une feuille de laitue avec la bactérie biotrophe *Pseudomonas syringae*....18
Figure 21 Interaction de la paroi végétale de cellules de racine de tomate avec le stylet d'un nématode. 19
Figure 22 Interaction de la paroi végétale avec les stylets d'un puceron....19
Figure 23 Modèle non exhaustif illustrant les mécanismes moléculaires et biochimiques de défense initiés au niveau de la paroi végétale....20
Figure 24 Exemples de cascades MAP-kinases impliquées dans la résistance aux bioagresseurs nécrotrophes ou biotrophes chez *A. thaliana*....22

Figure 25 Représentation simplifiée des voies de biosynthèse de l'acide salicylique 23
Figure 26 Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique à partir de l'acide α-linolénique 24
Figure 27 Récapitulatif des gènes impliqués dans le signalement des défenses et la biosynthèse des voies de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène 25
Figure 28 Schéma simplifié des voies de biosynthèse et de signalisation de l'éthylène 25
Figure 29 Le système glucosinolate-myrosinase 27
Figure 30 Le modèle Zig-Zag appliqué aux interactions plante-puceron 30
Figure 31 Principales étapes de l'activation des réponses de défense de la plante aux HAMP 32
Figure 32 Expression pattern of PME, PAE, PG and PL mRNA in *A. thaliana* Col-0 in response to biotic stresses 36
Figure 33 Involvement of HGMEs in plant defense responses to biotic stresses 41
Figure 34 Distribution mondiale des principaux écotypes d'*Arabidopsis thaliana* 44
Figure 35 Représentation schématique de la morphologie d'un puceron aptère ou ailé 46
Figure 36 Représentation schématique du cycle de vie d'un puceron hétéroécique holocyclique 47
Figure 37 Etapes de l'acceptation d'une plante-hôte par les pucerons 47
Figure 38 Microphotographies d'un puceron 48
Figure 39 Représentations schématique et micrographique de l'anatomie des stylets du puceron *B. brassicae*, en section transversale. 48
Figure 40 Les différentes phases de salivation du puceron dans la plante 49
Figure 41 Micrographies des gaines salivaires du puceron de la vesce *Megoura viciae* 49
Figure 42 Schéma du dispositif d'électropénétrographie 54
Figure 43 Dispositif mis en place pour effectuer les suivis physiologiques. 55
Figure 44 Schéma présentant le principe de dosage de l'activité PME : deux réactions couplées 1:1 57
Figure 45 Diagramme en boîtes à moustaches représentant la dispersion des données d'une variable 67
Figure 46 Représentations descriptives par Analyses en Composantes Principales des valeurs d'expression de gènes PME et PMEI suite à des stress biotiques. 71
Figure 47 Mise en évidence de l'activité du promoteur du gène codant la *PME3* (*promPME3::GUS*) dans une feuille d'*A. thaliana* 72
Figure 48 Diagramme en boîtes des trois séries de durée totale des phases de recherche des tubes criblés effectuées par *M. persicae* durant un accès de 8 h aux feuilles d'*A. thaliana* WS, *pme17* et *pme3* 73
Figure 49 Distribution selon les composantes principales 1 et 2 des individus *M. persicae* s'alimentant sur *A. thaliana* WS, *pme17* et *pme3* 74
Figure 50 Distribution selon les composantes principales 1 et 2 des individus *M. persicae* s'alimentant sur *A. thaliana* Col, *pmei4* et 35S:PMEI4::GFP 75
Figure 51 Distribution selon les composantes principales 1 et 2 des individus *M. persicae* s'alimentant sur *A. thaliana* Col et WS 76

Figure 52 Comparaison par un test *t* de Student des spectres FT-IR d'échantillons collectés à partir de parois de cellules foliaires des différents plants transgéniques et sauvages non infestés 80
Figure 53 Comparaison par un test *t* de Student des spectres FT-IR d'échantillons collectés à partir de parois de cellules foliaires des plants transgéniques et sauvages infestés par *M. persicae* et des non infestés correspondants 81
Figure 54 Contenu en monosaccharides pariétaux obtenus par hydrolyse acide d'extraits de parois de cellules foliaires des différents plants transgéniques et sauvages non infestés 82
Figure 55 Contenu en monosaccharides pariétaux obtenus par hydrolyse acide d'extraits de parois de cellules foliaires des plants transgéniques et sauvages infestés ou non par *M. persicae* 83
Figure 56 Activité PME totale des extraits de feuilles des plants sauvages *A. thaliana* WS et Col 84
Figure 57 Activité PME totale des extraits de feuilles de plants transgéniques (*pme17* et *pme3*) ou sauvages (*A. thaliana* WS), infestés ou non par *M. persicae* 84
Figure 58 Activité PME totale des extraits de feuilles de plants transgéniques (*pmei4* et 35S:PMEI4::GFP) ou sauvages (*A. thaliana* Col), infestés ou non par *M. persicae* 85
Figure 59 Activité PG totale des extraits de feuilles des plants d'*A. thaliana* transgéniques et sauvages (WS et Col), infestées ou non par *M. persicae* 85
Figure 60 Comparaison d'expressions relatives de gènes de défense ou liés à la paroi dans des feuilles d'*A. thaliana* transgéniques et sauvages 86
Figure 61 Comparaison d'expressions relatives de gènes de défense ou liés à la paroi dans des feuilles d'*A. thaliana* transgéniques et sauvages infestées par *M. persicae* par rapport aux plants non infestés correspondants 87
Figure 62 Niveaux de comparaisons à partir des puces à ADN 88
Figure 63 Classifications hiérarchiques des gènes significativement induits pour les deux premiers niveaux de comparaison de profils transcriptomiques 89
Figure 64 Diagrammes de Venn relatant le nombre de transcrits significativement régulés pour les deux premiers niveaux de comparaisons étudiés avec les puces à ADN 88
Figure 65 Vue globale des différences de gènes induits par la mutation du gène *PME17*, par comparaison des plants *pme17* et WS, en terme de catégories fonctionnelles 90
Figure 66 Vue d'ensemble des gènes intervenant dans les processus généraux de régulation dans les feuilles d'*A. thaliana* et dans la production de métabolites secondaires 92
Figure 67 Vue globale des différences de gènes induits dans les plants WS et *pme17* infestés par *M. persicae*, en terme de catégories fonctionnelles 94
Figure 68 Synthèse des variations observées constitutivement au niveau des paramètres étudiés dans les feuilles des différents plants sauvages et transgéniques 97
Figure 69 Synthèse des variations du comportement trophique et de la physiologie de *M. persicae* observées sur les feuilles des différents plants sauvages et transgéniques 100

Figure 70 Potentiel impact de différentes composantes (pectique, pariétale et cellulaire) déjà mesuré dans la littérature sur différents modèles plante-bioagresseur. 104
Figure 71 Synthèse des variations observées au niveau des paramètres étudiés dans les feuilles des différents plants sauvages et transgéniques suite à une infestation par *M. persicae* de 24 h 105
Figure 72 Synthèse des éléments intervenant dans l'acceptation des deux écotypes *A. thaliana* WS et Col et des plants mutants ou surexpresseurs étudiés 115

Liste des tableaux

Tableau 1 Classification des protéines pariétales d'*A. thaliana* en 9 classes fonctionnelles d'après leurs domaines fonctionnels prédits 7
Tableau 2 Classification des enzymes dégradant les homogalacturonanes 10
Tableau 3 Pectine méthylestérases caractérisées chez *A. thaliana* 12
Tableau 4 Enzymes dégradant les homogalacturonanes présentes chez les bioagresseurs 16
Tableau 5 Inhibiteurs de pectine méthylestérases caractérisés chez *A. thaliana* 17
Tableau 6 Familles de protéines PR (*Pathogenesis-related*) 26
Tableau 7 Gènes d'*A. thaliana* codant des défensines 27
Tableau 8 Gènes de résistance contre les pucerons identifiés 31
Tableau 9 Synthèse des éléments pouvant intervenir dans la résistance de la plante contre les pucerons 33
Tableau 10 Gene expression variations of homogalacturonan-modifying enzymes after biotic stresses .. 34
Tableau 11 Biochemical implication of HG-modifying enzymes (PMEs, PAEs, PLLs) and their inhibitor proteins (PMEIs, PGIPs, PNLIP) in plant resistance against bioaggressors 37
Tableau 12 Liste des activités enzymatiques détectées dans la salive gélifiante des pucerons 50
Tableau 13 Plan d'expérimentation établi pour étudier l'impact d'une infestation sur les feuilles d'*A. thaliana* 56
Tableau 14 Liste des gènes étudiés par RT-PCR quantitative 63
Tableau 15 Amorces spécifiques gauche et droite de chaque gène étudié par PCR et/ouRT-PCR quantitative 65
Tableau 16 Moyennes des paramètres de comportement alimentaire de *M. persicae* durant un accès de 8 h aux feuilles *d'A. thaliana* WS, *pme17* et *pme3* 73
Tableau 17 Moyennes des paramètres de comportement alimentaire de *M. persicae* étudié durant un accès de 8 h aux feuilles d'*A. thaliana* Col, *pmei4* et 35S:PMEI4::GFP 75
Tableau 18 Moyennes des paramètres de comportement alimentaire de *M. persicae* étudié durant un accès de 8 h aux feuilles d'*A. thaliana* WS et Col 76
Tableau 19 Moyennes des paramètres de comportement alimentaire de *M. persicae*, *B. brassicae* et *A. fabae* étudié durant un accès de 8 h aux feuilles d'*A. thaliana* WS 77
Tableau 20 Paramètres démographiques des individus *M. persicae* se développant durant 21 jours sur les différentes d'*A. thaliana* plantes étudiées 78
Tableau 21 Liste des gènes reliés à la paroi végétale et présentant une induction significative dans les deux premiers niveaux de comparaison effectués lors de l'expérimentation sur puces à ADN 91
Tableau 22 Liste des gènes reliés à la défense de la plante et présentant une induction significative dans les deux premiers niveaux de comparaison effectués lors de l'expérimentation sur puces à ADN 93

Liste des abréviations

ABA	*ABscissic Acid*
ABC	*ATP Binding Cassette*
ABRC	*Arabidopsis Biological Ressource Center*
ACC	*Aminocyclopropane Carboxylic Acid*
ACO	*ACC Oxidase*
ACP	Analyse en Composante Principale
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADN-T	ADN de Transfert
AGP	ArabinoGalactane Protéine
ANOVA	Analyse de variance
AOC	*Allene Oxide Cyclase*
AOS	*Allene Oxide Synthase*
Api	Apiose
ARN	Acide RiboNucléique
AUX	Auxine
BIOPI	BIOlogie des Plantes et Innovation
BR	BRassinostéroïde
BSA	*Bovine Serum Albumin*
CalS	Callose Synthase
CaMV	*Cauliflower Mosaic Virus*
CAZy	*Carbohydrate Active enZYme*
CIF	*Cell wall Inhibitor of Fructosidase*
CK	CytoKinines
Col	Ecotype Columbia
CTR1	*Constitutive Triple Response 1*
CWA	*Cell Wall Apposition*
CWDE	*Cell Wall Degrading Enzyme*
DA	Degré d'Acétylation
DAMP	*Damage-Associated Molecular Pattern*
DM	Degré de Méthylestérification
DP	Degré de Polymérisation
EBF	(E)-β-Farnésène
EDS1	*Enhanced Disease Susceptibility 1*
EGF	*Epidermic Ggrowth Factor*
EIN4	*Ethylene INsensive 4*
EPG	ElectroPénétroGraphie
ERF1	*Ethylene Response Factor 1*
ERS1	*Ethylene Response Sensor 1*
ET	EThylène
ETI	*Effector-Triggered Immunity*
ETR1	*EThylene Receptor 1*
ETS	*Effector Triggered Susceptibility*
EXT1	EXTensine 1
GA	*Gibberellic Acid*
GalA	*Galacturonic Acid*
GAUT	GAlactUronosyl-Transférase
GAX	GlucuronoArabinoXylanes
gène R	Gène de Résistance
GFP	*Green fluorescent protein*
GH	Glycoside Hydrolase
GIP	*GA-Induced Protein*
GlcA	*Glucuronic Acid*
GLS	GLucoSinolate
GOX	Glucose OXydase
GPI	Glycosyl-PhosphatidylInositol
GT	Glycosyl Transférase
HAMP	*Herbivore-Associated Molecular Pattern*
HG	HomoGalacturonane
HGME	*HomoGalacturonan Modifying Enzyme*
HR	*Hypersensitive Reaction*
HRGP	*Hydroxyproline Rich GlycoProtein*
HTI	*HAMP-Triggered Immunity*
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
JA	*Jasmonic acid*
JA-Ile	Jasmonate-Isoleucine
Ler	Ecotype Landsberg *erecta*
LOX2	LipOXygénase 2
LRR	*Leucine Rich Repeat*
MAPK	*Mitogen Associated Protein Kinase*
MeSA	Methyl SAlicylate
MeJA	Methyl JAsmonate
NASC	*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*
NBS-LRR	*Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat*
NO	*Nitric Oxide*
NOS	*Nitric Oxide Synthase*
NPR1	*Non-expressor of PR-1*
NR	Nitrate Reductase
OG	OligoGalacturonide
OPDA	*OxoPhytoDienoic Acid*
PAD4	*PhytoAlexin Deficient 4*
PAE	Pectine AcétylEstérase
PAMP	*Pathogen-Associated Molecular Pattern*
PDF1-2	*Plant Defensin 1-2*
PG	PolyGalacturonase
PGIP	*PolyGalacturonase Inhibitor Protein*
PL	Pectate Lyase

PLL	Pectate Lyase-L*ike*
PME	Pectine MéthylEstérase
PMEI	*Pectine MethylEsterase Inhibitor*
PMT	Pectine MéthylTransférase
PNL	PectiNe Lyase
PNLIP	*PectiNe Lyase Inhibitor Protein*
PR	*Pathogenesis Related*
PRP	Proteine Riche en Proline
PRR	*Pattern Recognition Receptor*
PTI	*PAMP-Triggered Immunity*
PVY	*Potato Virus Y*
RGI	Rhamnogalacturonane I
RGII	Rhamnogalacturonane II
Rha	Rhamnose
RLK	*Receptor-Like Kinase*
ROS	*Reactive Oxygen Species*
SA	*Salicylic Acid*
SAM	*S-Adénosyl Methionine*
SAR	*Systemic Acquired Resistance*
SID2	*SA Induction Deficient 2*
SLW1	*SilverLeaf Whitefly 1*
SP	*Signal Peptide*
THI2-1	Thionine 2-1
TMV	*Tobacco Mosaic Virus*
VASC	*Versailles Arabidopsis Stock Center*
VOC	*Volatil Organic Compound*
WS	Ecotype Wassilewskija
XG	XyloGlucane
XGA	XyloGAlacturonane

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE **1**

CHAPITRE 1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **4**

1. LA PAROI VEGETALE, UNE DEFENSE CONSTITUTIVE DYNAMIQUE **4**

1.1. LA PAROI VEGETALE, UNE BARRIERE COMPOSITE 4

1.1.1. Structure de la paroi 4

1.1.2. Structure fibrillaire cellulosique 5

1.1.3. Structure de la matrice pectique 6

1.1.4. Protéines pariétales 7

1.2. LA PLANTE MODIFIE CONSTAMMENT SA PAROI 8

1.2.1. Modifications des liaisons au sein du réseau pectique 8

1.2.2. Modifications de la cellulose et des hémicelluloses 10

1.2.3. Modifications des pectines 10

1.2.3.1. Modifications des homogalacturonanes 10

1.2.3.1.1. Estérases : pectine acétylestérases et pectine méthylestérases 11

1.2.3.1.2. Dépolymérases hydrolases : polygalacturonases 13

1.2.3.1.3. Dépolymérases lyases : pectine lyases et pectate lyases 13

1.2.3.2. Modifications des rhamnogalacturonanes I 14

2. LA PAROI VEGETALE, D'UNE DEFENSE CONSTITUTIVE A UNE DEFENSE INDUITE **15**

2.1. LA PERCEPTION DES BIOAGRESSEURS PAR LA PAROI VEGETALE 15

2.1.1. Dégradation de la paroi par les bioagresseurs 15

2.1.1.1. Pectinases des bioagresseurs 16

2.1.1.2. Inhibition de pectinases des bioagresseurs 17

2.1.1.3. Principaux éléments intrusifs des bioagresseurs au niveau de la paroi 18

2.1.1.3.1. Hyphes fongiques 18

2.1.1.3.2. Pilus bactérien 18

2.1.1.3.3. Stylet de nématode 19

2.1.1.3.4. Stylets de puceron 19

2.1.2. Induction d'une résistance basale chez la plante via la paroi 19

2.2. LES REPONSES DE DEFENSE DANS L'INTERACTION PLANTE-PUCERON 21

2.2.1. Flux d'ions 21

2.2.2. Pic oxydatif 21

2.2.3. Activation de protéines kinases et phosphorylation de protéines 22

2.2.4. Voies de signalisation hormonales 23

2.2.5. Accumulation de composés de défense 25

2.3. LE CONTOURNEMENT DES DEFENSES 29

2.3.1. Effecteurs aphidiens contournant les défenses de la plante 29

2.3.2. Modèle Zig-Zag appliqué aux pucerons 30

2.3.3. Gènes de résistance de la plante pour contrer les effecteurs 30

2.4. LES ELEMENTS INTERVENANT DANS LA RESISTANCE DE LA PLANTE AUX PUCERONS 32

3. LES ROLES DES ENZYMES MODIFIANT LES HOMOGALACTURONANES DANS LES REPONSES DE LA PLANTE AUX STRESS BIOTIQUES **34**

3.1. BIOTIC STRESSES MODIFY GENE EXPRESSION OF HG-MODIFYING ENYMES 34

3.2. ROLE OF HGMES IN THE ESTABLISHMENT OF FEEDING STRUCTURES DURING BIOTIC INTERACTIONS 35

3.3. ROLES OF HGMES IN STRUCTURAL RESISTANCE 37

3.4. HGMES ARE INVOLVED IN INDUCED RESISTANCE AGAINST BIOTIC STRESSES 39

4. LE MODELE D'ETUDE **43**

4.1. LA PLANTE 43

4.1.1. Description générale et utilisation pour étudier la paroi 43

4.1.2. Variations entre accessions naturelles 44

4.1.3. Choix des gènes étudiés 45

4.2. LES PUCERONS 45

4.2.1. Cycle de vie 46

4.2.2. Régime alimentaire 47

4.2.3. Mode d'alimentation, blessure occasionnée 48

4.2.4. Salives injectées et pectinases salivaires 49

4.2.5. Dégâts causés par les pucerons 50
4.2.5.1. Dégâts directs 50
4.2.5.2. Dégâts indirects 50
4.2.6. Lutte contre les pucerons 51

CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTALES 53
1. LES MATERIELS BIOLOGIQUES 53
1.1. LES PLANTES 53
1.2. LES PUCERONS 53
2. LES METHODES EXPERIMENTALES 54
2.1. LES INFESTATIONS ET LES TRAITEMENTS DES FEUILLES 54
2.1.1. Méthodes éthologiques 54
2.1.1.1. Etude du comportement trophique 54
2.1.1.2. Etude du développement physiologique 55
2.1.2. Etude de l'effet de l'infestation sur la physiologie de la plante 56
2.1.3. Echantillonnage des feuilles 56
2.2. LES METHODES DE BIOCHIMIE 56
2.2.1. Extractions des protéines pariétales 56
2.2.2. Dosages protéiques 57
2.2.3. Mesures d'activité enzymatique 57
2.2.3.1. Pectine méthylestérases 57
2.2.3.2. Polygalacturonases 58
2.2.4. Etude des sucres pariétaux 59
2.2.4.1. Extraction des parois 59
2.2.4.2. Dégradation de l'amidon résiduel 59
2.2.4.3. Analyse des oses pariétaux par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance 60
2.2.5. Etude des liaisons chimiques de parois de broyats foliaires 60
2.3. LES METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE 61
2.3.1. Etudes génomiques 61
2.3.1.1. Analyse transcriptomique 61
2.3.1.1.1. Extraction des ARN totaux 61
2.3.1.1.2. Production d'ADNc double-brin 62
2.3.1.1.3. Acquisition et traitement des données de puces à ADN 62
2.3.1.2. Analyse de l'expression des gènes de défense 63
2.3.1.2.1. Extraction des ARN totaux 64
2.3.1.2.2. Production de l'ADNc simple-brin 64
2.3.1.2.3. Amplification de l'ADNc par qRT-PCR 65
2.3.2. Etudes microscopiques 66
2.4. LES ANALYSES STATISTIQUES 67
2.4.1. Analyses descriptives 67
2.4.1.1. Boîtes à moustaches 67
2.4.1.2. Analyses en composantes principales 67
2.4.2. Analyses inférentielles 67
2.4.2.1. Tests paramétriques 67
2.4.2.2. Tests non paramétriques 69

CHAPITRE 3. RESULTATS 70
1. PME ET PMEI IMPLIQUES DANS LES INTERACTIONS PLANTE-PUCERON 71
1.1. PME ET PMEI DANS LES BASES DE DONNEES D'EXPRESSION DE GENES 71
1.2. LOCALISATION TISSULAIRE DE LA PME3 72
2. IMPACT DE DEUX PME ET D'UN PMEI SUR LA BIOLOGIE DU PUCERON 73
2.1. EFFET SUR SON COMPORTEMENT TROPHIQUE 73
2.1.1. Effet différentiel des gènes *PME17* et *PME3* 73
2.1.2. Faible effet du gène *PMEI4* 74
2.1.3. La variation naturelle d'*A. thaliana* a un effet sous-jacent 76
2.1.3.1. Effet sur le comportement trophique de *M. persicae* 76
2.1.3.2. Effet sur le comportement trophique de *Brevicoryne brassicae* et *Aphis fabae* 77
2.2. EFFET SUR SES PARAMETRES DEMOGRAPHIQUES 78
3. IMPACT DE DEUX PME ET D'UN PMEI SUR LA PHYSIOLOGIE DE LA PLANTE ET SA REPONSE A UNE INFESTATION APHIDIENNE 79
3.1. EFFETS SUR LA PAROI DES CELLULES FOLIAIRES 79

3.1.1. Structure de la paroi 79
3.1.1.1. Au sein des feuilles des plants non infestés 80
3.1.1.2. Au sein des feuilles après une infestation par *M. persicae* 80
3.1.2. Composition en monosaccharides de la paroi 82
3.1.2.1. Au sein des feuilles des plants non infestés 82
3.1.2.2. Au des feuilles après une infestation par *M. persicae* 83
3.1.3. Activité d'enzymes modifiant les homogalacturonanes 83
3.1.3.1. Activité pectine méthylestérases 84
3.1.3.1.1. Au sein des feuilles des plants non infestés 84
3.1.3.1.2. Au sein des feuilles après une infestation par *M. persicae* 84
3.1.3.2. Activité polygalacturonases 84
3.1.3.2.1. Au sein des feuilles des plants non infestés 84
3.1.3.2.2. Au sein des feuilles après une infestation par *M. persicae* 84
3.2. EFFETS SUR DES GENES EXPRIMES DANS LES FEUILLES 85
3.2.1. Expression ciblée mesurée par RT-PCR quantitative 85
3.2.1.1. Au sein des feuilles des plants non infestés 86
3.2.1.2. Au sein des feuilles après une infestation par *M. persicae* 87
3.2.2. Expression de gènes à l'échelle du transcriptome de la plante infestée ou non 88
3.2.2.1. Effet de la mutation du gène *pme17* sur l'expression des gènes fonctionnels de la plante 90
3.2.2.2. Effet de l'infestation par *M. persicae* sur l'expression des gènes fonctionnels des plants WS et *pme17* 93

CHAPITRE 4. DISCUSSION 95
1. ROLES DE PME17, PME3 ET PMEI4 CHEZ *A. THALIANA* 96
1.1. LOCALISATION ET ROLES DE PME17, DE PME3 ET DE PMEI4 DANS LA PLANTE ENTIERE 96
1.2. ROLES DE PME17, DE PME3 ET DE PMEI4 DANS LES FEUILLES 97
2. ROLES DE PME17, PME3 ET PMEI4 DANS LES INTERACTIONS A. THALIANA-PUCERON 100
2.1. ROLES DE PME17, PME3 ET PMEI4 SUR LE COMPORTEMENT TROPHIQUE DE *M. PERSICAE* 100
2.2. ROLES DE PME17, PME3 ET PMEI4 SUR LA PHYSIOLOGIE DE *M. PERSICAE* 103
2.3. CHANGEMENTS ENGENDRES APRES UNE INFESTATION PAR *M. PERSICAE* SUR LES DIFFERENTS PLANTS 103
2.3.1. Comment PME3 et PME17 peuvent-ils respectivement constituer un facteur de résistance ou de susceptibilité à *M. persicae* ? 104
2.3.2. Comment PMEI4 peut-il constituer un facteur de susceptibilité à *M. persicae* ? 108
3. IMPACT DE LA VARIATION NATURELLE D'*A. THALIANA* SUR LES FEUILLES 109
4. IMPACT DE LA VARIATION NATURELLE D'*A. THALIANA* SUR LES INTERACTIONS PLANTE-PUCERON 110
4.1. IMPACT DE LA VARIATION NATURELLE D'A. THALIANA SUR LE COMPORTEMENT TROPHIQUE ET LE DEVELOPPEMENT DE *M. PERSICAE* 110
4.1.1. Résistance antixénose de l'écotype Col contre *M. persicae* 111
4.1.2. Résistance antibiose de l'écotype Col contre *M. persicae* 112
4.2. CHANGEMENTS ENGENDRES APRES UNE INFESTATION PAR *M. PERSICAE* SUR LES PLANTS COL ET WS 112
4.3. IMPACT DE LA VARIATION NATURELLE D'*A. THALIANA* SUR LE COMPORTEMENT TROPHIQUE DES PUCERONS *BREVICORYNE BRASSICAE* ET *APHIS FABAE* 113

CHAPITRE 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 114

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 120

ANNEXES 147

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES 171

Introduction générale

Les pucerons (Homoptera : Aphididae) sont des insectes phytophages piqueurs-suceurs pouvant engendrer des dégâts au niveau de la plante, faisant suite soit aux modifications physiologiques qu'ils entraînent suite aux prélèvements de sève élaborée et visualisés par exemple par l'enroulement des feuilles (dégâts directs), soit à leur capacité à transmettre des phytovirus (dégâts indirects, Bonnemain 2010). Ils constituent d'important ravageurs de cultures capables d'entraîner d'importantes pertes économiques, la transmission de virus pouvant engendrer des pertes de rendements allant par exemple jusqu'à 50 % chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), essentiellement dues à la diminution de taille des tubercules (Kerlan 1996). Afin de lutter contre les pucerons, plusieurs mécanismes de résistance sont mis en place par la plante. Ces derniers peuvent aboutir à une résistance de type antixénose si le mode de colonisation du puceron est négativement affecté (de l'approche de la feuille à son comportement trophique) ou de type antibiose, si son développement ou sa fécondité est négativement affecté. La plante peut aussi montrer une tolérance à l'infestation aphidienne, lorsqu'elle continue sa croissance malgré l'infestation, sans avoir un effet néfaste sur la croissance ou la survie des pucerons (Smith & Clement 2012). Parmi les défenses mises en place par la plante pour aboutir à une résistance, les défenses constitutives jouent un rôle important, comme la présence de composés répulsifs, anti-appétants, toxiques ou la présence de barrières physiques comme l'abondance des trichomes ou la structure et la composition de la paroi végétale.

La paroi végétale, en plus de constituer un véritable bouclier pour la cellule face à son environnement, confère une structure rigide à la cellule, participant au port dressé de la plante. Elle se présente sous la forme d'un réseau très complexe principalement composé de chaînes polysaccharidiques auxquelles peuvent s'ajouter des composés phénoliques souvent à fonction de renforcement (lignines, Carpita & Gibeaut 1993 ; Somerville *et al.* 2004). Les polysaccharides forment une structure fibrillaire cellulosique enchassée dans une matrice composée d'hémicelluloses et de pectines, ces dernières étant formées majoritairement d'homogalacturonanes (HG). Outre ces polysaccharides, la paroi pecto-cellulosique est aussi constituée d'enzymes et de protéines de structure. Des prédictions informatiques suggérent qu'un quart de l'ensemble de ces protéines interagit avec les polysaccharides pariétaux (Jamet *et al.* 2008). Parmi ces dernières, les enzymes modifiant les HG (HGME), telles que les pectine méthylestérases (PME) et les polygalacturonases (PG), apparaissent jouer un rôle clef dans la régulation des phénomènes de croissance et développement de la plante mais aussi dans sa résistance à des stress biotiques et abiotiques (Pelloux *et al.* 2007). C'est l'implication des PME dans la résistance aux stress biotiques qui va plus particulièrement nous intéresser.

Au sein de l'Unité de recherche « BIOlogie des Plantes et Innovation » (EA 3900 BIOPI), le groupe de l'axe « Dynamique des Pectines » s'intéresse tout particulièrement au rôle des PME dans la régulation des phénomènes de croissance et développement de la plante et dans la résistance à des stress biotiques et abiotiques. Une des plantes modèles utilisées est l'arabette (*Arabidopsis thaliana*) où les PME (EC 3.1.1.11) forment une famille composée de 66 isoformes (Pelloux *et al.* 2007).

Ces dernières éliminent les groupements méthyles (CH_3) présents sur les HG synthétisés au préalable dans l'appareil de Golgi sous forme hautement méthylée (80 %) puis exocytés dans la paroi (Micheli 2001 ; Atmodjo *et al.* 2013). Elles peuvent être régulées par des inhibiteurs protéiques (PMEI) présents *in vivo* dans la paroi végétale et constituant aussi une famille multigénique chez *A. thaliana* (69 isoformes, Wolf *et al.* 2009a). Chez *A. thaliana* et d'autres plantes, en réponse à des stress biotiques, l'expression de gènes codant des PME mais aussi des PMEI, est modifiée et l'activité de ces deux enzymes influe sur le niveau de résistance des plantes (Lionetti *et al.* 2012). L'activité des PME produit du méthanol, constituant un signal volatil pouvant intervenir dans la résistance aux ravageurs de cultures. Elle peut aussi favoriser l'hydrolyse des pectines par les PG, formant des fragments pariétaux appelés oligogalacturonides (OG) qui constituent de potentiels éliciteurs endogènes induisant une résistance de la plante.

L'Unité de recherche « Ecologie et DYnamique des Systèmes ANthropisés » (CNRS-FRE 3498 EDYSAN) et plus particulièrement le laboratoire « Bio-écologie des Insectes Phytophages et Entomophages », s'intéresse aux facteurs écophysiologiques gouvernant les interactions « attaque/défense » dans les systèmes tri-trophiques plante-insecte phytophage-parasitoïde. L'étude de ces facteurs est menée notamment par des études éthologiques et par la recherche de molécules élicitrices produites par les insectes et particulièrement les pucerons responsables de l'induction de réponses de défense des plantes. Les pucerons insèrent leurs stylets, pièces buccales hautement spécialisées, entre les cellules épidermiques et mésophylliennes pour atteindre les éléments de tubes criblés du phloème et se nourrir de sève élaborée (photoassimilats). Le passage de leurs stylets s'effectue alors au sein des parois végétales (Tjallingii & Esch 1993). Le puceron perce périodiquement les cellules végétales au cours de la recherche du phloème, libérant ainsi des éliciteurs de défense exogènes provenant de la salive qu'il sécrète (De Vos & Jander 2009). Les défenses de la plante initiées par ces éliciteurs peuvent être amplifiées par la production de fragments pariétaux (dont les OG) jouant le rôle d'éliciteurs endogènes (Shibuya & Minami 2001). Parmi les gènes induits lors de la résistance des plantes contre les pucerons, certains sont associés à la paroi et codent des HGME dont des PME (Divol *et al.* 2005 ; Kuśnierczyk *et al.* 2008). De plus, dans la salive des pucerons, parmi les protéines analysées une activité PME a été détectée (Cherqui & Tjallingii 2000 ; Harmel *et al.* 2010).

Une étroite collaboration a été établie au sein de l'Université de Picardie Jules Verne entre les 2 Unités de recherche BIOPI et EDYSAN, permettant de bénéficier d'une approche intégrative en couplant les effets du puceron sur la plante à ceux de la plante sur le puceron.

Objectifs de la thèse

Le projet de thèse que j'ai choisi de développer vise à une meilleure compréhension du rôle de la paroi végétale et des PME-PMEI d'*A. thaliana* dans les interactions plante-puceron. C'est donc après une synthèse bibliographique présentant notamment le modèle d'étude (**Chapitre 1** « Synthèse bibliographique »), que sera présentée une approche multidisciplinaire comportant différentes expérimentations réalisées sur les deux partenaires de l'interaction (**Chapitre 2** « Matériels et méthodes expérimentales »). Après avoir sélectionné des isoformes de PME et

PMEI susceptibles d'intervenir dans les interactions plante-puceron, des plants transgéniques (mutants ou surexpresseurs) pour ces isoformes ont été utilisés, ainsi que les plants sauvages

d'*A. thaliana* utilisés pour les élaborer. Ainsi, les différentes expérimentations concernant le puceron et la plante devront permettre de répondre à plusieurs questions (**Chapitres 3** « Résultats » et **4** « Discussion ») :

- Les PME-PMEI influencent-ils le comportement du puceron ?

Dans cette partie, l'impact des PME et PMEI choisies sur le comportement du puceron du pêcher *Myzus persicae* et notamment sur la progression de ses stylets au sein des parois, va être évalué en comparant les individus s'alimentant sur les plants transgéniques à ceux s'alimentant sur les écotypes sauvages Wassiledkija (WS) et Columbia (Col). En parallèle, il sera mis en évidence l'impact de la variabilité naturelle entre ces deux écotypes sauvages d'*A. thaliana* sur son comportement. Ces différents impacts seront mesurés dans un premier temps au niveau des capacités du puceron à accepter de se nourrir sur les différents plants (étude de son comportement trophique), puis sur ses capacités à se développer sur ceux-ci (étude de sa physiologie). Afin de mieux appréhender l'impact des PME-PMEI et de la variation naturelle d'*A. thaliana* sur le comportement du puceron, des expérimentations seront menées sur la plante.

- Les PME-PMEI affectent-elles la réponse de la plante à une infestation aphidienne ?

Les analyses menées sur la plante concerneront les modifications engendrées d'une part sur les feuilles transgéniques par les mutations/surexpressions des gènes PME-PMEI et d'autre part sur les feuilles sauvages et transgéniques ayant été infestées par des pucerons. Ces analyses concerneront la structure des feuilles et le profil d'expression de gènes associés aux défenses de la plante ou à la paroi des cellules foliaires. Elles concerneront aussi plus spécifiquement la paroi primaire végétale de ces cellules, avec notamment l'étude de sa structure et de sa composition en monosaccharides ainsi que des mesures d'activités d'enzymes modifiant les HG (PME et PG).

Les travaux réalisés au cours de cette thèse apportent des éléments de réponse à ces questions et dévoilent également un rôle bien plus large des PME, aussi bien dans les plants infestés par des pucerons que non infestés. Les rôles des PME et PMEI mis en évidence dans les interactions plante-puceron amènent à d'autres questions formulées dans le **Chapitre 5** « Conclusion et perspectives » du mémoire de thèse.

Avant d'aborder les différents rôles mis en évidence, je vais vous présenter une synthèse bibliographique permettant d'appréhender l'intervention de la paroi végétale dans les défenses mises en place par la plante contre des bioagresseurs et plus particulièrement les pucerons, avec une attention particulière pour les HGME et le modèle d'étude choisi.

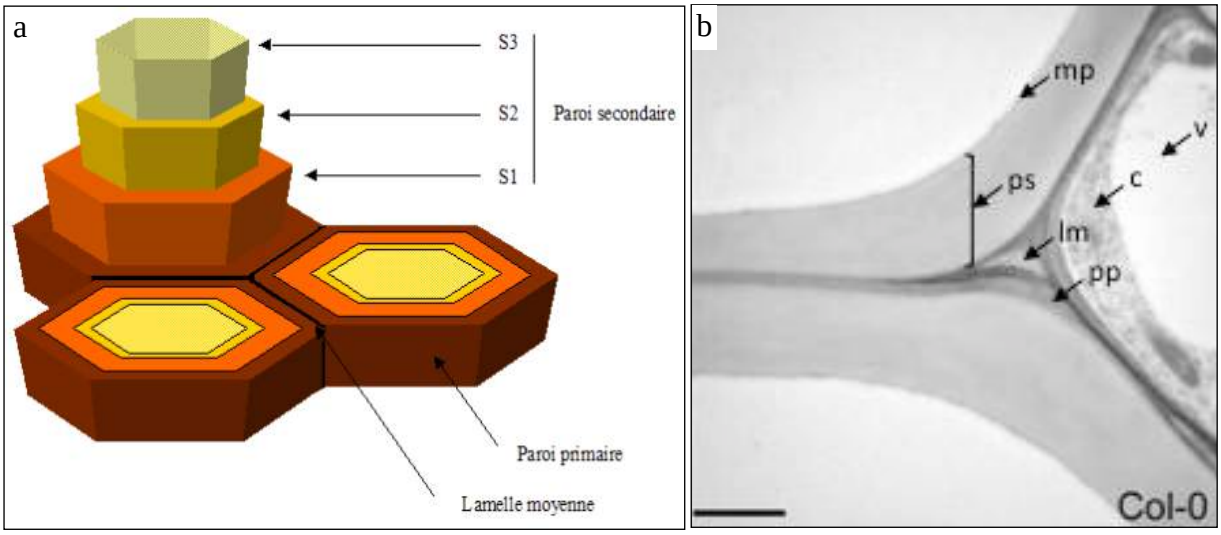


Figure 1 La paroi des cellules végétales et ses différents niveaux d'organisation
(a) Représentation schématique S1, S2, S3, parois secondaires déposées de la plus ancienne (S1) à la plus récente (S3) (source : http://amazingseaweed.wordpress.com/). **(b)** Coupe observée en microscopie électronique montrant la lamelle moyenne (lm), la paroi primaire (pp) et la paroi secondaire (ps) du metaxylème d'une racine d'*Arabidopsis thaliana* Col-0. D'autres structures sont mentionnées comme la membrane plasmique (mp), le cytoplasme (c) et la vacuole (v). Barre = 2 µm. D'après Persson *et al.* (2007).

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1. La paroi végétale, une défense constitutive dynamique

1.1. La paroi végétale, une barrière composite

La grande diversité de formes et de tailles des plantes associée à une grande diversité de formes et de tailles des cellules végétales implique la paroi, élément extracellulaire. La forme d'une cellule végétale résulte d'un équilibre entre la force hydrostatique qui pousse vers l'extérieur de la cellule et la tension de la paroi végétale qui entoure la cellule (Cosgrove 2000 ; Thompson 2005 ; Cosgrove 2005). L'expansion de la paroi peut influencer la morphogénèse (Pien *et al.* 2001 ; Kogovsek *et al.* 2011 ; Scholthof *et al.* 2011), même s'il reste encore à déterminer si cette expansion est à l'origine ou constitue l'aboutissement du processus (Edwardson & Christie 1997 ; Fleming 2005).

Outre sa fonction de support mécanique de la cellule, la paroi végétale est une clé déterminante dans les réponses de la plante à des stress environnementaux (Kerlan 1996 ; Sasidharan *et al.* 2011). Elle constitue à la fois une barrière physique et une source de signaux impliqués dans plusieurs processus physiologiques relatifs au développement et aux réponses à l'environnement. La paroi a donc une double spécificité : elle doit être rigide pour jouer le rôle de support et de barrière contre les stress mais aussi avoir une certaine élasticité pour permettre la croissance du végétal (Shukla *et al.* 1994 ; Hamann 2012). Ces particularités, à la fois antagonistes et complémentaires, sont à l'origine de la complexité de la paroi végétale. Des mécanismes contrôlant l'intégrité de la paroi, permettent à une cellule de rester informée sur l'état de sa paroi (Carrington & Dougherty 1987 ; Verchot *et al.* 1992 ; Wolf *et al.* 2012).

1.1.1. Structure de la paroi

La paroi végétale est constituée de trois couches : la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire (**Figure 1**). La lamelle moyenne est une jonction intercellulaire qui réunit les parois cellulaires contiguës, trouvant son origine dans la plaque cellulaire (phragmoplaste) formée dans le plan équatorial lors de la mitose, à la suite de la fusion de vésicules golgiennes (**Figure 1**, Raven *et al.* 2000). La lamelle moyenne est principalement constituée de pectines et dépourvue de cellulose (Iwai *et al.* 2002). Après sa formation, la paroi primaire se met en place (**Figure 1**). Elle est composée de microfibrilles, formant un réseau de fibrilles de cellulose cristalline intégrées dans un réseau hydraté complexe de polysaccharides (hémicelluloses et pectines) et de protéines. La paroi primaire permet la croissance et la différenciation cellulaire. Les différents polymères interagissent entre eux pour modifier la rigidité de la paroi et permettre au protoplaste de s'élargir face à la pression de turgescence au cours de la croissance et la différenciation cellulaire (Cosgrove 2000). Chez les plantes vasculaires, la paroi primaire est de type I sauf chez les Poacées où le type II a été défini (le maïs, *Zea mays ;* le blé, *Triticum spp ;* le

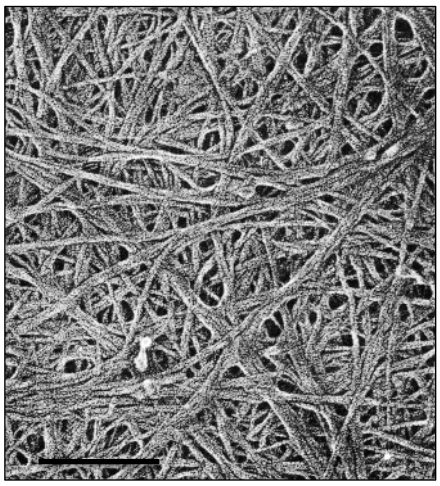


Figure 2 Paroi primaire végétale de cellule d'onion (*Allium cepa*) sans sa matrice pectique
Photographie en microscopie électronique à balayage montrant la nature fibrillaire de la paroi primaire végétale après extraction de la plupart de la matrice polysaccharidique. Barre = 500 nm. D'après McCann (1990).

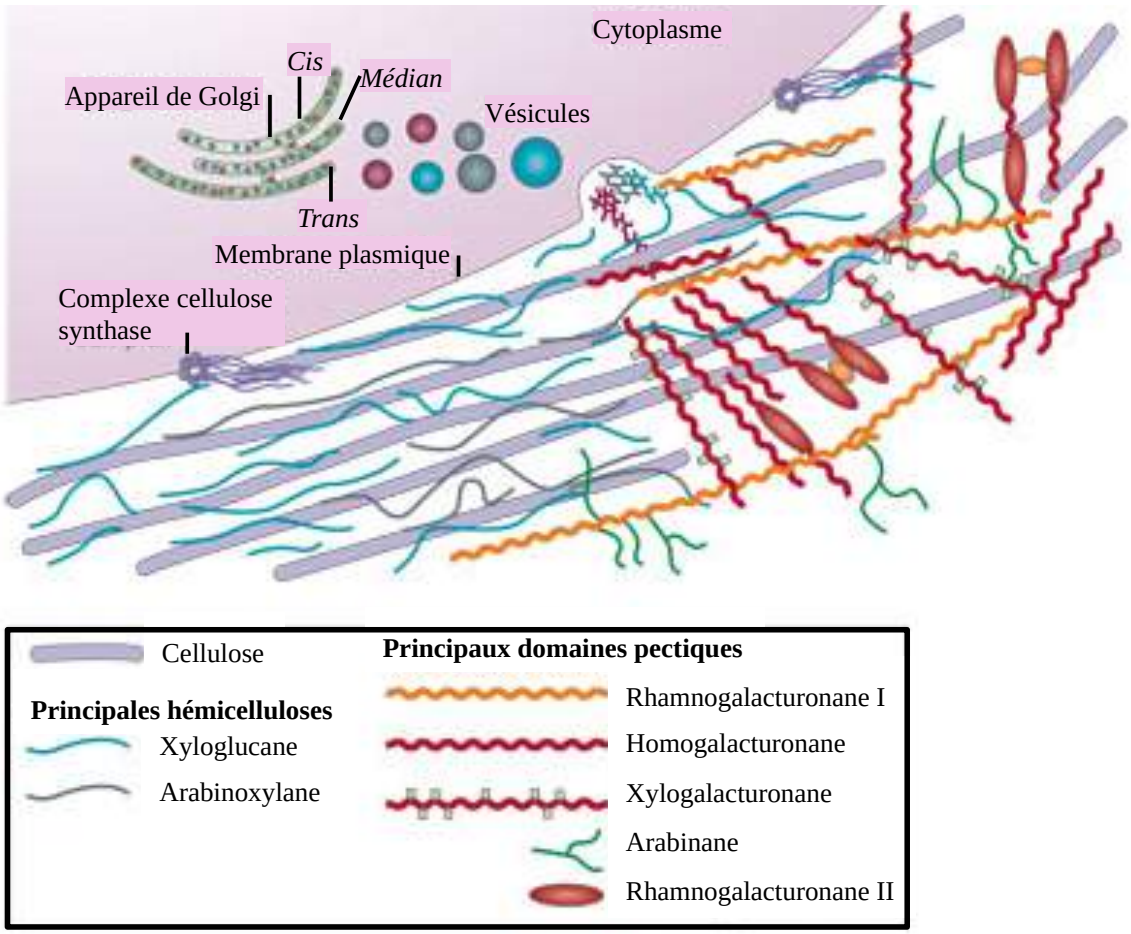


Figure 3 Représentation schématique de la structure de la paroi primaire
Les fibrilles de cellulose (mauve) sont synthétisées par les complexes hexamériques (cellulose synthases) dans la membrane plasmique. Les hémicelluloses et pectines sont synthétisées dans l'appareil de Golgi et déposées à la surface de la paroi par des vésicules. Chez la plupart des espèces végétales, les hémicelluloses sont principalement représentées par les xyloglucanes (bleu) et arabinoxylanes (gris). Les principaux polysaccharides pectiques regroupent les rhamnogalacturonanes I et les homogalacturonanes. Les xylogalacturonanes, les arabinanes, les arabinogalactanes (non représentés) et les rhamnogalacturonanes sont à des taux plus faibles. D'après Cosgrove (2005).

riz, *Oryza sativa*…) (Hsieh & Harris 2012). Ces dernières diffèrent des parois de type I par leur faible contenu en pectines, par leur contenu élevé en glucuronoarabinoxylanes (GAX), une hémicellulose qui n'est habituellement présente que dans les parois secondaires et par la présence de composés aromatiques (ferulate, p-coumarate, etc.) (Carpita 1996). Nous insisterons sur les parois primaires de type I, correspondant à la plante modèle qui sera étudiée.
Après le processus d'expansion cellulaire, la paroi secondaire se met en place (**Figure 1**). Elle est principalement composée de cellulose, d'hémicelluloses et d'un polymère aromatique appelé lignine. Elle se dépose sur la face interne de la paroi primaire par couches successives (S1-S3, **Figure 1a**) et ses composés, comme les monolignols précurseurs des lignines, sont synthétisés dans le cytoplasme puis dirigés vers la paroi secondaire et polymérisés afin de conférer à la cellule une haute résistance à la traction et à la pression (Vanholme *et al.* 2010). Elle est situées dans des types cellulaires particuliers, tels que les fibres de sclérenchyme présentes dans les tissus de soutien ou les tissus vasculaires (phloème, xylème) et les trachéides ou les éléments de vaisseaux du xylème, tissus caractérisant les végétaux vasculaires qui ont colonisé le milieu terrestre.

Dans les sections suivantes, nous allons nous intéresser plus particulièrement à la structure de la paroi primaire, les différents polysaccharides et les protéines puis à leur organisation au sein de la matrice pariétale qui est impliquée. Dans le cadre de notre étude concernant les interactions plante-puceron, il est reconnu que les pièces buccales (stylets) des pucerons progressent dans les parois primaire et secondaire et peu dans la lamelle moyenne (Tjallingii & Esch 1993). De plus, pour s'alimenter de sève élaborée dans les cellules du phloème, les stylets traversent principalement des tissus parenchymateux ne comportant qu'une paroi primaire ou une paroi secondaire non lignifiée (épiderme, parenchyme).

1.1.2. Structure fibrillaire cellulosique

L'observation en microscopie électronique à balayage montre que la paroi primaire est constituée d'un réseau dense de fibrilles de cellulose (**Figure 2**) dans laquelle différents composants (hémicelluloses, pectines, protéines) sont imbriqués (**Figure 3**).

La cellulose est un homopolymère comportant jusqu'à 14000 résidus de β-(1,4)-glucose, produit au niveau de la membrane plasmique par un ensemble de 6 unités cellulose synthases (CESA, **Figure 4**). Le complexe CESA coordonnerait la synthèse de 36 chaînes de β-(1,4)-glucane, pour former une microfibrille de cellulose , plusieurs microfibrilles étant regroupées en fibrilles (**Figure 4**, Doblin *et al.* 2002). Plusieurs microfibrilles liées entre elles par des liaisons hydrogènes constituent une fibrille, mesurant 3 à 5 nm de diamètre et jusqu'à 7 µm de longueur (Somerville *et al.* 2004 ; Cosgrove 2005).

Les hémicelluloses, chaînes plus courtes, sont des hétéropolymères complexes composés de résidus β-(1,4)-pyranose. Les résidus pyranoses peuvent être du glucose, du mannose ou du xylose et les hémicelluloses sont appelées respectivement des xyloglucanes, des mannanes ou des xylanes (Ebringerova *et al.* 2005). Dans les parois primaires de type I, la principale hémicellulose est le xyloglucane (O'Neill & Albersheim 1990), composé d'un squelette de β-(1,4)-glucose où jusqu'à 75 % des glucoses peuvent être substitués en α-(1,6) par des résidus

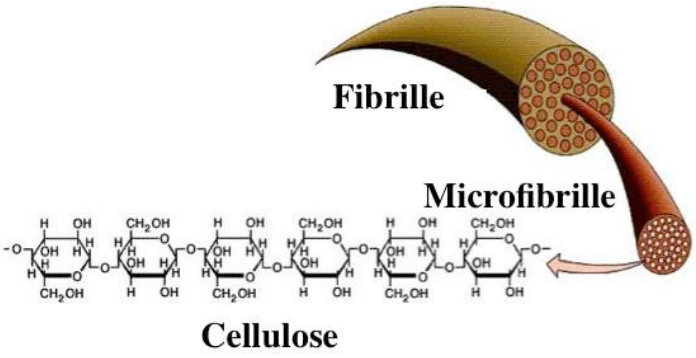


Figure 4 Structure d'une fibrille de cellulose
Les fibrilles de la cellulose sont formées de chaînes parallèles de cellobiose (= 2 résidus glucose liés en β 1-4), liées entre elles par des liaisons hydrogènes. D'après http://www.mhhe.com/

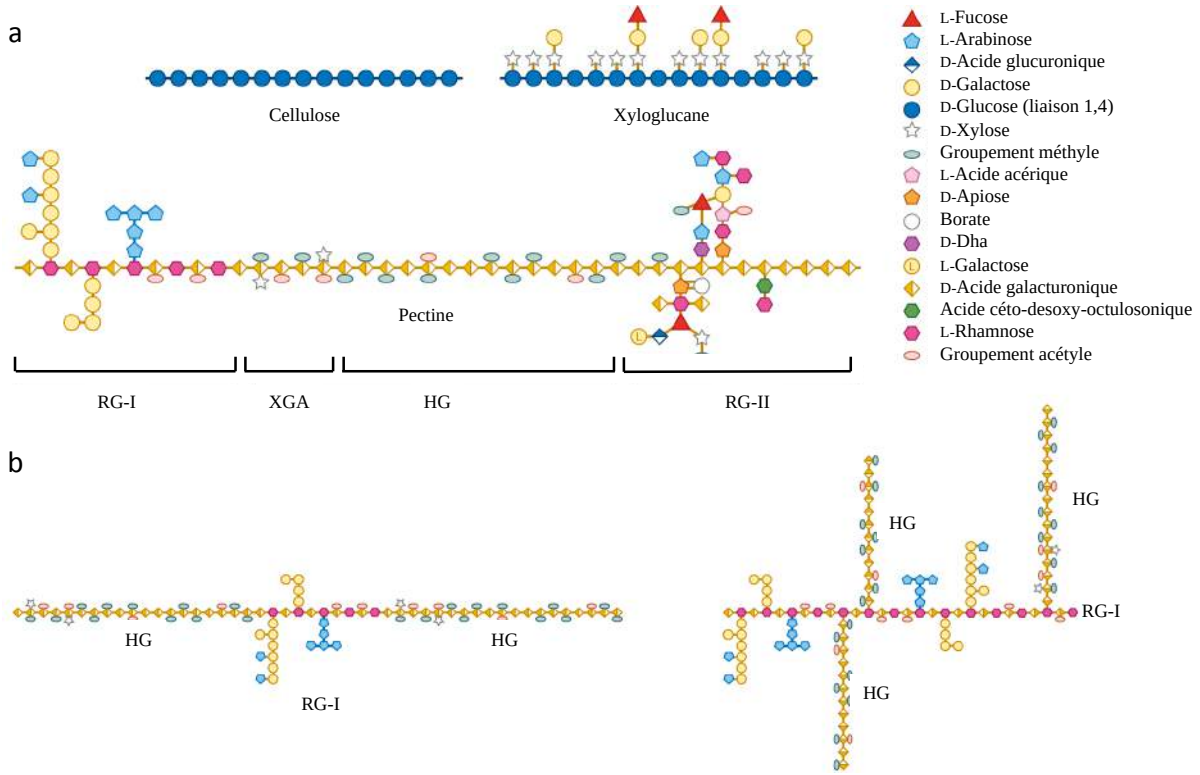


Figure 5 Représentation schématique des structures des principaux polysaccharides pariétaux
(a) Représentation de la cellulose, d'un xyloglucane et des polysaccharides pectiques rhamnogalacturonane I (RGI), xylogalacturonane (XGA), homogalacturonane (HG) et RGII. **(b)** Modèles d'organisation des différents domaines pectiques. A gauche, la chaîne principale est formée par l'alternance de HG et RGI et les sucres neutres portés par les RGI constituent les chaînes latérales (Schols & Voragen, 1996). A droite, le RGI forme la chaîne principale et porte à la fois les HG et les sucres neutres en tant que chaines latérales (Vincken, 2003). D'après Mohnen *et al.* (2008) et Wolf *et al*. (2012).

de D-xylose. Ces derniers peuvent eux-mêmes être substitués par des résidus, comme le D-galactose et/ou le L-fucose (**Figure 5**, Fry *et al.* 1993). Les hémicelluloses sont produites dans l'appareil de Golgi puis sécrétées par exocytose dans la paroi (Driouich *et al.* 2012). Cette structure fibrillaire de cellulose et hémicellulose est maintenue dans une matrice pectique (**Figure 3**).

1.1.3. Structure de la matrice pectique

Les pectines forment un groupe d'hétéropolysaccharides complexes qui représente généralement environ 35 % des parois primaires chez les dicotylédones (Mohnen 2008) et 2 à 10 % chez les monocotylédones. Plusieurs domaines structuraux distincts sont répertoriés, les homogalacturonanes (HG), représentant environ 65 % des pectines, les rhamnogalacturonanes I (RGI), 20 %, les rhamnogalacturonanes II (RGII), 10 % et les xylogalacturonanes (XGA), 7 % (**Figures 3 et 5**, O'Neill *et al.* 2004 ; Zandleven *et al.* 2007 ; Mohnen 2008). Ces pourcentages varient en fonction de l'espèce végétale considérée, de son stade de développement et de l'organe considéré (Ridley *et al.* 2001). Ces différents domaines interagissent pour former une macromolécule complexe, selon plusieurs modèles structuraux. Dans le premier modèle publié, les HG et XGA forment des zones lisses et les RGI et RGII les zones hérissées, ces domaines contenant des chaînes latérales de sucres neutres (**Figure 5b** gauche, Schols & Voragen 1996). Dans le second modèle, le squelette principal est uniquement formé par les RGI, toutes les autres sous-structures formant des chaînes latérales (**Figure 5b** droite, Vincken 2003). Le modèle considéré actuellement combine les deux derniers, plaçant les HG à la fois comme chaînes latérales et principales (Willats *et al.* 2006 ; Voragen *et al.* 2009).

Comme pour les hémicelluloses, la biosynthèse des pectines (HG, XGA, RGI et RGII) s'effectue dans l'appareil de Golgi (**Figure 3**, Driouich *et al.* 2012). L'homogalacturonane est un homopolymère linéaire constitué d'environ 100 résidus d'acides galacturoniques (GalA) liés en α-(1,4) (**Figures 3 et 5**, Thibault *et al.* 1993). Certains résidus GalA peuvent être estérifiés en position C-6 par des groupements méthyles et en position O-2 et/ou O-3 par des acétyles. Les HG, qui nous intéresseront plus particulièrement, sont synthétisés sur la face *cis* de l'appareil de Golgi grâce notamment à des galacturonosyl transférases (GAUT, Atmodjo *et al.* 2013). Sur la face *médiane,* les HG formés sont méthylestérifiés grâce à des pectine méthyltransférases (PMT) qui catalysent le transfert des groupements méthyles à partir de S-adénosine méthionines (SAM). Ils peuvent être aussi acétylés *via* des HG-acétyl transférases (Ridley *et al.* 2001). Enfin, sur la face *trans,* les HG peuvent être substitués par d'autres sucres pour donner les RGII (Zhang & Staehelin 1992 ; Staehelin & Moore 1995 ; Sterling *et al.* 2006). Les pectines sont ensuite transportées par des vésicules jusqu'à la membrane plasmique où elles sont exocytées dans la paroi (**Figure 3**).

Les HG sont déposés dans la paroi végétale sous forme hautement méthylée, avec un degré de méthylestérification (DM) de 70 à 80 % (O'Neill & Albersheim 1990) et un degré d'acétylation (DA) variant de 0,25 % (citron) à 5-10 % (fraise, Gou *et al.* 2012). En fonction de son DM, un HG pourra être désigné par pectine (DM > 75 %) ou acide pectique (pectate) (DM < 75 %, Jayani *et al.* 2005). La modification du DA et du DM des HG par des enzymes au sein de la paroi sera abordée par la suite.

Tableau 1 Classification des protéines pariétales d'*A. thaliana* en 9 classes fonctionnelles d'après leurs domaines fonctionnels prédits

D'après Albenne *et al.* (2013)

Catégorie	%	Exemple de protéine	Principale fonction prédite
Protéines agissant sur les polysaccharides	**25,7**		
Glycosides hydrolases (GH)	19,4	Polygalacturonases	Métabolisme des pectines
		β-galactosidases	Métabolisme du galactose
		β-endoglucanases	Métabolisme du glucose
		β-endochitinases	Métabolisme de la chitine
Estérases	2,4	Pectine méthylestérases	Déméthylestérification des HG
		Pectine acétylestérases	Déacétylation des HG
		Rhamogalacturonane acétylestérases	Déacétylation des RGI
Lyases	0,6	Pectine/pectate lyases	Hydrolyse des HG
		Rhamnogalacturonane lyases	Hydrolyse des RGI
Autres	2,4	Expansines	Modification des liaisons cellulose/hémicellulose
Protéines oxydo-réductases	**14,6**		
	6,2	Peroxydases	Dégradation du péroxyde d'hydrogène
	2,0	*Multicopper oxidases*	Oxydation de composés phénoliques
	2,2	*Berberine-bridge enzymes*	Oxydation de la réticuline
Protéases	**11,2**		
		Protéases à sérine (subtilases), à acide aspartique, ou à cystéine	Maturation de protéines
Protéines avec domaines d'interaction	**11,0**		
	2,6	Protéines à domaines LRR (*Leucine rich repeat*)	Interaction protéine-protéine
	2,4	Lectines	Interaction protéine-sucre
		Inhibiteurs de pectine méthylestérases	Inhibition des PME
	4,0	Inhibiteurs de polygalacturonases	Inhibition des PG
		Inhibiteurs de protéases	Inhibition de différentes protéases
Protéines possiblement impliquées dans la signalisation	**6,6**		
	2,4	Protéines à arabinogalactanes (AGP)	Transduction de signaux+ protéine structurale
	1,2	AGP à domaine fascicline	Adhésion cellulaire
	2,4	Récepteurs kinases	Perception et transduction de signaux
Protéines liées au métabolisme des lipides	**5,8**		
	1,8	Protéines de transfert de lipides	Transport des lipides
	2,4	Lipases	Catabolisme des triglycérides
Protéines structurales	**1,6**		
	0,6	Protéines riches en proline	
	0,8	Extensines	Liaisons entre composés pariétaux
Protéines de diverses familles	**11,0**	trop peu nombreuses pour former une classe fonctionnelle	-
Protéines de fonction inconnue	**12,5**	-	-

Certains GalA du squelette principal peuvent porter des résidus ou de courtes chaînes d'oses neutres, on parle dans ce cas de « galacturonanes substitués ». Les HG substitués en O-2 ou O-3 par des xyloses ou des apioses, sont appelés respectivement xylogalacturonanes ou apiogalacturonanes (Schols *et al.* 1995 ; Ridley *et al.* 2001).

Le deuxième domaine pectique le plus représenté est le rhamnogalacturonane I (**Figure 5**). La chaîne principale du RGI est composée de la répétition d'une centaine de motifs disaccharidiques [,2)-α-L-rhamnopyranose-(1,4)-α-D-galacturonylpyranose-(1,] (Albersheim *et al.* 1996). Les résidus GalA peuvent être *O*-acétylés en O-2 et/ou O-3 (Ishii 1997). Les résidus rhamnose (Rha) peuvent être substitués en O-4 avec des chaînes latérales de sucres neutres. Ces chaînes latérales sont principalement composées de résidus uniques de β-(1,4)-galactopyranose (galactanes), de résidus uniques de α-(1,5)-L-arabinofuranose (arabinanes) ou de polymères linéaires ou branchés de résidus [α-L-arabinofuranose- β-galactopyranose] (arabinogalactanes). La proportion de résidus Rha branchés varie de 20 à 80 % (Albersheim *et al.* 1996), tout comme leur nature, qui varie considérablement entre espèces (Vincken 2003).

Le troisième domaine pectique est appelé rhamnogalacturonane II. Il comprend une chaîne principale composée d'environ neuf résidus GalA auxquels sont unies quatre chaînes latérales complexes nommées A, B, C, D (**Figure 5**, O'Neill *et al.* 2004). Ces chaînes latérales contiennent des monosaccharides particuliers tels que le D-apiose (Api), l'acide L-acérique (Ace), l'acide 2-keto-3-deoxy-D-lyxo-heptulosarique (Dha) et l'acide 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonique (Kdo). Les RGII sont les polysaccharides les plus complexes rencontrés chez les plantes (Ridley *et al.* 2001), avec un nom pouvant être trompeur car il suggère que ce polysaccharide contient du rhamnose dans sa chaîne principale, ce qui n'est pas le cas, il n'est présent qu'en très faible quantité dans les chaînes latérales. La structure du RGII est très conservée parmi les plantes, même si certaines petites différences ont parfois été observées (O'Neill *et al.* 2004).

Dans les parois primaires, en plus des polysaccharides représentant plus de 90 % de la masse totale, il y a de très nombreuses protéines (Albenne *et al.* 2013).

1.1.4. Protéines pariétales

Les protéines pariétales sont très diverses. Le nombre de protéines pariétales est estimé chez *A. thaliana* entre 1500 et 2000 (Jamet *et al.* 2006). Des prédictions bio-informatiques indiquent que 500 d'entre elles possèdent une activité enzymatique ou une interaction protéine-protéine. Elles ont été classées en huit catégories décrites ci-après, selon leurs fonctions biochimique ou biologique prédite (Jamet *et al.* 2008 ; Albenne *et al.* 2013) (**Tableau 1**). La fonction n'est caractérisée que pour un petit nombre de ces protéines.

Les plus représentées sont les protéines agissant sur les polysaccharides (26 %), qui comprennent de nombreuses enzymes modifiant la cellulose, les hémicelluloses et les pectines (http://cellwall.genomics.purdue.edu). Parmi elles, on distingue des glycosides hydrolases qui clivent par hydrolyse et/ou réarrangent les liaisons glycosidiques, des estérases qui catalysent les

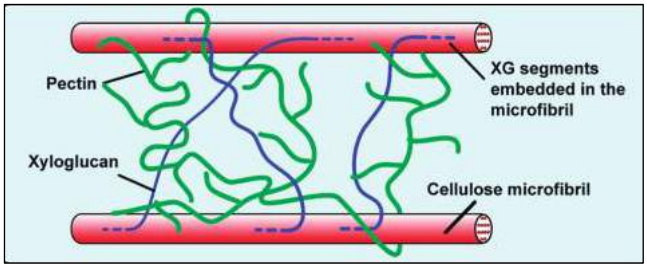


Figure 6 Modèle structural des polysaccharides pariétaux associés en réseau
Les pectines (vert) interagissent avec les microfibrilles de cellulose (rouge) par des liaisons hydrogènes et les XG (bleu) par des liaisons covalentes (Dick-Perez *et al.*, 2011).

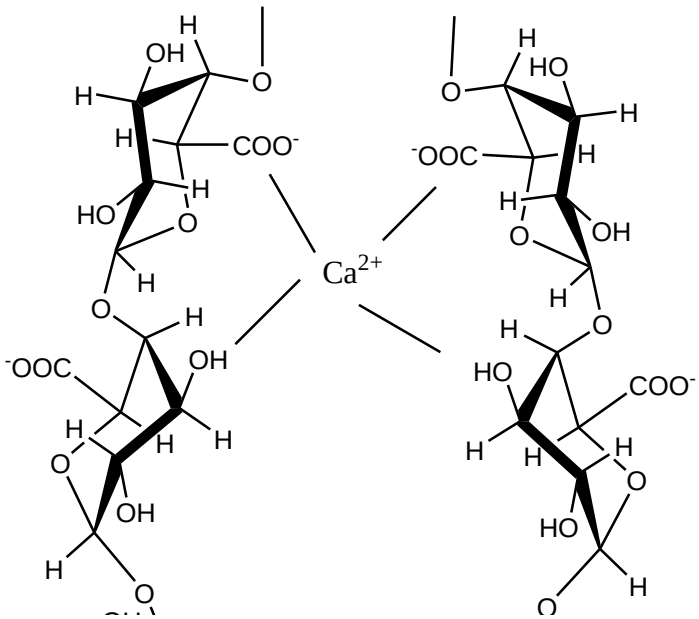


Figure 7 Structure en boîte à œufs des chaînes d'acide galacturonique
Liaisons de deux chaînes d'acide galacturonique *via* des ions calcium. D'après Braccini & Pérez (2001).

fonctions esters de glucides**,** des lyases qui clivent les liaisons glycosidiques par β-élimination et des expansines qui modifient les liaisons cellulose/hémicellulose. A l'inverse, il y a des protéines de diverses familles trop peu nombreuses pour former une classe fonctionnelle (11,9 %) et des protéines de fonction inconnue (12,6 %). Plusieurs autres classes de protéines sont représentées : des oxydo-réductases (12,4 %), des protéases (11,9 %), des protéines contenant des domaines d'interaction (10,6 %) avec des sucres (lectines) ou avec des protéines (inhibiteurs de pectine méthylestérases, PMEI, inhibiteurs de polygalacturonases, PGIP et les inhibiteurs de protéases). Dans des proportions plus faibles, par ordre décroissant, on trouve des protéines de signalisation (7,4 %), des protéines liées au métabolisme des lipides (5,4 %) et des protéines structurales (1,8 %). Ces dernières font partie de la superfamille de protéines appelées glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP). Les HRGP comprennent des protéines riches en proline (PRP) peu glycosylées, des protéines riches en glycine (GRP), des extensines et des arabinogalactanes protéines (AGP) fortement glycosylées (Mangeon *et al.* 2010 ; Lamport *et al.* 2011). Notons que les AGPs ont aussi une fonction de signalisation (Seifert & Roberts 2007).

Parmi toutes ces protéines, nous nous intéresserons tout particulièrement aux protéines impliquées dans le métabolisme des pectines : les polygalacturonases (PG), les pectine méthylestérases (PME), les pectine acétylestérases (PAE), pectate lyases-*like* (PLL) et à leurs inhibiteurs tels que PMEI ou PGIP (**Tableau 1**). Ces protéines sont donc largement impliquées dans les modifications de la paroi.

1.2. La plante modifie constamment sa paroi

Tout au long de la vie de la plante, la paroi adapte perpétuellement sa structure aux évolutions physiologiques et aux stress environnementaux *via* des modifications de liaisons ioniques ou hydrogènes entre les polysaccharides et de liaisons covalentes résultant d'activités enzymatiques.

1.2.1. Modifications des liaisons au sein du réseau pectique

A la complexité de la composition en polysaccharides des parois est associée une grande diversité de modifications permettant des changements de rigidité et d'extensibilité pariétale mais aussi de porosité. La porosité de la paroi végétale est associée au diamètre des pores formés par l'agencement des composés pariétaux au sein du réseau (1979). Ce réseau constitue une barrière physique offrant une résistance constitutive à la plante face à son environnement, notamment contre les bioagresseurs venant se nourrir du contenu cellulaire (Hückelhoven 2007). Des modifications de la porosité pariétale peuvent donc avoir un effet direct sur ces bioagresseurs. Ils ont également une incidence sur l'expansion et le développement des cellules végétales ou sur l'adhésion intercellulaire (Willats *et al.* 2001b).

Les hémicelluloses forment un réseau complexe avec les microfibrilles de cellulose soit directement avec des liaisons hydrogènes soit indirectement en faisant intervenir d'autres polysaccharides comme les pectines (**Figure 6**, Cosgrove 2005 ; Dick-Perez *et al.* 2011). Ces dernières peuvent en effet se fixer à des xyloglucanes (XG) de façon covalente au niveau des

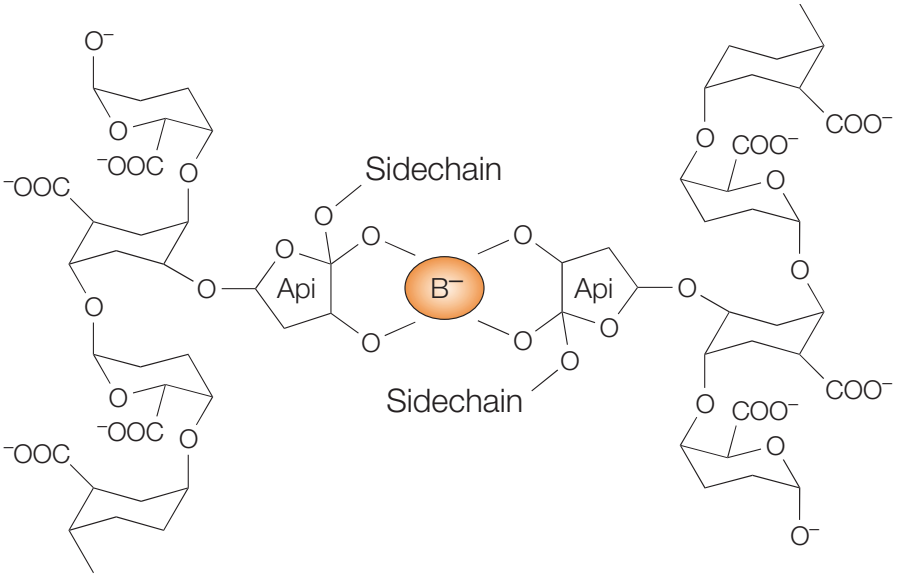


Figure 8 Dimère formé par 2 chaînes de rhamnogalacturonane II reliées par une liaison 1:2 borate diol ester
(Cosgrove 2005).

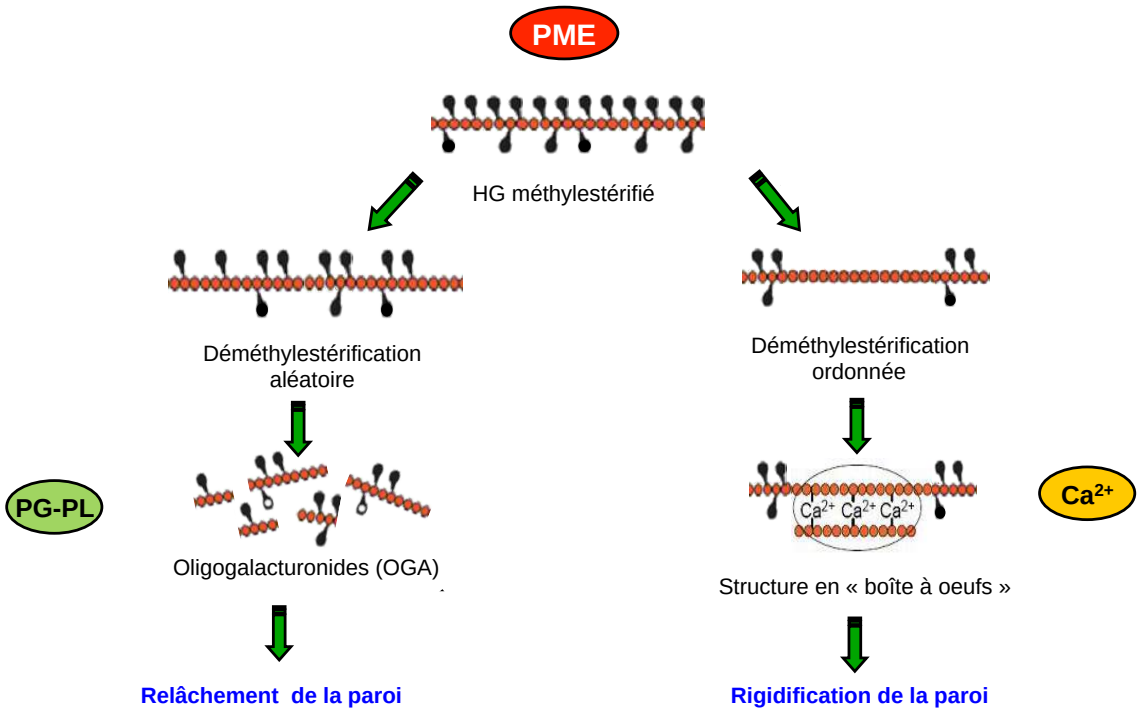


Figure 9 Modes d'action des pectine méthylestérases
En fonction des propriétés physico-chimiques de la paroi (pH, ions, degré de méthylestérification), les PME matures peuvent agir de façon aléatoire et promouvoir l'action d'hydrolases pariétales comme les endopolygalacturonases (PG) et les pectate lyases *like* (PL) ce qui contribue à un relâchement pariétal, ou de façon linéaire et ordonnée, dans ce cas les blocs d'acides galacturoniques déméthylés pouvant interagir avec les ions Ca^{2+} et former des structures en boîte à œufs, ce qui contribue à une rigidification pariétale. D'après Willats *et al*. (2006) et Micheli (2001).

arabinanes et des galactanes, chaînes latérales des RGI (Thompson & Fry 2000). En fonction de la densité des membres du réseau et /ou du niveau de compaction, la porosité de la paroi varie.
Les pectines ont un rôle particulier dans les modifications de la porosité. Les différents domaines pectiques, les HG et les RGII en particulier, peuvent être liés entre eux de façon covalente ou avec des liaisons ioniques, modifiant ainsi les propriétés gélifiantes de la matrice (Cosgrove 2005).

Les chaînes d'HG de degré de polymérisation (DP) suffisamment important (au moins 5 résidus de GalA) peuvent interagir avec les ions calcium (Ca^{2+}) de façon non covalente (liaisons ioniques) pour former des structures en « boîte à œufs » (Jarvis 1984 ; Cabrera *et al.* 2008). Cette structuration particulière des zones lisses va contribuer à la gélification de la matrice pectique (**Figure 7**).

Les RGII peuvent former des dimères de façon covalente par des liaisons 1 :2 borate ($B(OH)_4^-$)-diol diester. L'ester est plus précisément formé entre deux résidus apiosyl (Api) de la chaîne latérale A (**Figure 8**, Kobayashi *et al.* 1996). Il a été montré que la taille des pores du réseau pectique peut être réduit en 10 min en présence d'acide borique (Fleischer *et al.* 1999). Les facteurs gouvernant la stabilité des liaisons borate diester ne sont pas encore connus (Jarvis 2011) mais il est sûr qu'elles permettent la formation d'un réseau pectique tridimensionnel en liant les les RGII, qui peuvent être eux-même liés aux HG (Voragen *et al.* 2009 ; Bonnin *et al.* 2013).

Des protéines pariétales, par leur activité enzymatique, peuvent modifier la rigidité de la paroi (**Figure 9**). Par exemple selon les conditions du milieu (eau, pH, disponibilité en ions Ca^{2+}, etc.) et selon le mode d'action des PME, la rigidité de la paroi est modifiée par deux types de déméthylestérification (**Figure 9** ; Micheli 2001, Vincken 2003). Suite à une déméthylestérification ordonnée des HG par les PME, les groupements carboxyliques libres peuvent participer à la mise en place de ponts calciques et de structures en « boîte-à-œufs » en présence d'ions Ca^{2+}. A l'inverse, une déméthylestérification aléatoire, peut favoriser l'action de PG ou pectate lyases *like* produisant des fragments pectiques (oligogalacturonides, OG). Cette hydrolyse peut conduire à un relâchement pariétal (**Figure 9**) et à une augmentation de la taille des pores au sein des pectines ou des parois (Baron-Epel *et al.* 1988 ; Ehwald *et al.* 1992). Par ailleurs, les AGP contribuent aussi à l'augmentation de la porosité du réseau pectique et à l'expansion cellulaire car elles diminuent le nombre de liaisons entre pectines (Lamport & Kieliszewski 2005).

Les propriétés physico-chimiques de la paroi primaire sont donc dépendantes de la densité des chaînes polysaccharidiques mais aussi des liaisons ioniques entre elles. La densité et les liaisons ioniques sont dépendantes d'enzymes pariétales qui sont spécifiques à certaines chaînes polysaccharidiques présentes.

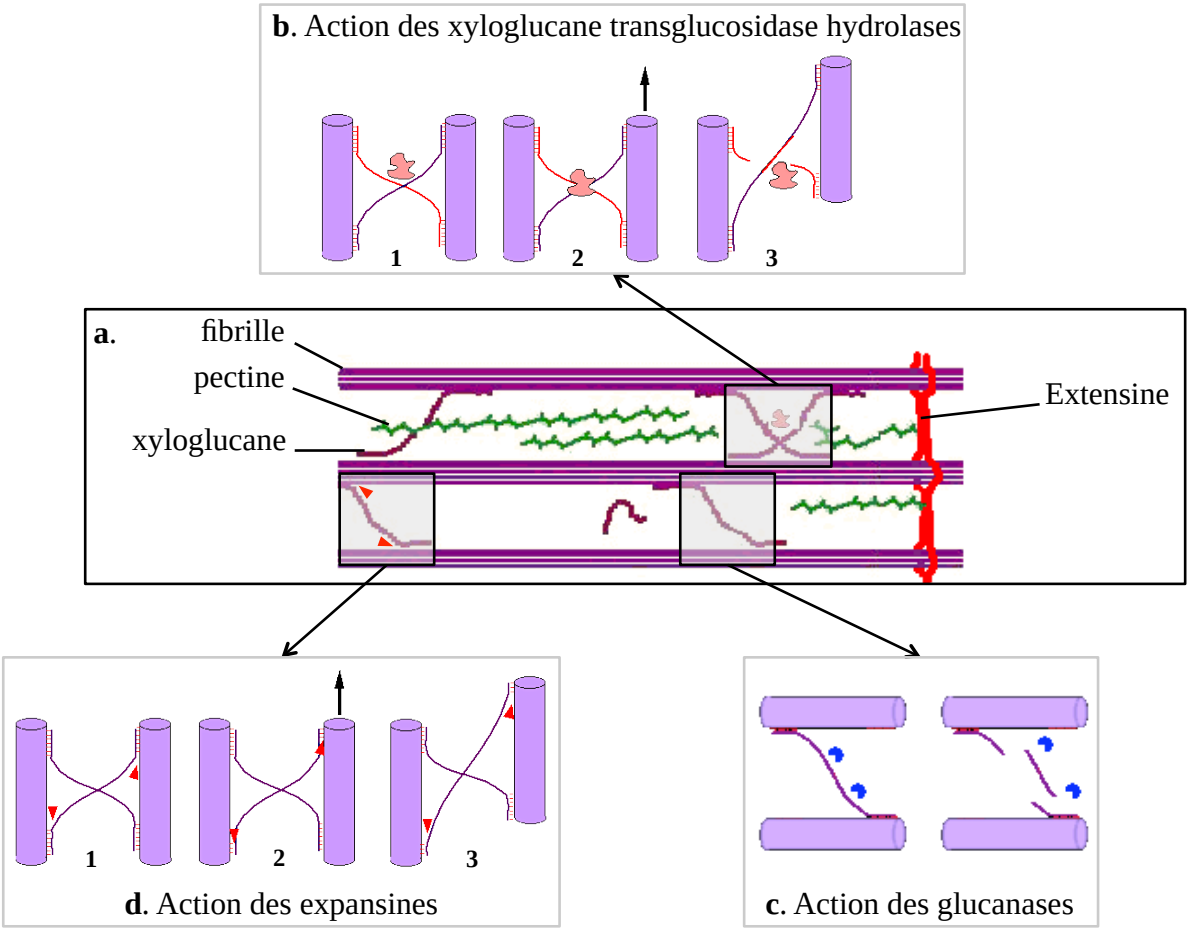


Figure 10 Illustration de l'action de protéines capables de modifier la distance entre fibrilles de cellulose et la rigidité de la paroi primaire.
(a) Les fibrilles de cellulose (traits violet épais) sont maintenues entre elles par des extensines (rouge), protéine de structure pouvant aussi se lier aux pectines (vert). Des protéines enzymatiques telles que **(b)** les xyloglucane transglucosidase/hydrolases (XTH) ou **(c)** les endo-β-(1,4)-glucanases, permettent un relâchement au niveau de la paroi primaire, en augmentant la distance entre les fibrilles respectivement par le transfert du segment xyloglucane (XG) rouge dans le XG violet, ou en catalysant l'hydrolyse des chaînes de glucose composant les XG (ou les fibrilles). Des protéines non enzymatiques peuvent aussi relâcher la paroi, telle que **(d)** les expansines, qui augmente la distance interfibrillaire en séparant les molécules de XG et les molécules de cellulose des fibrilles par cassure des liaisons hydrogènes. D'après http://www.snv.jussieu.fr, Fry (2004), Lamport *et al* 2011 et Humphrey *et al* (2007).

Tableau 2 Classification des enzymes dégradant les homogalacturonanes

Type	Enzyme	E.C. no.	Mécanisme d'action	Mode d'action	Substrat préférentiel	Produit	pH optimal
1. Estérases							
1. PME	Pectine méthylestérase	3.1.1.11	Hydrolyse	Aléatoire	Pectine	Acide pectique + méthanol	4,5 (champignons) 7 (plantes)
2. PAE	Pectine acétylestérase	3.1.1.6	Hydrolyse	Aléatoire	Pectine	Acide pectique + éthanol	-
2. Dépolymérases							
(a) Hydrolases							
1. Endo PG	Endopolygalacturonase	3.2.1.15	Hydrolyse	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonates	4-5
2. Exo PG	Exopolygalacturonase	3.2.1.67	Hydrolyse	Terminal	Acide pectique	Monogalacturonates	-
(b) Lyases							
1. Endo PL	Endopectate lyase	4.2.2.2	Trans-élimination	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonates insaturés	8-9
2. Exo PL	Exopectate lyase	4.2.2.9	Trans-élimination	Terminal	Acide pectique	Monogalacturonates insaturés	
3. Endo PNL	Endopectine lyase	4.2.2.10	Trans-élimination	Aléatoire	Pectine	Méthyl-oligogalacturonates insaturés	6

E.C. no., numéro de la classe d'enzyme (http://www.cazy.org).
D'après Jayani *et al.* (2005) et Yadav *et al.* (2009).

1.2.2. Modifications de la cellulose et des hémicelluloses

Des enzymes produites par la plante permettent aussi de modifier *in vivo* la paroi primaire afin de répondre aux contraintes de développement de la plante et aux contraintes environnementales (Fry 2004 ; Sasidharan *et al.* 2011). Ces enzymes pariétales sont répertoriées dans la classification CAZy (*Carbohydrate Active enZYmes*), qui repose sur une analogie de structure des modules catalytiques et de reconnaissance de motifs glucidiques qui catalysent la dégradation, la modification ou la création de liaisons osidiques (http://www.cazy.org). Parmi elles, les β-(1,4)-endoglucanases (classe CAZy GH E.C. 3.2.1.4) et les xyloglucane endo-transglycosidase hydrolases (XTH, GH E.C. 2.4.1.207) catalysent l'hydrolyse des liaisons glucidiques entre la cellulose et les hémicelluloses. De plus, des protéines non enzymatiques telles que les expansines et les extensines peuvent aussi modifier l'espacement entre la cellulose et les hémicelluloses (**Figure 10**). Les XTH, expansines et extensines appartiennent à des familles multigéniques et sont respectivement au nombre de 33, 36 et 20 chez *A. thaliana* (Cannon *et al.* 2008 ; Sasidharan *et al.* 2011).
L'expansine stimule l'extension de la paroi végétale en perturbant les liaisons hydrogènes entre les hémicelluloses et les fibrilles de cellulose (**Figure 10d**, Cosgrove 2000). La β-(1,4)-endoglucanase est une cellulase qui hydrolyse les β-(1,4)-glucanes (cellulose ou XG) (**Figure 10c**, Cosgrove 2005). Notons que certaines peuvent être liées à la membrane et être impliquées dans la synthèse de la cellulose (Mølhøj *et al.* 2002). Ces deux protéines contribuent à un relâchement pariétal permettant l'élongation cellulaire, voire l'abscission et la maturation de fruits pour l'expansine (Cosgrove 2000). La XTH permet aussi de relâcher la paroi en catalysant le réarrangement et la dégradation des XG par hydrolyse ou transglycosylation (**Figure 10b**, Shin *et al.* 2006). Mais elle peut aussi rigidifier la paroi en intégrant des xyloglucanes nouvellement formés ou allonger les XG pour permettre la croissance (Antosiewicz *et al.* 1997). L'extensine, en interagissant avec les fibrilles de cellulose ou *via* des interactions électrostatiques avec les domaines pectiques chargés négativement, jouerait un rôle important dans la rigidité de la paroi (**Figure 10a**, Wolf *et al.* 2012).

De la même façon, les enzymes modifiant les pectines vont intervenir sur les propriétés physico-chimiques de la paroi.

1.2.3. Modifications des pectines

1.2.3.1. Modifications des homogalacturonanes

Les pectinases dégradant les zones lisses des pectines (HG) sont classées en deux catégories, en fonction de la spécificité de la réaction catalysée, du substrat, du mode de coupure et des produits formés (**Tableau 2**, **Figure 11**) : les dépolymérases et les estérases. Les dépolymérases catalysent le clivage des liaisons α-(1,4)-glycosidiques constituant les chaînes de GalA par hydrolyse *via* des PG ou par trans-élimination *via* des lyases. Elles ont pour substrat préférentiel les acides pectiques et les endo-PG coupent les liaisons de façon aléatoire à l'intérieur du polymère, alors que les exo-PG coupent un motif GalA à l'extrémité non réductrice de la chaîne d'HG. Les estérases, qui sont des PME (E.C. 3.1.1.11) ou des PAE (E.C. 3.1.1.6), catalysent les

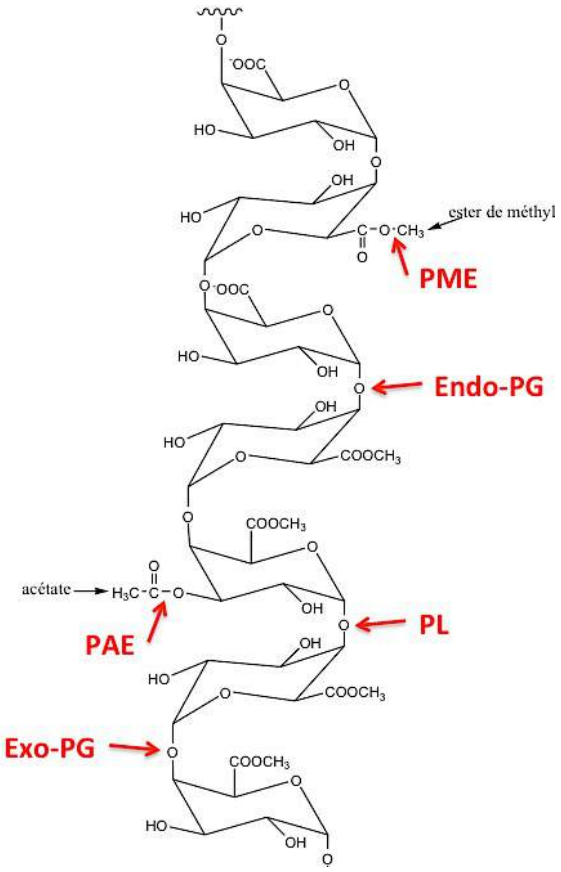


Figure 11 Site d'action des pectinases impliquées dans la dégradation des homogalacturonanes
(Illustration du Tableau 2). D'après Voragen *et al.* (2009) et Caffall & Mohnen (2009).

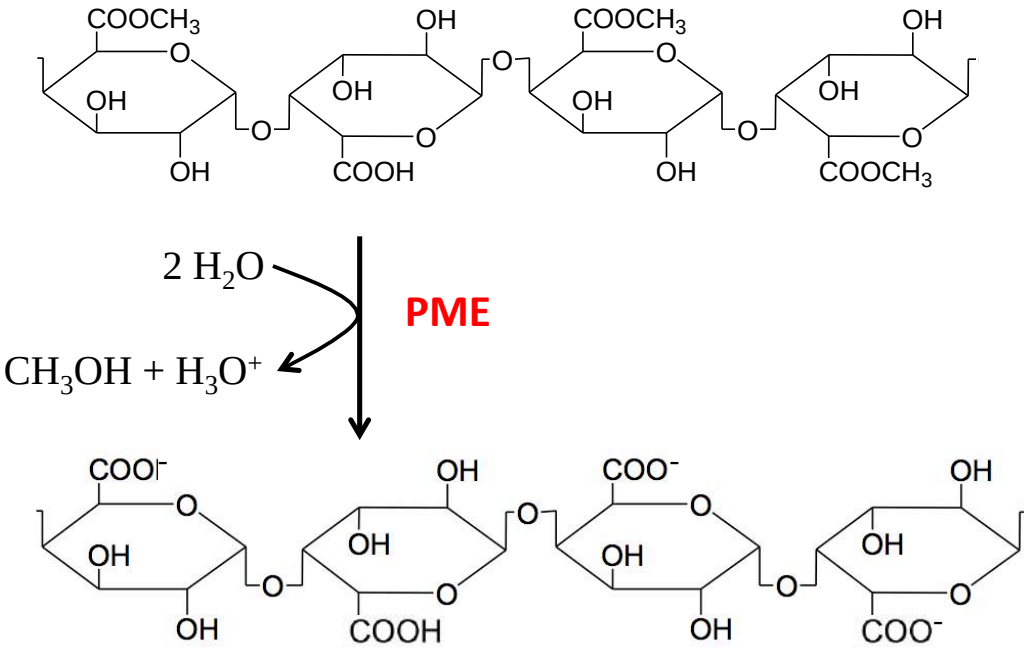


Figure 12 Action des pectine méthylestérases sur les homogalacturonanes
Sur le polymère linéaire d'acide α-D-galacturonique, les PME clivent les groupements méthyles présents au niveau des fonctions carboxyliques méthylestérifiés en position C6. D'après Ridley *et al.* (2001).

dé-estérifications respectivement en C-6 ou en O-2, O-3 des GalA (Jayani *et al.* 2005). Chez *A. thaliana*, toutes ces pectinases appartiennent à des familles multigéniques. Pour les PAE, PME, PG et PLL, 12, 66, 69 ou 26 isoformes sont respectivement répertoriées (Sénéchal *et al.* 2014b).

1.2.3.1.1. Estérases : pectine acétylestérases et pectine méthylestérases

Les **pectine acétylestérases** en éliminant les groupements acétyles (O-2 et O-3 des GalA) présents au niveau des acétylesters des pectines (HG ou RGI) forment de l'acide pectique et de l'éthanol (CH_3CH_2OH) (Ishii 1997 ; Mohnen 2008 ; Yadav *et al.* 2009). Outre chez *A. thaliana*, des PAE ont été découvertes chez le riz (*Oriza sativa*), le haricot mungo (*Vigna radiata*) et l'orange (Christensen *et al.* 1996 ; Bordenave *et al.* 1996).
Les **pectine méthylestérases** éliminent les méthyles fixés sur les C-6 des résidus GalA constituant les HG (**Figure 11 et 12**). Leur activité produit des acides pectiques dont les groupements carboxyliques chargés négativement peuvent se lier au calcium pour former les boîtes à œufs et rigidifier la matrice d écrit précédemment. Parallèlement, du méthanol volatile (CH_3OH) et des ions hydronium (H_30^+) acidifiant la matrice pectique sont libérés. L'acidification peut promouvoir l'action des endoPG et contribuer au relâchement pariétal. Des PME ont été découvertes dans de nombreux fruits comme la tomate (*Lycopersicum esculentum*), la pomme (Malus domestica), l'orange (*Citrus sinensis*) et le pamplemousse (*Citrus paradisi*) ou dans la carotte (*Dacus carota*) et la pomme de terre (Puri *et al.* 1982 ; Warrilow *et al.* 1994 ; Macdonald & Evans 1996 ; Corredig *et al.* 2000 ; Arias & Burns 2002 ; Alonso *et al.* 2003b,a ; Solanum tuberosum, Wolf *et al.* 2012).

A ce jour, quinze PME d'*A. thaliana* ont été caractérisées dans des organes végétatifs ou reproducteurs (**Tableau 3**). Outre leur rôle dans la croissance, on notera pour la PME3 un rôle dans la résistance des plantes à des bioagresseurs.

Quelque soit leur localisation dans la plante, en plus des régulations déjà mentionnées précédemment (disponibilité en ions, pH…), il existe des régulations associées à des motifs structuraux de l'enzyme. Toutes les PME possèdent un domaine catalytique (Pfam01095), défini par des acides aminés hautement conservés (Q113A, Q135, D136, D157, R225). Les PME peuvent contenir une extension N-terminale (la région PRO) montrant des similarités avec les domaines PMEI (*Pectin methyl esterase inhibitor*). Les PME sont ainsi classées en deux groupes distincts selon la présence ou l'absence du domaine PMEI putatif (**Figure 13**, Pelloux *et al.* 2007). Les PME du groupe 1 ne possèdent pas de région PRO tandis que les PME du groupe 2 peuvent contenir de 1 à 3 domaines PMEI (Tian *et al.* 2006).

Il a été supposé que la région PRO soit clivée par des protéases de type subtilisines durant la maturation de la PME (Wolf *et al.* 2009b), puisque des PME sans ce domaine ont été retrouvées dans la paroi (Albenne *et al.* 2009 ; Guénin *et al.* 2011). Les PMEI ne sont pas observés uniquement dans la région PRO des PME mais existent aussi en tant que protéine, transitant par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, puis dirigées vers la paroi par exocytose grâce

Tableau 3 Pectine méthylestérases caractérisées chez *A. thaliana*.
D'après Lionetti *et al*. (2012)

Nom*	Locus	Localisation	Rôle(s) identifié(s)	Références
AtPPME1 (PPME1)	At1g69940	Pollen	Forme et croissance du tube pollinique	(Röckel *et al.*, 2008)
AtPME1	At1g53840	Rosette, inflorescence	-	(Richard *et al.*, 1996)
AtPME2	At1g53830	Rosette	-	Richard *et al.* (1996)
AtPME3	At3g14310	Racine, feuille (phloème)	Susceptibilité à un nématode, une bactérie un champignon ou au stress zinc ; Longueur des racines, nombre de racines adventives	(Micheli *et al.*, 1998; Hewezi *et al.*, 2008; Raiola *et al.*, 2011; Guénin *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2013)
AtPME4 (VGDH1)	At2g47030	Pollen	-	(Yang *et al.*, 2005)
AtPME5 (VGD1)	At2g47040	Pollen	Elongation du tube pollinique	(Yang *et al.*, 2005)
ATPME16 (PCRD)	At2g43050	Silique	-	(Micheli *et al.*, 1998)
AtPME17	At2g45220	Racine, feuille	Croissance racinaire	(Sénéchal *et al.*)
ATPME26 (PCRC)	At3g14300	Rosette, fleur	-	(Micheli *et al.*, 1998)
AtPME35	At3g59010	Tige inflorescencielle (fibres interfasciculaires)	Port dressé de la tige	(Hongo *et al.*, 2012)
AtPME37 (VGDH2)	At3g62170	pollen	-	(Yang *et al.*, 2005)
ATPME41 (PCRB)	At4g02330	Rosette, inflorescence	-	(Micheli *et al.*, 1998)
ATPME61 (PCRF)	At5g53370	Rosette, inflorescence		(Micheli *et al.*, 1998)
AtPME62 (QRT1)	At5g55590	Pollen	Division de la microspore en tétrade	(Francis *et al.*, 2006)
AtPME68 (AtPME5)	At5g47500	Méristème	Formation des primordia foliaires	(Peaucelle *et al.*, 2008)

***** Le nom de la PME est issu de l'étude de Markovic & Janecek (2004). Le nom associé à l'étude est précisé entre parenthèses lorsque celui-ci est différent de cette nomenclature.

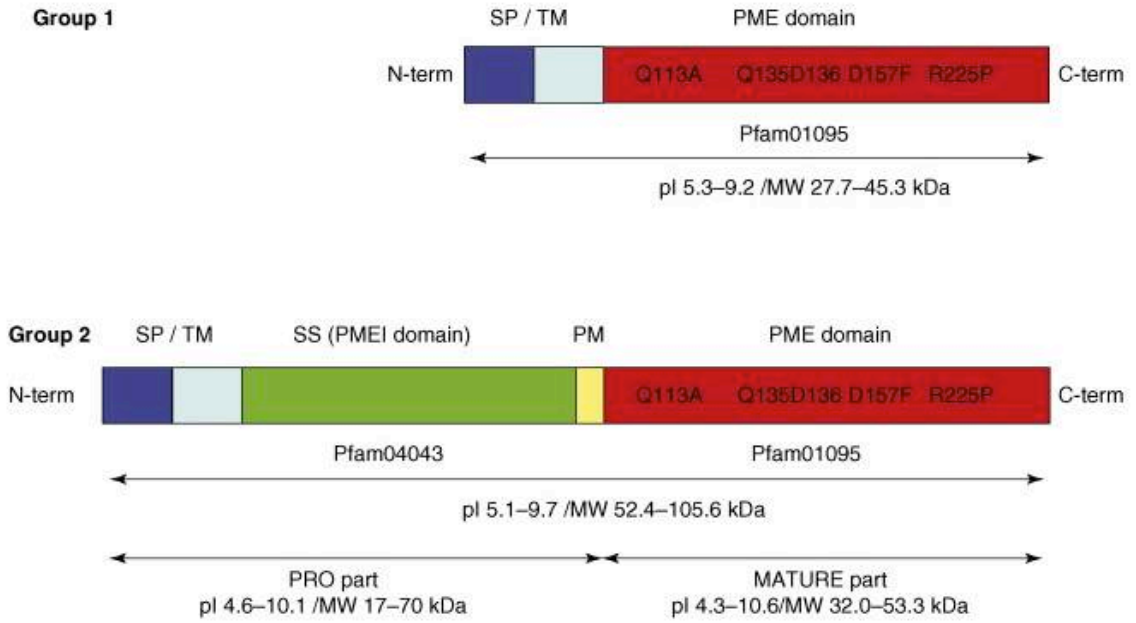


Figure 13 Motifs structuraux des pectine méthylestérases
Les PME du groupe 1 et du groupe 2 sont distinguées en évidence par la présence ou non d'un domaine PMEI. Les PME du groupe 2 possèdent une extension N-terminale désignée comme région PRO, qui partage de fortes similarités avec le domaine PMEI (Pfam04043), et un motif de transformation (*processing motif*, PM). Le transfert des PME du système endomembranaire vers la paroi s'effectue dans les deux groupes par un signal peptide (SP) ou un domaine transmembranaire (TM). Les PME possèdent un, deux ou aucun de ces motifs. Celles n'en possédant aucun sont classées comme des isoformes solubles. D'après Pelloux *et al.* (2007).

à un glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) permettant un ancrage des PMEI au niveau membranaire par leur extrémité C-terminale. Cependant, toutes les PMEI ne possèdent pas une ancre GPI (Röckel *et al.* 2008). En l'absence de cette ancre, le PMEI reste dans l'appareil de Golgi (De Caroli *et al.* 2011). Les PMEI partagent plusieurs similarités de séquence et de structure avec les inhibiteurs d'invertase CIF (*Cell wall inhibitor of β-fructosidase* ; Scognamiglio *et al.* 2003, Rausch & Greiner 2004), comme la présence de cinq résidus très conservés de cystéine, dont quatre forment deux ponts disulfures dans le PMEI de kiwi et le CIF du tabac (Camardella *et al.* 2000 ; Hothorn *et al.* 2004). Chez *A. thaliana*, les PMEI/CIFs constituent une famille multigénique comportant 69 isoformes putatives (Sénéchal *et al.* 2014b).

D'abord identifiés chez le kiwi (Balestrieri *et al.* 1990), des PMEI ont été découverts chez *A. thaliana* (Wolf *et al.* 2003 ; Raiola *et al.* 2004 ; Lionetti *et al.* 2007), le piment rouge (*Capsicum annuum* cv *Nockwang*, An *et al.* 2008), le brocoli (*Brassica oleracea* var *italica*, Zhang *et al.* 2010b) et le blé (*Triticum aestivum*, Hong *et al.* 2010). Les PMEI agissent par la formation d'un complexe non covalent et réversible avec les PME, à stoechiométrie 1:1 (Di Matteo *et al.* 2005).

L'étude de la structure primaire des PMEI d'*A. thaliana* ou du PMEI de kiwi, a montré que ce sont des protéines de masse moléculaire d'environ 16 000 Da, composées d'environ 150 acides aminés (aa), dont 5 Cys. Des analyses cristallographiques couplées à des prédictions bio-informatiques ont permis d'établir que la structure tridimensionnelle des PMEI est essentiellement représentée par des hélices α (7 hélices, **Figure 14a**). Les plus grandes hélices (α1, α2, α3 et α4) situées en C-terminal sont alignées de manière antiparallèle, entraînant la formation d'un faisceau, qui vient directement en contact avec le site actif des PME (**Figure 14c**). Les autres hélices du côté N-terminal (hélices αa, αb et αc) présentent une position parallèle par rapport au plan défini par les hélices α1 à 4, formant ainsi un domaine en épingle à cheveux (« *hairpin* »), qui va stabiliser le complexe PMEI-PME (Di Matteo *et al.* 2005 ; Jolie *et al.* 2010). Les structures tridimensionnelles de PMEI d'*A. thaliana* et du PMEI de kiwi sont très proches. Cependant l'extrémité N-terminale et les boucles connectant les hélices du fagot sont différentes (Hothorn *et al.* 2004).

Le PMEI de kiwi est actif contre des PME de différentes plantes : kiwi, orange, pomme, tomate, abricot, carotte, pomme de terre, banane (Bellincampi *et al.* 2004 ; Giovane *et al.* 2004 ; Ly-Nguyen *et al.* 2004). Une fois le complexe PMEI/PME formé, l'affinité entre les deux protéines peut être influencée directement ou indirectement par le pH et la salinité de l'environnement (Hothorn *et al.* 2004 ; Di Matteo *et al.* 2005).

Les composés résultants des activités estérases constituent des substrats pour des dépolymérases. L'activité de ces dernières est favorisée par de faibles degrés de méthylestérification ou d'acétylation obtenus par l'activité des estérases (Tardy *et al.* 1997 ; Parenicová *et al.* 2000).

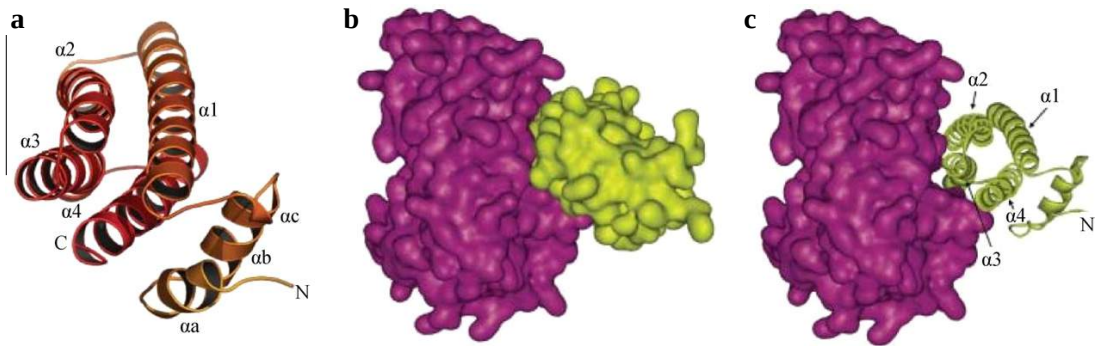


Figure 14 Structure tridimensionnelle d'un PMEI de kiwi (a, b et c partie verte) seul ou associé à une PME de tomate (violet)

Les hélices α des 4 «faisceaux» (*bundles*) sont numérotées de 1 à 4, tandis que les hélices de la région N-terminale sont nommées αa, αb et αc. Les hélices 2, 3 et 4 de l'inhibiteur se lient à la région du site actif de la PME (Jolie *et al.*, 2010).

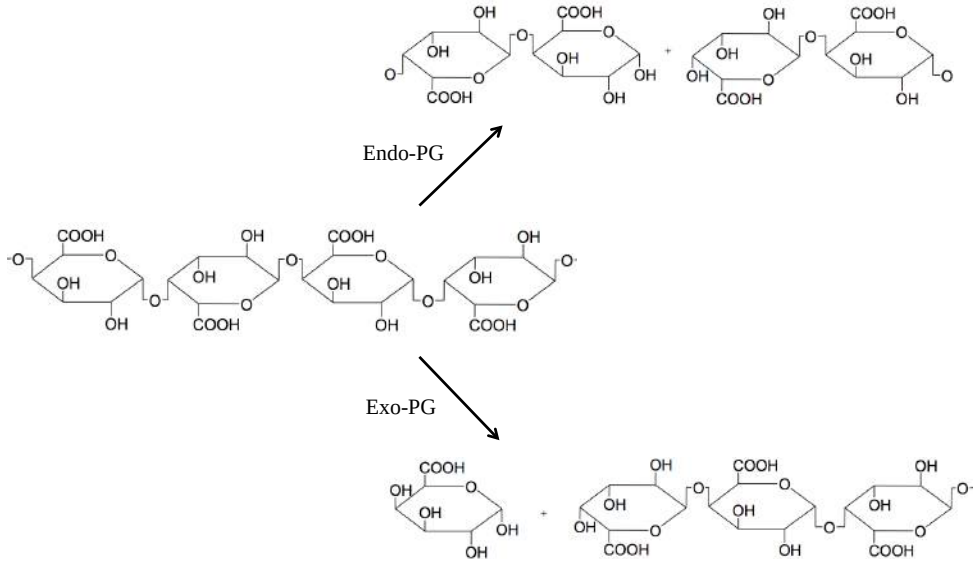


Figure 15 Production de fragments pectiques après l'action des polygalacturonases sur les homogalacturonanes

Les PG clivent par hydrolyse les liaisons α-(1,4) entre GalA soit en créant des fragments de plus de deux résidus GalA (endoPG), soit en retirant le résidu GalA présent à l'extrémité non-réductrice de la chaîne (exoPG). D'après Voragen *et al.* (2009).

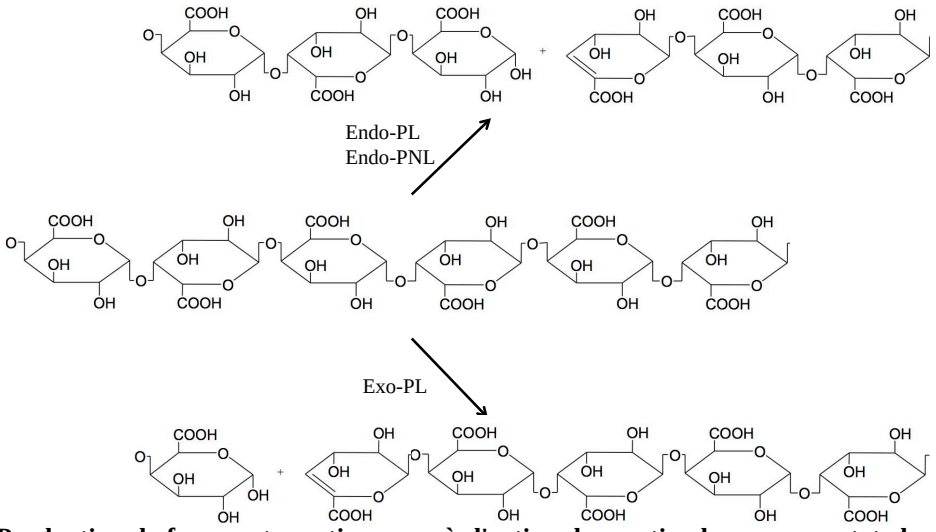


Figure 16 Production de fragments pectiques après l'action des pectine lyases ou pectate lyases sur les homogalacturonanes

Les pectine lyases (PL) ou pectate lyases (PNL) clivent par β-élimination (production d'une double liaison) les liaisons α-1,4 entre GalA.

1.2.3.1.2. Dépolymérases hydrolases : polygalacturonases

Les polygalacturonases clivent par hydrolyse (fixation d'une molécule d'eau) la liaison glycosidique α-(1-4) entre deux résidus GalA, favorisant ainsi le relâchement pariétal (**Tableau 2**, **Figures 11 et 15**). Les endo-polygalacturonases (endo-PG, EC 3.2.1.15) dégradent les HG aléatoirement à l'intérieur de l'homopolymère, générant des oligosaccharides avec un degré de polymérisation variable. Elles préfèrent généralement un substrat non-estérifié et montrent une activité inversement proportionnelle au degré de méthylestérification (Parenicová *et al.* 2000). Les exo-polygalacturonases (exo-PG, EC 3.2.1.67) ciblent l'extrémité non réductrice de l'homopolymère pour produire uniquement des monosaccharides GalA (**Figure 15**). Elles agissent sur des résidus GalA non estérifiés (Kester *et al.* 1999) mais peuvent aussi agir sur les xylogalacturonanes (Beldman *et al.* 1996). Des PG ont été identifiées et caractérisées chez la pêche (exo-PG), la tomate ou la carotte (Pressey & Avants 1973 ; Konno *et al.* 1989 ; Chun & Huber 1998). On notera qu'à ce jour, aucune protéine inhibitrice de l'activité des polygalacturonases de plante n'a été identifiée. Le même genre de fragmentation peut être obtenu par d'autres enzymes mais conduit à libérer des oligomères légèrement différents.

1.2.3.1.3. Dépolymérases lyases : pectine lyases et pectate lyases

Les pectate lyases-like (PLL) catalysent la dépolymérisation d'un substrat par trans-élimination de la liaison glycosidique α-(1-4) entre deux résidus GalA, qui aboutit à la formation d'une double liaison entre le C4 et le C5 à l'extrémité non réductrice du polysaccharide clivé (**Tableau 2**). (Mayans *et al.* 1997). En fonction du substrat et du mode d'action, on distingue deux types de lyases : les pectate lyases (PL) et les pectines lyases (PNL) (**Figures 11 et 16**).

Les PL, qui ont pour substrat préférentiel les acides polygalacturoniques très faiblement méthylestérifiés et forment des oligogalacturonates insaturés, requièrent absolument du calcium (Ca^{2+}). Même si le pH pariétal est généralement proche de 5, la plupart des PL a un pH optimal d'environ 8,5. Elles sont classées en deux groupes : les endo-PL (EC 4.2.2.2) qui agissent de façon aléatoire sur le substrat et les exo-PL (EC 4.2.2.9) qui clivent à l'extrémité non réductrice (**Figure 16**). A l'inverse, les PNL, qui ont pour substrat préférentiel les acides polygalacturoniques hautement méthylestérifiés et forment des méthyl-oligogalacturonates insaturés, ne requièrent pas forcément de calcium, même s'il peut stimuler leur activité. La plupart a un pH optimal généralement proche de 6 (Jayani *et al.* 2005). Pour l'instant, toutes les pectine lyases décrites dans la littérature sont des endo-pectine lyases (endo-PNL, EC 4.2.2.10) (Sinitsyna *et al.* 2007). La déméthylation des pectines facilite l'action des PL qui ont une faible activité sur des polymères méthylestérifiés (Tardy *et al.* 1997).
Comme pour les PG, l'activité de dépolymérisation des PL aboutit à un relâchement de la paroi et leur activité est facilitée par les PME et PAE (Shevchik & Hugouvieux-Cotte-Pattat 1997). Actuellement, uniquement deux PL ont été caractérisées et produites en système hétérologue, une chez le coton mexicain (*Gossypium hirsutum*) et l'autre chez l'hévéa (Chotigeat *et al.* 2009 ; Hevea brasiliensis, Wang *et al.* 2010). Leur mode d'action n'a pas été caractérisé. A ce jour, aucune inhibition de l'activité des lyases de plante par des protéines n'a été identifiée.

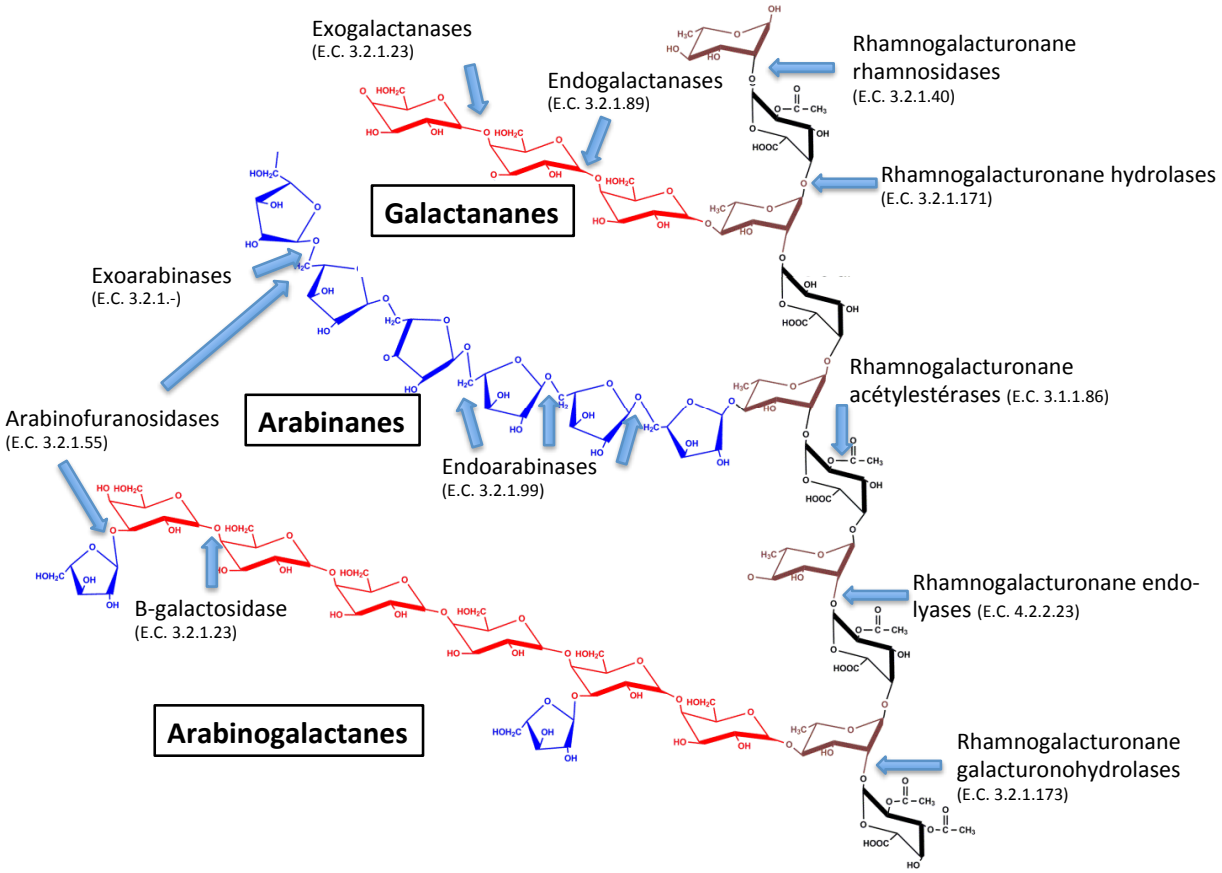


Figure 17 Mode d'action des rhamnogalacturonases impliquées dans la dégradation des rhamnogalacturonanes I
D'après Gamauf *et al*. (2007).

1.2.3.2. Modifications des rhamnogalacturonanes I

La dégradation des RGI, zones hérissées, implique des enzymes actives sur le squelette principal sur les chaînes latérales (arabinanes, galactanes, arabinogalactanes) et sur les groupements acétyles, présents uniquement sur les chaînes principales. La **Figure 17** illustre les sites de coupure pour chaque groupe d'enzymes. Les différents clivages de la chaîne principale aboutissent à la production d'acide galacturonique, de rhamnose et ceux des chaînes latérales à la production d'arabinose et/ou de galactose. Dans tous les cas, ces produits sont sous forme de mono- ou d'oligomères (Pedrolli *et al.* 2009 ; Lara-Márquez *et al.* 2011).

L'arsenal enzymatique présenté permet donc de densifier/rigidifier, de relâcher la structure de la matrice pectique ou augmenter sa porosité. Ces enzymes tendent également à favoriser la résistance de la plante aux bio-agresseurs par renforcement de la barrière physique ou la production d'une cascade de signalisation impliquée dans les défenses. Cependant les bioagresseurs possèdent également le même genre d'arsenal qui les aide à contourner les défenses mises en place par la plante.

2. La paroi végétale, d'une défense constitutive à une défense induite

La plupart des bioagresseurs (pathogènes ou insectes herbivores) déploit un arsenal plus ou moins important d'enzymes de dégradation de la paroi afin de pénétrer dans les tissus de la plante hôte et de se nourrir. Une résistance basale (non spécifique) va alors être initiée, suite à la perception spécifique d'éliciteurs fournis par les bioagresseurs et suite à la dégradation de la paroi végétale. L'activation des récepteurs déclenche par exemple l'activation de voies de signalisation aboutissant à la production de composés de défense comme la callose et l'induction transcriptionnelle de gènes de défense afin d'empêcher les bioagresseurs de progresser dans les tissus de la plante.

2.1. La perception des bioagresseurs par la paroi végétale

2.1.1. Dégradation de la paroi par les bioagresseurs

Au sein du réseau complexe de polysaccharides, les microfibrilles de cellulose sont espacées entre elles dans le plan de la paroi cellulaire d'environ 10 à 20 nm (McCann *et al.* 1990). Cela suppose que toute structure de plus grande dimension, comme les pièces buccales d'un puceron, une bactérie ou l'appressorium d'un champignon phytopathogène doit casser, dégrader ou déloger les microfibrilles de cellulose et ramollir la matrice pectique avant de pouvoir pénétrer à l'intérieur de la cellule, se nourrir et se développer (Jarvis 2009). D'importantes forces de pression mécaniques (Bechinger 1999) et/ou un arsenal d'enzymes hydrolytiques permettant de dégrader la paroi végétale (*Cell wall degrading enzymes*, CWDE) sont alors impliquée (Walton 1994). Ces violations de l'intégrité de la paroi sont perçues et alertent la plante hôte de la présence de bio-agresseurs qui met en place les défenses adéquates (Nühse 2012).

Les CWDE d'un bioagresseur diffèrent selon son mode de vie. Les pathogènes nécrotrophes bactériens ou fongiques, qui tuent la plante et se nourrissent des matières mortes, déploient un grand arsenal de CWDE qui favorise la macération des tissus. Les pathogènes biotrophes ou hémi-biotrophes (bactéries, champignons ou oomycètes) établissent une relation étroite avec les cellules végétales vivantes, sécrètent des quantités plus limitées de CWDE (Laluk & Mengiste 2010). Les insectes herbivores piqueurs-suceurs (pucerons, aleurodes ou psylles) ainsi que les nématodes (vers phytoparasites) ne blessent que très légèrement les tissus de la plante avec leurs stylets qu'ils déplacent au sein de l'apoplasme et des parois en faisant intervenir des CWDE. Enfin, de nombreux insectes n'ont pas de relation particulière avec la paroi ou la cellule végétale, comme par exemple les herbivores broyeurs (chenilles) qui détruisent considérablement les cuticules et les parois avec leurs CWDE afin de libérer les contenus cellulaires. C'est aussi le cas des insectes videurs de cellules (thrips, acariens) et d'autres insectes piqueurs-suceurs tels que les punaises, cicadelles et cochenilles (Walling 2009).

Tableau 4 Enzymes dégradant les homogalacturonanes présentes chez les bioagresseurs

Catégorie	Bactéries	Champignons	Nématodes	Insectes
Pectine méthylestérases	D (Jayani *et al.*, 2005)	D (Jayani *et al.*, 2005)	ND	D (Shen *et al.*, 2005)
Pectine acétylestérases	D (Shevchik & Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997)	Putative (Martens-Uzunova & Schaap, 2009)	ND	ND
Polygalacturonases	D (Jayani *et al.*, 2005)	D (Jayani *et al.*, 2005)	D (Jaubert *et al.*, 2002)	D (Shen *et al.*, 2003)
Lyases	D (Jayani *et al.*, 2005)	D (Jayani *et al.*, 2005)	D (Popeijus *et al.*, 2000)	ND

Activité enzymatique détectée (D) ou non détectée (ND).

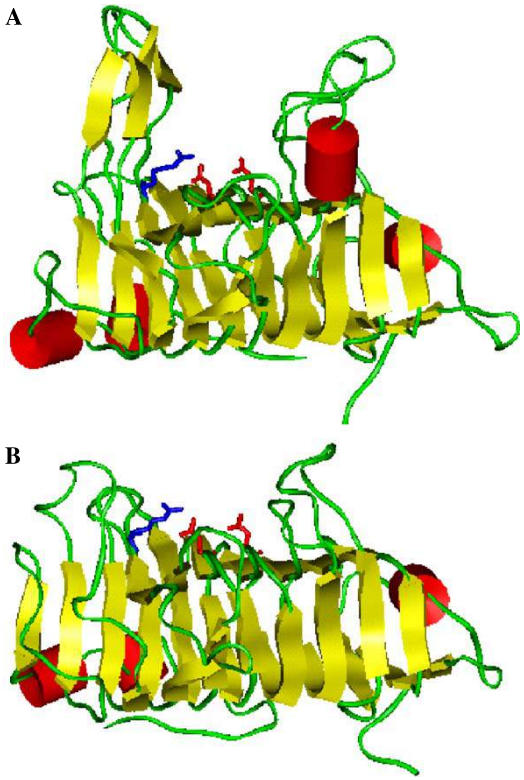


Figure 18 Représentation tridimensionnelle d'une PME d'*Erwinia chrysanthemi* (A) et d'une PME de carotte (B)

Les parties jaunes montrent des feuillets β et les cylindres rouges représentent des hélices α. Les résidus faisant partie du site catalytique [deux résidus Asp (rouge) et un Arg (bleu)] sont représentés dans la zone centrale (Giovane *et al.*, 2004).

2.1.1.1. Pectinases des bioagresseurs

Les CWDE libérées dans le compartiment extracellulaire, mises en évidence pour la première fois en 1886 par De Bary, sont souvent observées dans les phases initiales de la pathogénèse et sont aussi impliquées dans le processus d'infection (Li *et al.* 2011). Les enzymes de dégradation des pectines, les pectinases, sont généralement les premières CWDE sécrétées par les pathogènes (Walton 1994) et les pucerons (Miles 1999), incluant des PME, PG, PL et PNL. Les bactéries, les levures, les champignons, les nématodes et les insectes produisent aussi des pectinases (**Tableau 4**). Bien que ces dernières années de nombreuses recherches aient portées sur l'isolation, le clonage et la caractérisation de pectinases, elles n'ont pas toutes été identifiées (Gummadi & Panda 2003). Le séquençage de génomes permet d'obtenir ces identifications plus rapidement et de prédire des gènes codant des enzymes pectinolytiques. Par exemple, chez le champignon nécrotrophe *Aspergillus niger*, 39 gènes codant des pectinases ont été identifiés. Elles sont d'ailleurs produites industriellement à l'aide ce champignon et de la bactérie *Bacillus subtilis* (Martens-Uzunova & Schaap 2009). Par contre le génome du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*, obtenu en 2008 (Consortium 2010), ne présente pas de gènes codant des pectinases connues (Carolan *et al.* 2009). On notera qu'une activité pectinase a déjà été détectée chez certaines espèces de pucerons (Harmel *et al*. 2010).

La dépolymérisation des pectines par les PG et les lyases rend l'ensemble de la paroi plus lâche et expose les polymères cellulosiques aux cellulases des bioagresseurs (Walton 1994 ; Lionetti *et al.* 2010). Parmi les PG, les exo-PG n'ont été identifiées que chez les champignons et bactéries, les exoPG fongiques produisant des monogalacturonates alors que les exo-PG bactériennes produisent des digalacturonates au niveau des chaînes terminales de GalA (Jayani *et al.* 2005). Les lyases constituent d'importants facteurs de virulence de nombreux champignons ou bactéries phytopathogènes (Linhardt *et al.* 1987). Les endo-PL sont plus abondantes que les exo-PL. Peu de PNL ont été répertoriées et uniquement chez quelques bactéries ou champignons (Jayani *et al.* 2005). Les champignons sécrètent plutôt des PNL, alors que les bactéries produisent principalement des PL (Payasi & Sanwal 2003).
Par ailleurs, les PME fongiques (pH optimal 4,5), ayant tendance à retirer aléatoirement les groupements méthyles des HG, favorisent l'action des PG et le relâchement pariétal, alors que les PME végétales (pH optimal 7,0), déméthylant préférentiellement de façon linéaire, favorisent la formation de structures en boîte-à-œufs (Micheli 2001). Une étude phylogénétique comparant les séquences de PME de plantes, bactéries ou champignons a montré que les PME de bactéries et de champignons forment leur propre clade, alors que celles de plantes en forment huit (Markovic & Janecek 2004). Cependant leurs structures tridimensionnelles restent très proches (**Figure 18**, Giovane *et al.* 2004).

Les bioagresseurs sécrètent aussi des protéases, chitinases, glucanases, enzymes qui s'attaquent à l'ensemble des composants de la structure pariétale. Certaines de ces enzymes, ainsi que certaines pectinases produites par les bioagresseurs, plus particulièrement par les pathogènes, peuvent être régulées par la plante.

Tableau 5 Inhibiteurs de pectine méthylestérases caractérisés chez *A. thaliana*

Nom	Locus	Rôle(s) identifié(s)	Références
AtPMEI1	At1g48020	-Résistance contre le champignon *B. cinerea* et la bactérie *Pectobacterium carotovorum*	(Raiola *et al.*, 2004; Lionetti *et al.*, 2007; Raiola *et al.*, 2011)
AtPMEI2	At3g17220	-Résistance contre *B. cinerea* et *P. carotovorum* -Taille des cellules et organes -Croissance du tube pollinique	(Raiola *et al.*, 2004; Lionetti *et al.*, 2007; Röckel *et al.*, 2008; Lionetti *et al.*, 2010; Raiola *et al.*, 2011)
AtPMEI3	At5g20740	Développement du méristème apical	(Peaucelle *et al.*, 2008)
AtPMEI4	At4g25250	Accélération de la croissance cellulaire	(Pelletier *et al.*, 2010)
AtPMEI5	At2g31430	Germination des graines	(Müller *et al.*, 2013)
AtPMEI6	At2g47670	Libération du mucilage de graines	(Saez-Aguayo *et al.*, 2013)

2.1.1.2. Inhibition de pectinases des bioagresseurs

Les plantes synthétisent différentes classes d'inhibiteurs protéiques dirigés contre des enzymes produites par des pathogènes (Bellincampi *et al.* 2004). Parmi ces inhibiteurs on retrouve des protéines PR (*Pathogenesis Related*) telles que des glucanases empêchant la dégradation de la cellulose ou des chitinases attaquant la chitine des parois de champignons (Van Loon *et al.* 2006). Il existe aussi des inhibiteurs d'alpha-amylase empêchant les amylases de pathogènes ou d'insectes d'hydrolyser les liaisons α-(1,4)-D-Glu des polysaccharides comme l'amidon (Svensson *et al.* 2004). Des protéines sont aussi dirigées vers certaines enzymes de dégradation des HG, telles que les inhibiteurs de polygalacturonases (PGIP) et de pectine lyases (PNLIP) de pathogènes (Juge 2006).

Les inhibiteurs de polygalacturonases ou PGIP (*PolyGalacturonase-Inhibiting Proteins*) sont des protéines de la famille des LRR (*Leucine Rich Repeat*), capables d'inhiber des PG fongiques (Albersheim & Anderson 1971), bactériennes (Schacht *et al.* 2011) et entomologiques (de punaises, D'Ovidio *et al.* 2004) mais ils n'interagissent pas avec les PG végétales (Federici *et al.* 2001). Leur activité a été détectée chez de nombreuses monocotylédones et dicotylédones (De Lorenzo *et al.* 2001). Toutes ont en commun un domaine contenant 10 LRR en tandem (Maulik *et al.* 2012), formant des feuillets β (Di Matteo *et al.* 2006). Les deux PGIP découverts chez *A. thaliana* (AtPGIP1 et AtPGIP2) réduisent significativement l'activité des PG de *Botrytis cinerea* (Ferrari *et al.* 2006), tout comme le VvPGIP de la vigne (*Vitis vinifera*, Alexandersson *et al.* 2011) et PvPGIP2 (*Phaseolus vulgaris*, Sicilia *et al.* 2005). Un seul PGIP est capable d'inhiber différentes PG fongiques, par exemple PvPGIP2 agit sur les PG de *Fusarium monoliforme*, d'*Aspergillus niger* et de *B. cinerea* (Federici *et al.* 2001 ; King *et al.* 2002 ; Sicilia *et al.* 2005). Les PvPGIP3 et PvPGIP4 inhibent les PG de deux insectes phloémophages (les punaises *Lygus rugulipennis* et *Adelphocoris lineolatus*). De plus, l'expression des PGIP peut être induite en réponse à une alimentation par des insectes (des altises, Li *et al.* 2003) et par des éliciteurs endogènes issus de la dégradation des HG, les OG (Denoux *et al.* 2008).
Une protéine inhibitrice de pectine lyases (PNLIP), purifiée à partir des parois de racines de betterave (*Beta vulgaris* L.), peut interférer avec les pectine lyases de trois espèces de champignons : *Rhizoctonia solani*, *Phoma betae* et *A. japonicus* (Bugbee 1993). La concentration en PNLIP est corrélée à la résistance à la pourriture des racines de betterave causée par *R. solani*. Cependant, aucune autre étude n'a été réalisée concernant cet inhibiteur. Sa structure, sa régulation ou la présence de PNLIP chez d'autres espèces de plantes ne sont pas connues (Lagaert *et al.* 2009). Des lyases synthétisés par des pathogènes peuvent être inhibées par des composés non-protéiques telle que l'épicatéchine, un flavonoïde présent dans les avocats non mûrs inhibant l'activité des lyases de bactéries (*Erwinia chrysanthemi*) et de champignons (*Colletotrichum gloeosporioides*, Wattad *et al.* 1994 ; Yakoby *et al.* 2001).

Les PMEI ne sont dirigés que contre les PME végétales et sont inefficaces contre des PME bactériennes ou fongiques (D'Avino *et al.* 2003 ; Giovane *et al.* 2004). Cependant, parmi les cinq PMEI actuellement caractérisés au niveau fonctionnel chez *A. thaliana*, leur rôle dans la réponse aux pathogènes a déjà été démontré, en plus de leurs rôles dans la croissance et le développement (**Tableau 5**).

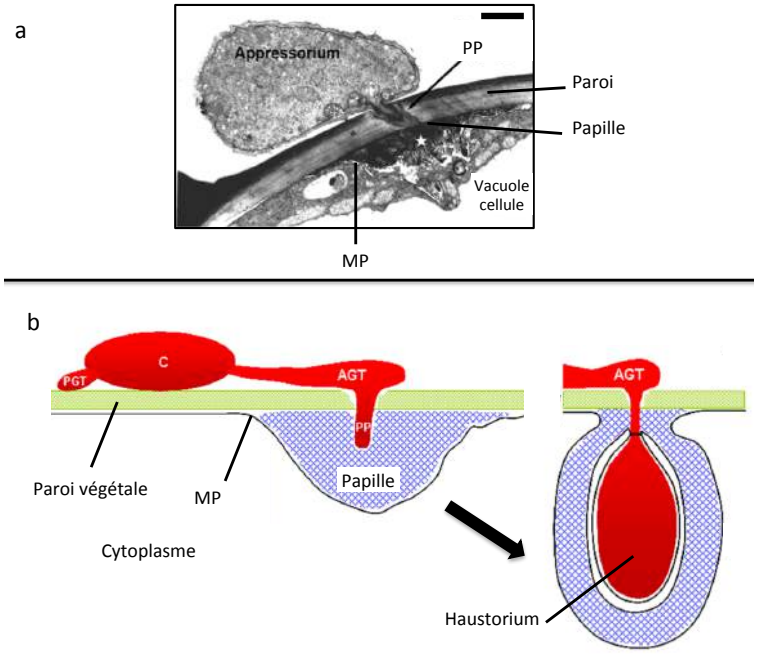


Figure 19 Interaction de la paroi végétale de cellules épidermiques d'une feuille d'orge avec le champignon biotrophe *Blumeria graminis*, l'oïdium des céréales

(a) Micrographie électronique d'un appressorium de *B. graminis* pénétrant dans la paroi d'une cellule de feuille d'orge (*Hordeum vulgare*). On remarque la dégradation de la paroi au niveau de l'hyphe de pénétration et une réponse de la plante impliquant un dépôt (zone dense aux électrons) sous le site de pénétration. Barre = 1 µm. **(b)** Représentation schématique d'un hyphe de pénétration de *B. graminis* dont la croissance est réduite par une apposition de paroi (papille). PGT, tube germinatif primaire ; C, conidiospore ; AGT, tube germinatif appressorial ; PP, hyphe de pénétration ; MP, membrane plasmique. D'après Hématy *et al.* (2009) et Underwood (2012).

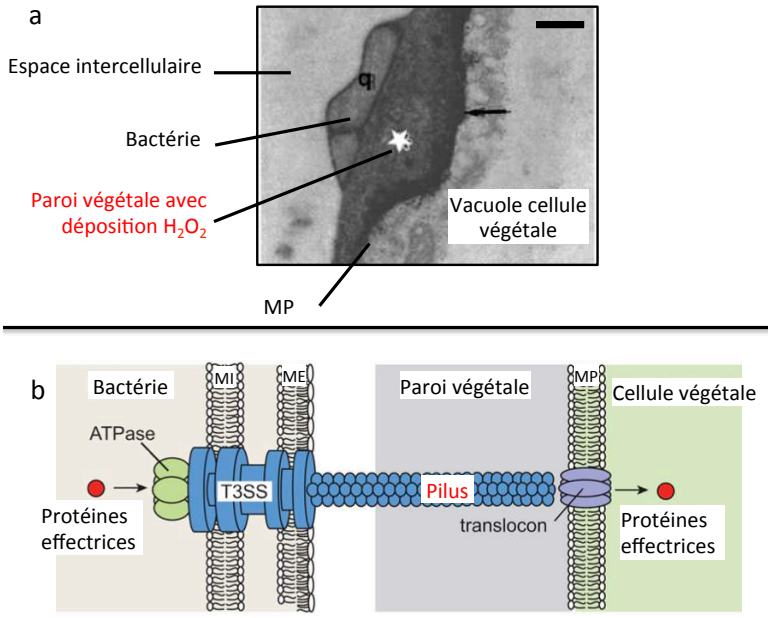


Figure 20 Interaction de la paroi végétale de cellules d'une feuille de laitue avec la bactérie biotrophe *Pseudomonas syringae*

(a) Micrographie électronique de la bactérie *P. syringae* infectant l'espace intercellulaire de cellules de feuille de laitue (*Lactuca sativa*). La flèche montre un dépôt révélant une production d'H_2O_2 dans la papille formée (zone dense aux électrons) sous le site de pénétration du pilus bactérien. Barre = 0,5 µm. **(b)** Représentation schématique d'un système de sécrétion de type III (T3SS) développé par *P. syringae* et connecté par un pilus qui traverse la paroi végétale afin de permettre la translocation de protéines effectrices dans le cytoplasme de la cellule végétale. MI, membrane interne; ME, membrane externe ; MP, membrane plasmique. D'après Hématy *et al.* (2009) et Büttner *et al.* (2009).

Si l'on considère le rôle des PME dans la propagation de virus transmis par les pucerons, les PMEI pourraient aussi avoir un rôle dans la propagation virale par la formation des complexes PME-PMEI au sein de la plante (Jolie *et al.* 2010). Les différentes enzymes produites par les bioagresseurs et par la plante vont particulièrement interagir au niveau de l'interface bioagresseur/paroi.

2.1.1.3. Principaux éléments intrusifs des bioagresseurs au niveau de la paroi

2.1.1.3.1. Hyphes fongiques

Les champignons et les oomycètes, responsables de maladies foliaires, initient les interactions avec leur plante-hôte par l'adhérence d'une spore à la surface de la feuille qui forme ensuite un tube germinatif primaire (**Figure 19**). La germination de la spore conduit à l'émission d'un tube germinatif appressorial qui va se diriger bien souvent vers les ouvertures naturelles (stomates, hydatodes) ou des blessures pour pénétrer au sein des tissus sous-jacents à l'épiderme. Certains champignons comme les rouilles percent directement la cuticule. L'hyphe traverse la paroi à l'aide en particulier d'une pression de turgescence et des CWDE sécrétées. Ceci permet ensuite la croissance d'un haustorium entre la paroi et la membrane plasmique où des éléments nutritifs sont absorbés (Lepoivre 2003). La paroi et la membrane plasmique participent à la détection des motifs particuliers présents à la surface de l'hyphe appelés MAMP (*Microbe-Associated Molecular Pattern*), comme la chitine, reconnue par le riz (*O. sativa*) *via* le récepteur PRR (*Pattern Recognition Receptor*) transmembranaire CEBiP (*Chitin Elicitor-Binding Protein*). Cette reconnaissance enclenche des réactions de défense et la formation d'une papille constituée de composés de défenses (**Figure 19b**). Cette papille va isoler complètement l'haustorium (Underwood 2012).

2.1.1.3.2. Pilus bactérien

Toujours *via* les stomates ou blessures de feuilles, de nombreuses bactéries phytopathogènes initient les interactions avec leur plante-hôte par le développement d'un pilus à partir d'un système de sécrétion de type III (T3SS, **Figure 20b**). Pour que ce long filament (jusqu'à 5 µm) soit capable de pénétrer la paroi végétale, elles sécrètent des CWDEs (Grant & Mansfield 1999). Ces CWDEs dégradent notamment la matrice pectique, ce qui permet au pilus de passer facilement entre les fibrilles de cellulose, la taille des pores étant ainsi adaptée au diamètre du pilus (Baron-Epel *et al.* 1988). Des protéines effectrices sont libérées au niveau du pilus et vont modifier les défenses de la plante. Parallèlement, des protéines telle que la flagelline (une protéine du filament flagellaire) de *P. syringae* peuvent être reconnues au niveau de la paroi par le récepteur PRR FLS2 et peuvent induire des défenses de la plante telle qu'une production de peroxyde d'hydrogène dans la paroi (**Figure 20a**, Gómez-Gómez & Boller 2000).

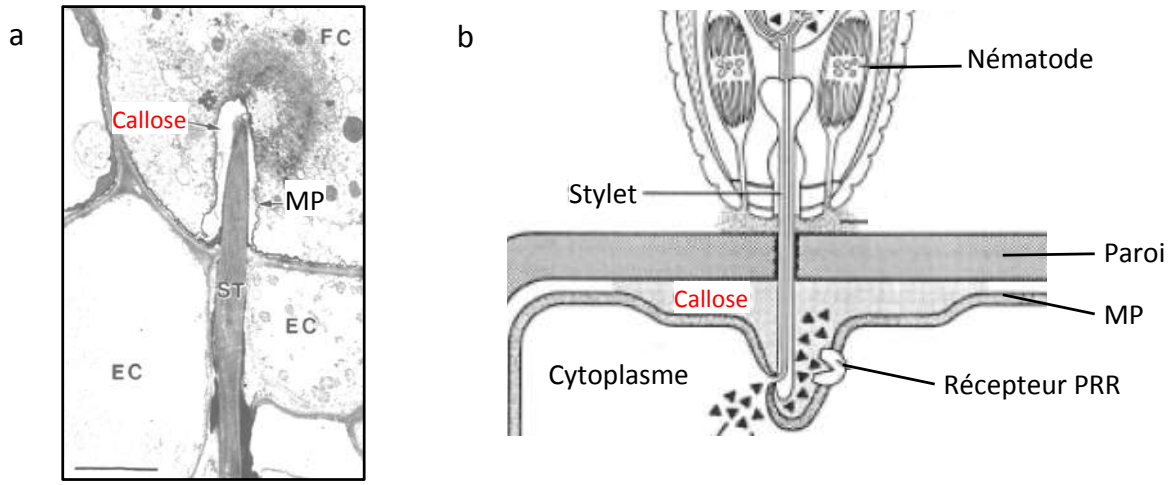


Figure 21 Interaction de la paroi végétale de cellules de racine de tomate avec le stylet d'un nématode
(a) Micrographie électronique d'une section longitudinale du stylet (ST) du nématode *Criconemella xenoplax* inséré entre deux cellules épidermiques (EC) d'une racine de tomate (*Solanum esculentum*). L'extrémité du stylet est dans la cellule nourricière (FC) sans avoir percé la MP, entouré d'un dépôt de callose dans la paroi. Barre = 3 µm. D'après Hussey *et al.* (1992). **(b)** Représentation schématique d'un nématode ayant inséré son stylet au travers de la paroi sans percer la membrane plasmique (MP) qui est invaginée autour de l'extrémité du stylet, mais ayant provoqué une accumulation de callose suite à la reconnaissance d'éliciteur par un récepteur PRR. D'après Willamson et Hussey (1996).

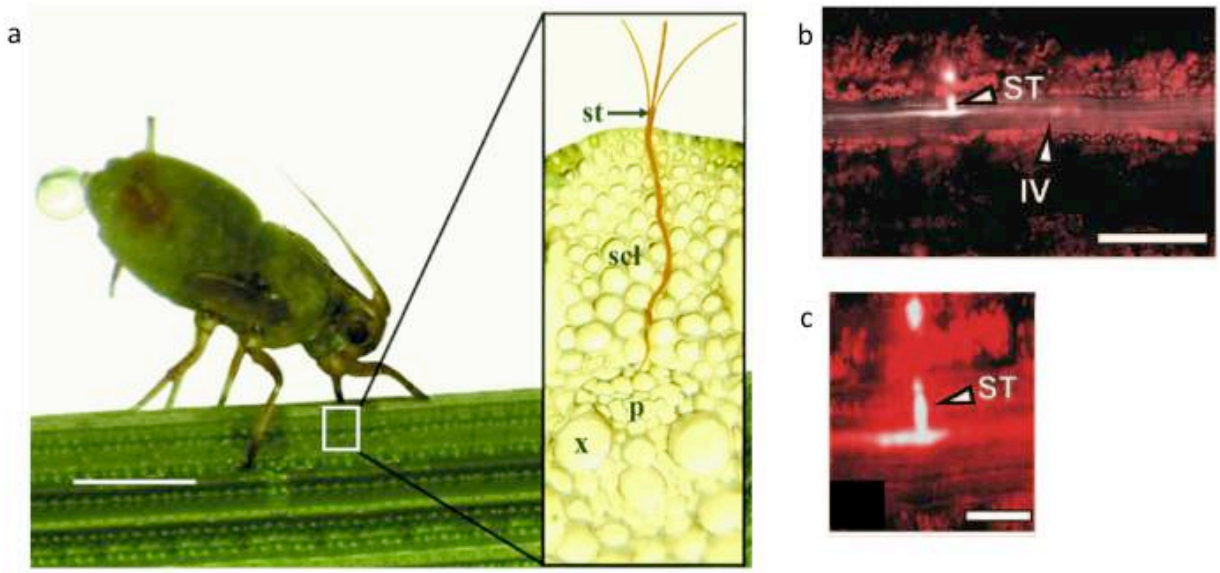


Figure 22 Interaction de la paroi végétale avec les stylets d'un puceron
(a) Micrographie photonique d'un puceron se nourrissant *via* ses stylets (st) insérés dans les parois jusqu'aux tubes criblés du phloème (p); scl, sclérenchyme ; x, xylème. Barre = 1 mm. Source : http://plantsinaction.science.uq.edu.au ; **(b)** et **(c)** Section longitudinale d'une feuille d'orge (*Hordeum vulgare*) montrant un important dépôt de callose (coloration rouge) le long d'un faisceau conducteur de taille intermédiaire (IV), induit après 72 h d'infestation par le puceron russe du blé (*Diuraphis noxia*). Photographies prises avec un microscope à fluorescence à large champ. ST, stylet. Barre : b = 100 µm ; c = 50 µm. D'après Saheed *et al.* (2009).

2.1.1.3.3. Stylet de nématode

Les nématodes pénètrent au niveau des tissus racinaires à l'aide de leur pièce buccale (stylet) qui sécrète une salive afin d'établir un site d'alimentation. Cette salive contient des CWDE telles que des PL (Popeijus *et al.* 2000) ou des exo-PG (Jaubert *et al.* 2002) permettant la migration du nématode dans l'apoplasme. Leur accès est facilité par l'action d'expansines, détectées aussi dans leur salive, en relâchant les liaisons non covalentes entre les fibrilles de cellulose (Qin *et al.* 2004). Au fur et à mesure de la pénétration du stylet dans les tissus, des MAMP comme des oligosaccharides présents à la surface du stylet des nématodes (De Veer *et al.* 2007) sont reconnus par la plante et un dépôt de callose apparaît dans la paroi au niveau du point d'insertion du stylet (**Figure 21**, Hussey *et al.* 1992).

2.1.1.3.4. Stylets de puceron

Les pucerons infestent les parties aériennes de plantes pour s'alimenter. A l'aide de stylets qui progressent au sein de la paroi jusqu'à atteindre les tubes criblés du phloème ils aspirent la sève élaborée (**Figure 22a**). La progression de ceux-ci dans les tissus végétaux implique la sécrétion par le puceron de deux types de salive : une salive solide gélifiante et une salive liquide dite soluble (Miles 1999). La salive liquide, mieux caractérisée, est composée de nombreuses CWDEs telles que des PME, PG, amylases, cellulases, protéases, peroxydases ou glucose oxydases (Miles 1999 ; Cherqui & Tjallingii 2000 ; Will *et al.* 2007). Sa composition varie en fonction de l'espèce d'insecte et de la plante-hôte (Miles 1999 ; Habibi *et al.* 2001). La salive solide forme une gaine protectrice autour des stylets flexibles, limitant donc le contact direct des stylets avec l'apoplasme et la paroi. Elle est principalement composée de protéines, de phospholipides et de glucides conjugués. Les pectinases participeraient à la facilitation de la dégradation de la paroi et la progression des stylets mais en contre partie libèrent des oligosaccharides constituant des éliciteurs de défense de la plante. De la même façon, les protéases sécrétées peuvent favoriser la dégradation de protéines par le puceron mais elles peuvent aussi produire des peptides qui élicitent les défenses de la plante (Walling 2009). Parmi les défenses induites par la paroi suite à l'infestation aphidienne, on peut noter par exemple le dépôt de callose au niveau des plaques criblées séparant deux éléments de tube criblé constituant le phloème (**Figure 22b et c**). Cette réponse est très rapide, intervenant quelques secondes voire quelques minutes après la détection de la blessure par la plante (Will & van Bel 2006).

Quelque soit le bioagresseur, la plante met donc en place des mécanismes de défense dans le cadre d'une résistance dite basale où la paroi joue un rôle important.

2.1.2. Induction d'une résistance basale chez la plante via la paroi

Pour une protection efficace contre un bioagresseur, le système immunitaire de la plante doit permettre d'activer rapidement les mécanismes de défense suite à la signalisation induite par la reconnaissance de molécules du non-soi, des composés nommés MAMP, qui incluent les PAMP, définis plus tôt (*Microbe-* ou *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Zipfel & Felix 2005).

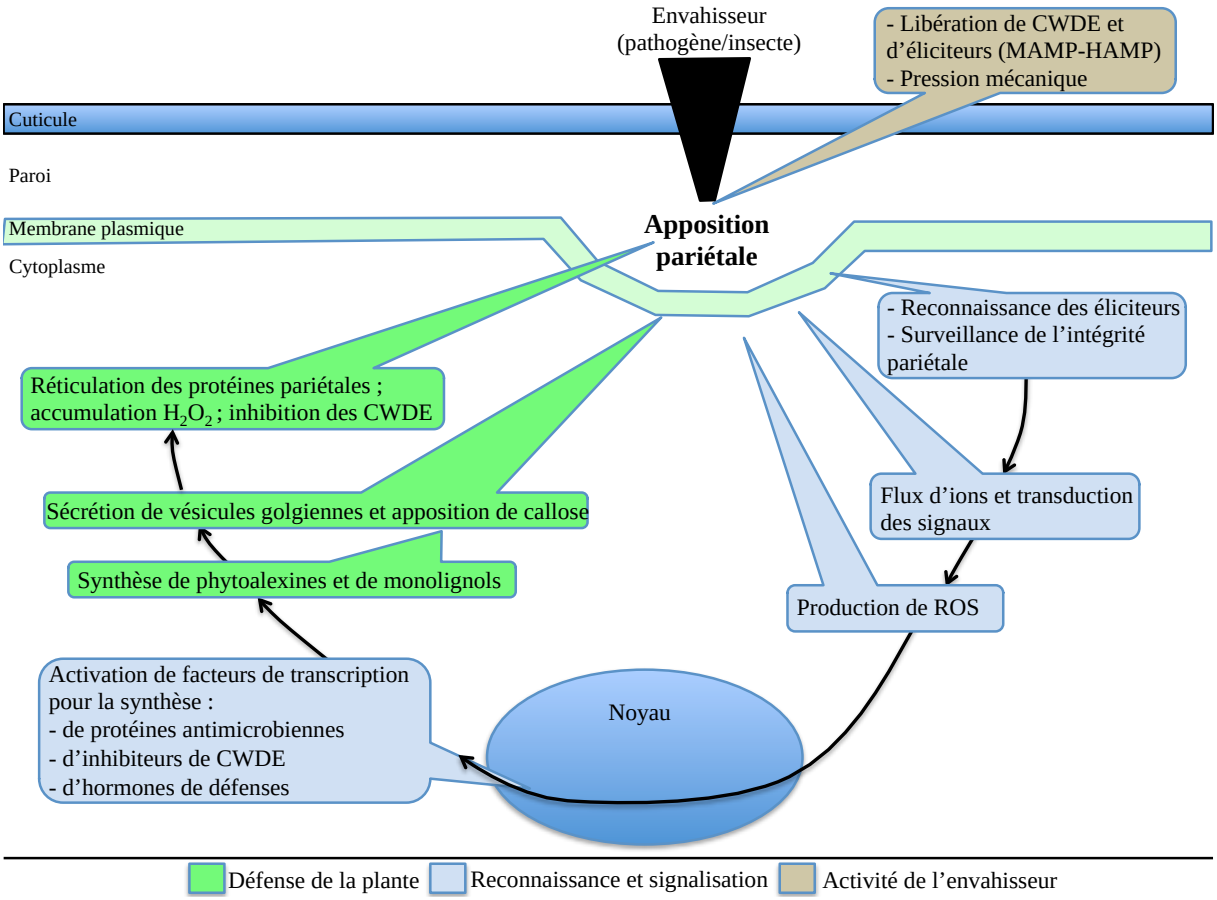


Figure 23 Modèle non exhaustif illustrant les mécanismes moléculaires et biochimiques de défense initiés au niveau de la paroi végétale

CWDE, enzymes dégradant la paroi végétale, MAMP-HAMP, *Microbe-Herbivore Associated Molecular Pattern*, ROS, espèce réactive de l'oxygène. D'après Hückelhoven (2007).

Suite à ce premier niveau de reconnaissance, l'immunité innée ou PTI *(PAMP-Triggered Immunity*), appelée résistance basale ou horizontale, se met en place (Jones & Dangl 2006). De nombreux MAMP ont été isolés à partir de bactéries, champignons ou oomycètes, comme la flagelline (Boller & Felix 2009). La perception de ces MAMP par la plante se fait *via* des récepteurs transmembranaires appelés PRR (*Pattern Recognition Receptors*), membres de la famille NBS-LRR (*Nucleotide Binding Site - Leucine Rich Repeat*) comportant, comme son nom l'indique, des des domaines de fixation de nucléotides (NBS) et des motifs à répétitions riches en leucine (LRR, Altenbach & Robatzek 2007). Ces PRR transmembranaires reconnaissent l'éliciteur de type MAMP dans l'apoplasme grâce à leur domaine extracellulaire (Jones & Dangl 2006 ; Zipfel 2009). Ils reconnaissent aussi probablement d'autres éliciteurs, spécifiquement produits par les insectes herbivores, nommés HAMP (*Herbivore-Associated Molecular Patterns*, Mithofer & Boland 2008 ; Felton & Tumlinson 2008). Les HAMP participent à la mise en place de l'immunité de type HTI (*HAMP-Triggered Immunity*, Hogenhout & Bos 2011 ; Erb *et al.* 2012). Plusieurs HAMP issus des salives ou régurgitations de chenilles ont été identifiés, comme la voliticine ou la β-glucosidase (Felton & Tumlinson 2008). Récemment, l'acide trans-methyl-12-oxophytodienoique (trans-Me-OPDA), précurseur d'un acide gras à 16 atomes de carbone, a été identifié en tant que HAMP dans la salive du puceron russe du blé *Diuraphis noxia* (Smith *et al.* 2010). Les éliciteurs exogènes identifiés jusqu'à présent montrent de grandes similarités avec les défenses précoces mises en place durant la PTI (Mithofer & Boland 2008 ; Walling 2009).

Des signaux d'origine végétale, similaires aux MAMP et HAMP, peuvent résulter de l'interaction plante-agresseur, suite à une infection ou suite à une blessure, ils sont appelés éliciteurs endogènes ou DAMP (*Damage-Associated Molecular Patterns*, Lotze *et al.* 2007). La paroi végétale joue un rôle important dans la défense de la plante en tant que source de DAMP (De Lorenzo *et al.* 2011), comme les précurseurs des systémines riches en hydroxyproline (HypSys) synthétisés dans la paroi des cellules parenchymateuses du phloème intervenant dans la signalisation systémique d'une blessure sur les feuilles de tomate (Narváez-Vásquez *et al.* 2005), ou les OG générés par les dépolymérases dégradant les HG et capables d'éliciter des défenses de la plante (Hahn *et al.* 1981 ; Darvill & Albersheim 1984 ; Ryan 1987). Les OG sont aussi reconnus par des PRR, particulièrement par le récepteur WAK1 (*Wall-Associated Kinase 1*, Wolf & Greiner 2012). Tout comme les MAMP et les HAMP, les DAMP vont conduire à la mise en place des réactions de défense par la plante.

La reconnaissance de ces différents éliciteurs exogènes et endogènes peut entraîner l'induction d'une batterie de défenses permettant au moins une résistance non spécifique au point de pénétration du bioagresseur, comme la formation d'une papille (production d'H_2O_2, dépôt de callose…). Les réponses induites varient légèrement en fonction des bioagresseurs. Dans le cas des interactions plante-puceron, des réponses des plantes ont été caractérisées en utilisant différents couples plante-puceron. La paroi végétale joue plusieurs rôles dans l'établissement de celles-ci (**Figure 23**). Après la reconnaissance des HAMP au niveau du milieu extracellulaire, un signal est généralement transmis par un complexe de signalisation dans des endosomes, par endocytose de récepteurs dans le cytoplasme (Altenbach & Robatzek 2007). Une série de changements chimiques et structuraux vont alors avoir lieu, comme des flux d'ions, la production de composés toxiques, l'activation de protéines kinases ou de facteurs de

transcription présents dans le noyau. De plus, les voies hormonales vont pouvoir moduler l'expression de certains gènes de défense et former les papilles observées précédemment.

2.2. Les réponses de défense dans l'interaction plante-puceron

2.2.1. Flux d'ions

Les flux d'ions constituent une des réponses physiologiques les plus rapides mise en place après la reconnaissance d'éliciteur. Des influx d'ions H^+ et Ca^{2+}, ainsi que des efflux d'ions K^+ et Cl^- sont souvent observés (White & Broadley 2003). Ces flux entraînent une acidification du cytoplasme et une alcalinisation de l'apoplasme. L'acidification cytoplasmique est essentielle pour la transduction du signal, la mise en place du pic oxydatif et la synthèse de métabolites secondaires (Sakano 2001). L'alcalinisation de l'apoplasme est importante pour la production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (*Reactive Oxygen Species*) par les peroxydases associées à la paroi (Bolwell *et al.* 2002). Ces flux d'ions de part et d'autre de la membrane plasmique affectent à la fois le cytoplasme et la paroi. L'influx dans le cytoplasme de Ca^{2+} engendre une baisse de sa concentration dans l'apoplasme qui peut diminuer la rigidité de la paroi et l'activité d'enzymes pariétales (Felle *et al.* 2004). Les pucerons et aleurodes induisent de nombreuses réponses de la plante similaires à celles induites par une attaque par un pathogène (Walling 2000 ; Smith & Boyko 2007). Bien qu'un influx calcique ne semble décrit que lors d'une infestation par des insectes non-phloémophages (chenilles, Maffei *et al.* 2004), l'infestation des plants de blé par des pucerons *Diuraphis noxia* et des plants d'*A. thaliana* par les pucerons *M. persicae* induisent une augmentation de l'expression de calmodulines, protéines Ca^{2+}-dépendantes impliquées dans la signalisation (Smith & Boyko 2007).

2.2.2. Pic oxydatif

Dans les quelques minutes suivant l'élicitation, un pic oxydatif avec une production rapide et transitoire de ROS a lieu, principalement sous forme d'anion superoxyde (O_2^-), dismuté par la superoxyde dismutase pour former du peroxyde d'hydrogène H_2O_2, les deux permettant également la production de radicaux hydroxyles (OH•). Ces ROS sont produits par les peroxydases apoplastiques mais aussi par différentes NADPH oxydases membranaires et autres oxydases apoplastiques ou présentes dans les mitochondries, chloroplastes et peroxysomes (Bolwell & Wojtaszek 1997). La production de ROS est dépendante notamment de l'influx calcique, du pH du milieu et de protéines kinases (White & Broadley 2003). L'accumulation de H_2O_2 constitue un composé toxique contre le pathogène et participe à la rigidification de la paroi en associant les composants pariétaux (Hardham *et al.* 2007). Cependant, il a aussi été montré que le H_2O_2 est capable de dégrader de façon non enzymatique certains polysaccharides pariétaux comme les arabinanes, les arabinogalactanes, les xylanes et la cellulose (Miller 1986). De même, le OH• peut dégrader des xyloglucanes (Fry 1998). Un dépôt important de H_2O_2 est souvent observé dans la paroi suite à une infection bactérienne par exemple (**Figure 20a**) et peut aboutir à la formation d'une réaction hypersensible (HR, Wojtaszek 1997). Suite à 3h d'infestation par le puceron russe du blé, une accumulation de H_2O_2 a été observée dans les

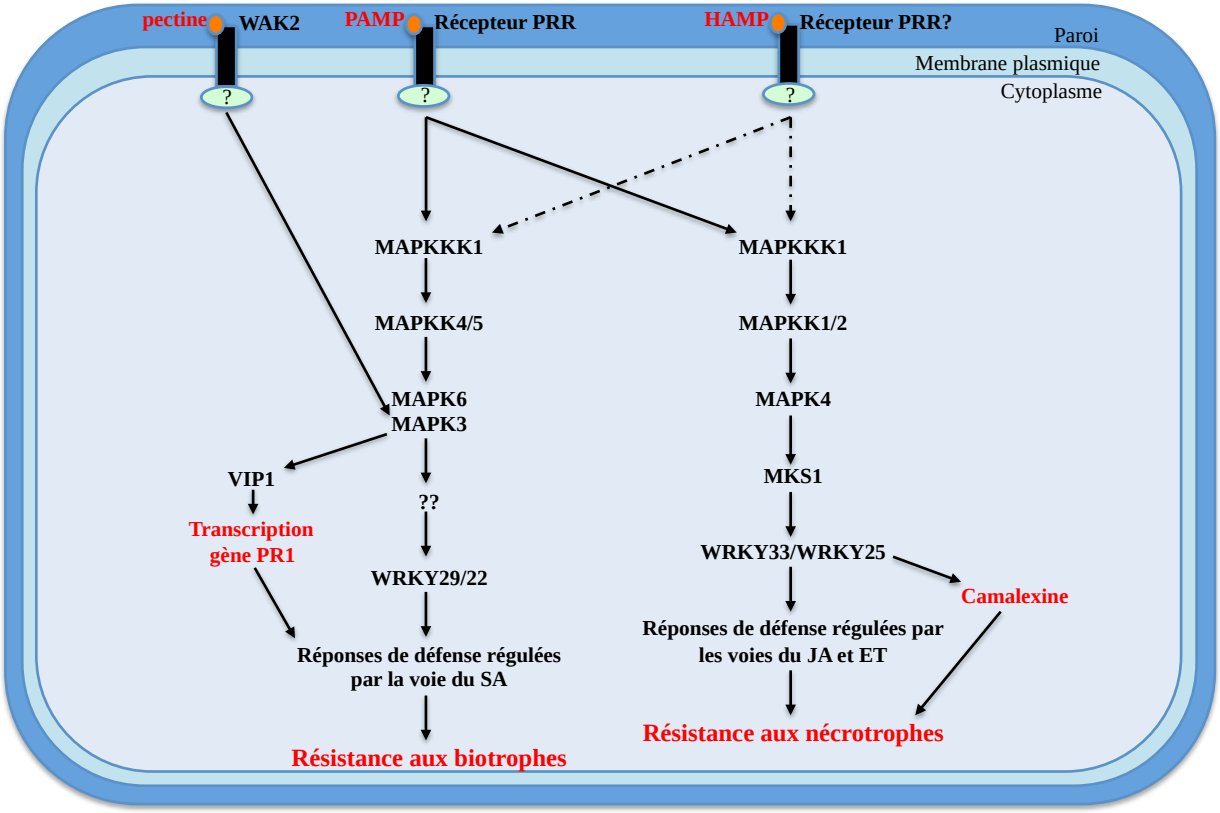


Figure 24 Exemples de cascades MAP-kinases impliquées dans la résistance aux bioagresseurs nécrotrophes ou biotrophes chez *A. thaliana*

Après reconnaissance d'un éliciteur (PAMP ou HAMP) probablement par un récepteur PRR, deux cascades sont possibles. Après reconnaissance d'un HAMP, une seule ou les deux cascades de réponses seraient activées (flèches en pointillés). Suite à la perception, la phosphorylation de MAPKKK1 active les cascades MAPKK4/5 et MAPKK1/2, qui phosphorylent à leur tour MAPK3 et/ou MAPK6. En phosphorylant VIP1, MAPK3 active la transcription du gène de défense PR1 relié à la voie de l'acide salicylique (SA), la voie conférant une résistance aux biotrophes. MAPK4 de son côté phosphoryle ensuite MKS1 (*MAP Kinase Substrate 1*) pour dissocier le complexe MKS1/WRKY33 (non montré) et permettre à WRKY33 d'activer la biosynthèse de camalexine. WRKY25 activerait des défenses reliées aux voies de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET), conférant une résistance aux nécrotrophes. Des fragments pectiques induisent les MAPK3, grâce au récepteur constitué par la protéine kinase WAK2. D'après Walling (2009) et Kohorn *et al*. (2009).

feuilles de blé d'un cultivar résistant mais pas chez le sensible (Moloi & van der Westhuizen 2006). Cependant, aucune accumulation de H_2O_2 n'a été observé sur des feuilles infestées 6, 12, 24 ou 48 h par le puceron du chou *B. brassicae* mais de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse de H_2O_2 sont surexprimés après 24 h et 48 h d'infestation, suggérant une brève accumulation transitoire qui serait capable ensuite d'induire des défenses (Kuśnierczyk *et al.* 2008). Plusieurs cas de réactions hypersensibles associées à une résistance contre les pucerons ont été observés, notamment sur orge (*Hordeum vulgare*) infesté un jour avec 200 à 300 pucerons russes du blé (*Diuraphis noxia*), sur melon (*Cucumis melo*) infesté un jour avec 10 pucerons du melon (*Aphis gossypii*) et sur pommier (*Malus* spp.) infesté par le puceron cendré du pommier (*Dysaphis plantaginea*, Lyth 1985 ; Belefant-Miller *et al.* 1994 ; Villada *et al.* 2009). Cette HR n'est pas forcément requise pour la résistance contre les pucerons (Stewart *et al.* 2009).

En même temps que le pic oxydatif, une production de monoxyde d'azote (NO) peut aussi être observée. Le NO est un gaz simple hautement réactif mais potentiellement toxique pouvant servir de signal pour initier des réponses physiologiques comme la fermeture des stomates et la sénescence, ou la réponse à des agents pathogènes (del Río *et al.* 2004). Ce gaz peut être produit par la réduction des nitrites *via* la nitrate réductase (NR) ou à partir de L-arginine par l'action d'enzymes à activité NOS (*Nitric Oxide Synthase*, Yamasaki & Sakihama 2000 ; Guo *et al.* 2003). L'implication du NO dans la défense de la plante contre les pucerons est mise en évidence notamment par la surexpression de gène codant une NR chez le sorgho (*Sorghum bicolor*) suite à 48 h d'infestation par *Schizaphis graminum* (Zhu-Salzman 2004). Le NO peut agir en synergie avec les ROS pour induire la mort cellulaire et l'expression de protéines de défense lors de la réaction hypersensible associée à une résistance à *B. cinerea* chez *Nicotiana benthamiana* (Asai & Yoshioka 2009).

2.2.3. Activation de protéines kinases et phosphorylation de protéines

Suite à la perception de PAMP et de HAMP et parallèlement aux flux d'ions et au pic oxydatif, les MAPK (*Mitogen Associated Protein Kinases*) sont activées en cascade de phosphorylation. Globalement, trois protéines kinases sont impliquées successivement, une MAPK kinase kinase (MAPKKK), qui agit sur une MAPK kinase (MAPKK) et qui agit à son tour sur une MAPK (**Figure 24**, MAPK Group 2002). La dernière kinase activée assume la phosphorylation de protéines cibles spécifiques tels que des facteurs de transcription, conduisant à l'activation de réponses cellulaires. Par exemple, en moins de 5 min, l'action de la cascade MAPKKK1, MAPKK4/5 et MAPK3/6 conduit à une résistance aux organismes biotrophes en activant la voie du salicylate (**Figure 24**, Asai *et al.* 2002 ; Walling 2009). Tandis que la kinase MPK6 régule la synthèse d'éthylène (Joo *et al.* 2008), la MPK3 phosphoryle la protéine VIP1, qui va alors subir une translocation du cytoplasme vers le noyau pour amplifier la transcription du gène codant la protéine PR1 (*Pathogenesis-Related*, Djamei *et al.* 2007). La deuxième cascade MAPKKK1, MAPKK1/2 et MAPK4 est importante dans la résistance basale (**Figure 24**, Gao *et al.* 2008). L'activité MAPK4, localisée dans le noyau, est négativement corrélée aux défenses régulées par la voie du salicylate et favorise les défenses reliées aux voies du jasmonate et de l'éthylène et la

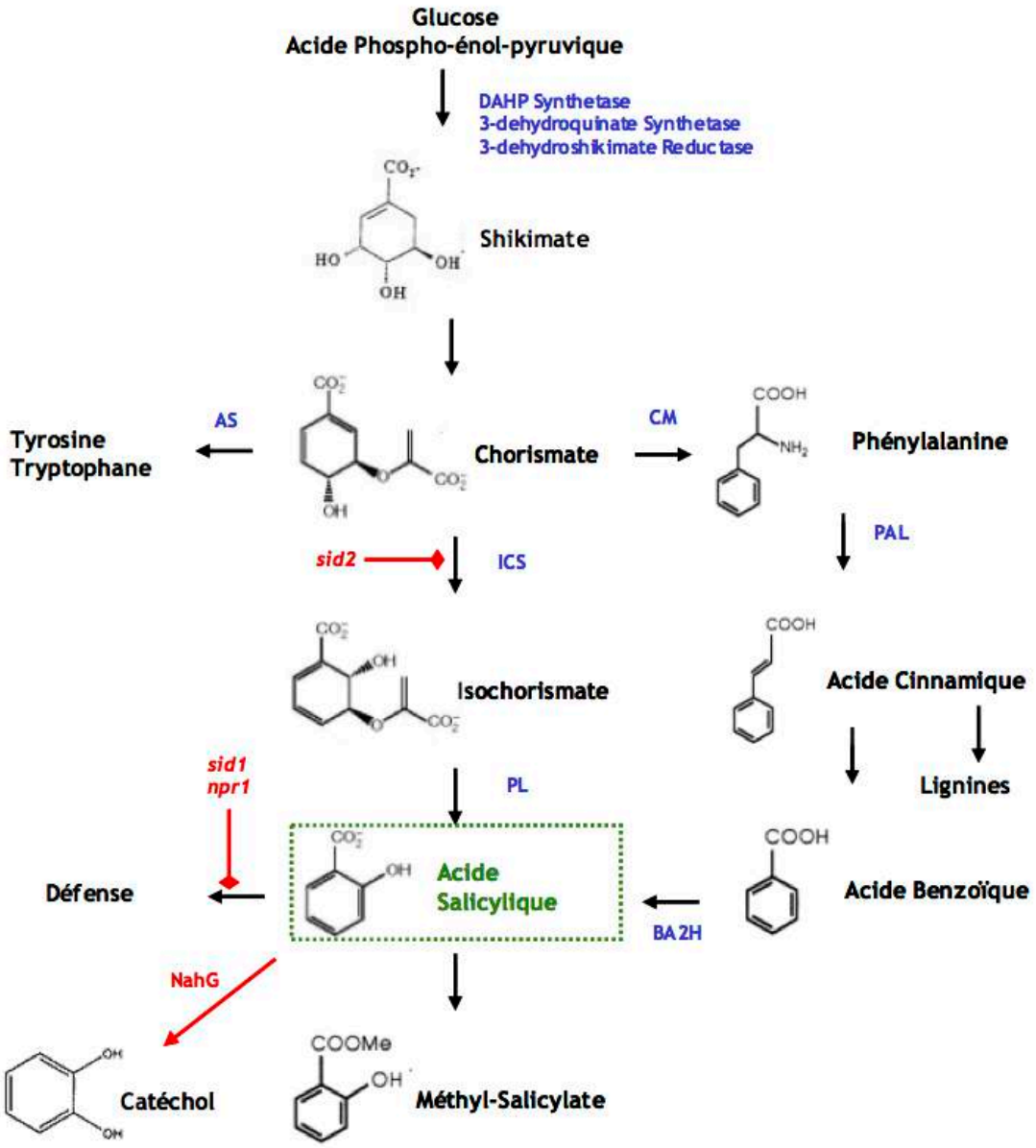


Figure 25 Représentation simplifiée des voies de biosynthèse de l'acide salicylique (SA)

Les enzymes responsables des transformations sont indiquées en bleu ; des mutants d'*A. thaliana* affectés dans la production de SA sont mentionnés en rouge. Les plantes *NahG* (en rouge) expriment la salicylate hydrolase de *Pseudomonas putida* qui dégrade le SA en catéchol. *sid2* est affecté dans le gène codant l'isochorismate synthase (ICS). *sid1* (= ancien nom de *eds5*) est muté dans un transporteur membranaire qui pourrait être impliqué dans le transport de précurseurs de SA. *nrp1* interagit avec des facteurs de transcription et présente une sensibilité accrue à des bactéries comme *P. syringae*. PAL, phénylalanine amonia lyase ; AS, anthranilate synthase ; BA2H, benzoic acid 2-hydrolase ; PL, pyruvate lyase. D'après Wildermuth *et al*. (2001) et Lee *et al*. (1995).

résistance aux nécrotrophes (Brodersen *et al.* 2006). MAPK4 dissocie le complexe MKS1 / WRKY33 et le facteur de transcription WRKY33 peut se lier et activer le promoteur du gène *PAD3*, qui est impliqué dans la synthèse de camalexine, une phytoalexine qui a un effet négatif sur la fécondité du puceron *B. brassicae* mais de façon intéressante pas sur celle de *M. persicae* (Pegadaraju *et al.* 2005 ; Kuśnierczyk *et al.* 2008). Par ailleurs, l'importance des deux cascades MAPKK4/5 et MAPKK1/2 a été montrée dans la défense contre des acariens phloémophages (Schweighofer *et al.* 2007).

Outre ces kinases cytosoliques, il existe chez *A. thaliana* cinq protéines kinases associées à la paroi ou WAK (*Wall-Associated Kinases*). Elles possèdent une région intracellulaire avec un domaine serine/threonine kinase et un domaine transmembranaire avec une région extracellulaire contenant de multiples répétitions du facteur de croissance épidermique EGF (*Epidermal Growth Factor*) pouvant se lier aux pectines (He *et al.* 1999 ; Anderson *et al.* 2001). Il a été montré que le domaine intracellulaire participe à la signalisation. En effet, les pectines induisent avec WAK2, la production de la kinase MAPK3 (Kohorn *et al.* 2009), qui est impliquée dans la réponse aux stress et dans la transcription de la PR1 (Djamei *et al.* 2007).

Ces cascades de transduction du signal permettent donc d'acheminer l'information jusqu'au noyau pour activer des gènes de défense dont ceux impliqués dans différentes voies de signalisation hormonale (Asai *et al.* 2002).

2.2.4. Voies de signalisation hormonales

Les principaux composés agissant comme hormones végétales et qui peuvent également induire des mécanismes de défense sont l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET). Leur activation respective dépend du stress biotique considéré, le SA étant majoritairement impliqué dans la résistance aux pathogènes biotrophes (se développant sur du tissu vivant) et le JA et l'éthylène seraient plutôt impliqués dans la résistance à des herbivores broyeurs et des pathogènes nécrotrophes, se développant sur des tissus morts (Kessler & Baldwin 2002 ; Glazebrook 2005).

Les cascades dépendant du salicylate utilisent le SA et sa forme méthylée (MeSA) pour stimuler l'expression de nombreux gènes de défense dont des gènes codant des protéines PRs ayant une localisation pariétale, telles que la chitinase ou la glucanase (Smith & Boyko 2007) et participant à l'élaboration de la résistance systémique acquise (SAR) et de la HR (Alvarez 2000). Le SA est un dérivé du métabolisme des phénylpropanoïdes, produit à partir de la phénylalanine mais surtout à partir de l'isochorismate (**Figure 25**, Coquoz *et al.* 1998 ; Wildermuth *et al.* 2001). Les gènes *PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 4)*, *EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1)*, *SID2 (SA INDUCTION DEFICIENT 2)* et *EDS5* (anciennement appelé *SID1*) interviennent de façon précoce dans la génération du signal SA. En effet, les mutants *eds1* et *pad4* présentent tous les deux un défaut d'accumulation de SA et d'induction des gènes *PR* (Falk *et al.* 1999). *SID2* code l'isochorismate synthase (**Figure 25**) et la production de SA est fortement diminuée chez le mutant *sid2*, indiquant que la production de SA chez *A. thaliana* est majoritairement effectuée par le chorismate (Wildermuth *et al.* 2001). *EDS5* code un

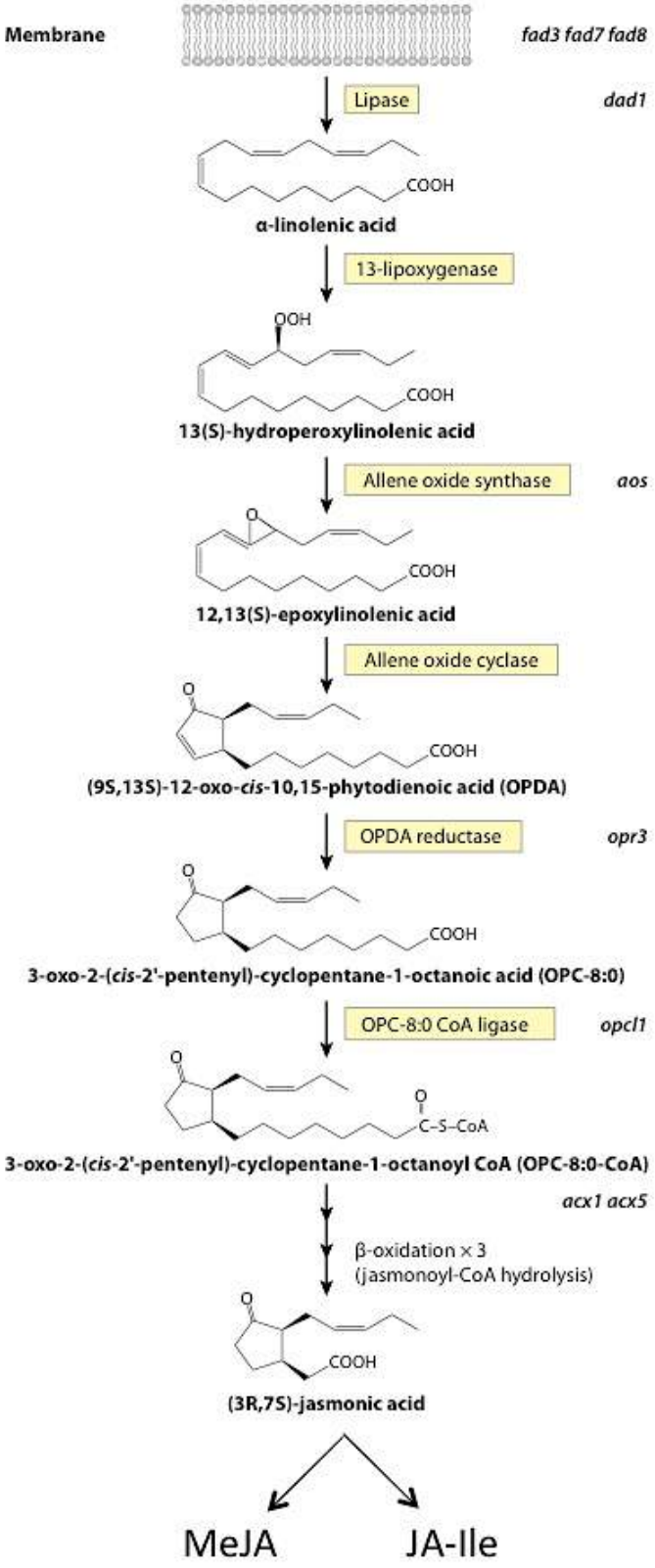


Figure 26 Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique (JA) à partir de l'acide α-linolénique.

Les enzymes principales de cette voie sont dans les encadrés. Les mutants d'*A. thaliana* fréquemment utilisés pour étudier cette voie figurent à droite. MeJA, méthyl jasmonate ; JA-Ile, JA-Isoleucine. D'après Browse (2009).

transporteur membranaire de la famille MATE (*Multidrug And Toxin Extrusion*) qui pourrait être impliqué dans le transport de précurseurs de SA ou de molécules signales (Nawrath *et al.* 2002) et les effets observés sur *eds5* sont très similaires à ceux observés sur *sid2*, confirmant l'idée que *EDS5* est requis pour la synthèse de SA (Glazebrook *et al.* 2003). NPR1 interagit avec des facteurs de transcription pour réguler l'expression de gènes *PR* (Dong 2004).

Les pucerons et aleurodes induisent majoritairement des gènes régulés par la voie du SA (Moran & Thompson 2001 ; Moran *et al.* 2002 ; Zhu-Salzman 2004 ; Pegadaraju *et al.* 2005 ; Zarate *et al.* 2007 ; De Vos *et al.* 2007 ; **Figure 27**). Cependant, le rôle du SA dans la résistance basale induite par les pucerons chez *A. thaliana* reste controversé. En effet, Pegadaruju et son équipe (2005) ont suggéré que le SA n'avait pas un rôle clé dans la défense contre les pucerons en général, les mutations *sid2* et *npr1* (*non-expressor of PR-1*) affectant la fécondité de *M. persicae* alors que Mewis et son équipe (2005) ont montré que la mutation *npr1* n'affecte que faiblement la fécondité de *B. brassicae*.

En réponse à une attaque par un pathogène, un insecte ou à une blessure, une augmentation de la synthèse de JA (**Figure 26**) permet d'augmenter l'accumulation de protéines de défense comme *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN 1.2)*. Les jasmonates sont des oxylipines cycliques dérivées de la voie des octadécanoïdes, acides gras en C18. Ces acides gras sont clivés de la membrane plasmique par des lipases puis hydroperoxydés par des lypoxygénases comme LOX2. Les *Allene Oxyde Synthases* (AOS) et *Cyclases* (AOC) permettent la formation des cyclopenténones (OPDA) dans le chloroplaste (**Figure 26**). Ceux-ci sont exportés vers les peroxysomes où ils sont réduits puis oxydés en JA. Celui-ci peut être exporté vers le cytoplasme, dérivé en méthyl-jasmonate (MeJA) ou s'associer à l'isoleucine (JA-Ile). Le JA-Ile s'accumule notamment suite à un stress (Kramell *et al.* 1995 ; 2000). Le mutant *cev1 (constitutive expression of VSP1)* codant une cellulose synthase montre un haut contenu en JA et en éthylène (Ellis *et al.* 2002b), ce qui suggère que des cellulose synthases, situées à l'interface entre la paroi et la membrane plasmique, semblent impliquées dans la régulation des niveaux de JA. Parmi les gènes intervenant dans la voie du JA, il y a notamment *JAR1*, codant une JA-amino-synthase, enzyme capable de modifier le JA en y ajoutant un acide aminé, l'isoleucine et de le rendre actif (**Figure 26**, Staswick & Tiryaki 2004). Le gène *COI1* est particulièrement essentiel aux activités JA-dépendante. Il code une protéine contenant des domaines LRR et un domaine de type F-Box au niveau N-terminal, (Xie *et al.* 1998). Notons que la MAPK4 est aussi requise pour l'induction des protéines de défense par la voie du JA comme nous l'avons vu précédemment, puisque chez le mutant *mpk4* l'expression des gènes *PDF1.2* et *THI2.1* (*Thionine 2.1*) est inhibée (Petersen *et al.* 2000). Cependant l'expression de *PDF1.2* dépend aussi de la voie de l'éthylène, voie généralement associée à celle du JA pour l'activation de défense des plantes (Penninckx *et al.* 1998). Il a été démontré que les pucerons et les aleurodes induisent transitoirement et faiblement des gènes régulés par les voies du JA/ET (Moran & Thompson 2001 ; De Ilarduya *et al.* 2003 ; Zarate *et al.* 2007 ; **Figure 27**).

L'éthylène (ET) est un composé gazeux, généralement connu pour réguler des processus physiologiques et développementaux multiples comme la sénescence des feuilles ou la maturation des fruits. L'ET est synthétisé à partir de la méthionine, transformée en 1-*AminoCyclopropane-1-Carboxylic-acid* (ACC) par une ACC synthase, puis oxydé pour donner

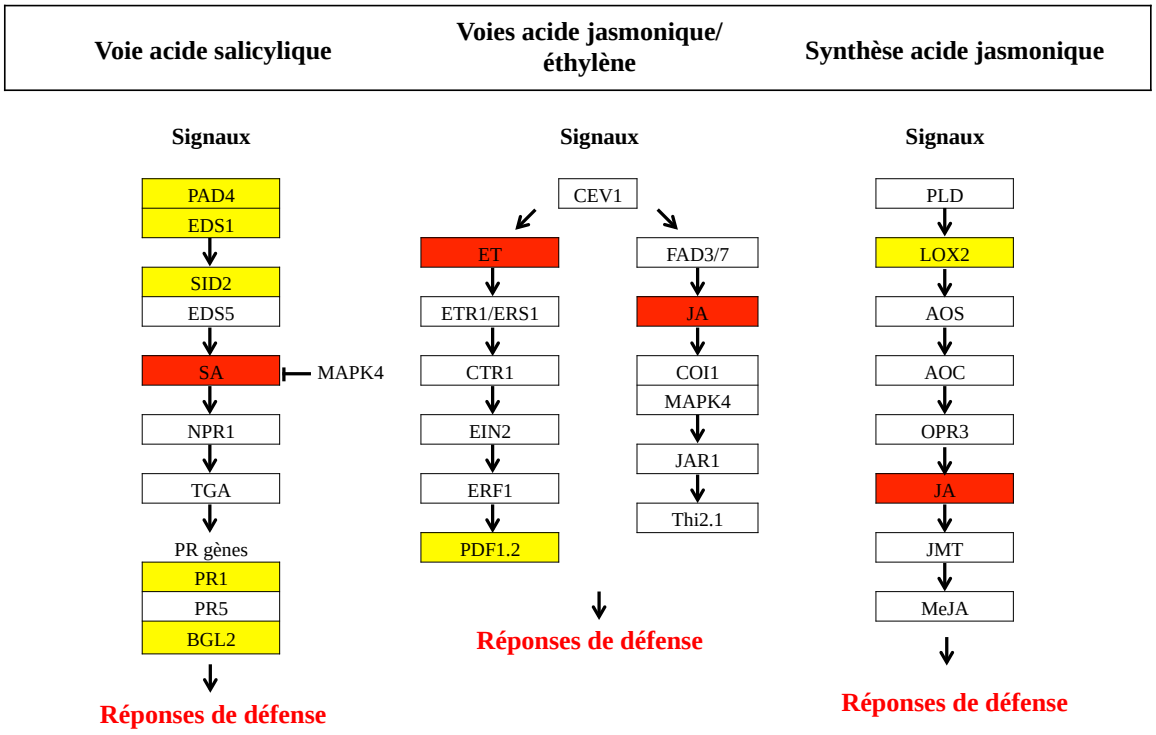


Figure 27 Récapitulatif des gènes impliqués dans le signalement des défenses et la biosynthèse des voies de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène.

Les principaux gènes surexprimés par un stress aphidien sont indiqués en jaune. D'après Zarate *et al*. (2007), Moran *et al.* (2001) et Pegadaruju *et al*. (2005).

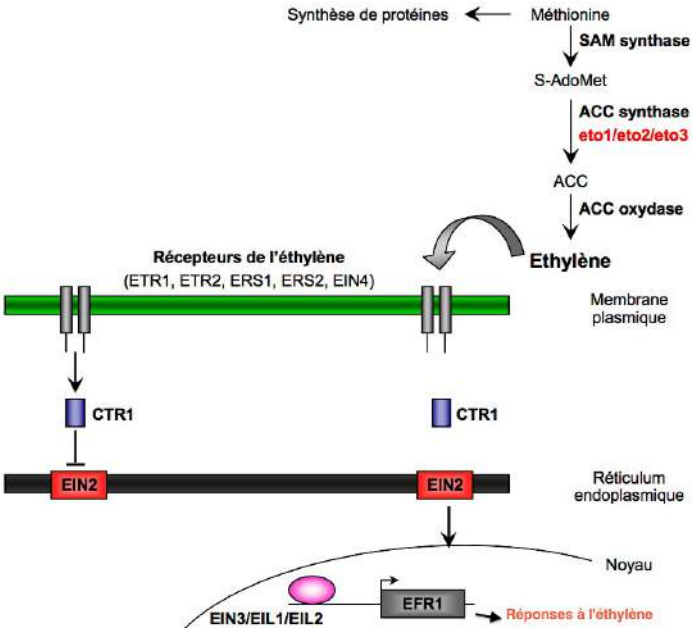


Figure 28 Schéma simplifié des voies de biosynthèse et de signalisation de l'éthylène

En absence d'éthylène (ET), les récepteurs de l'ET activent la composante CTR1. CTR1 est une kinase de type Raf et son activation se traduit par une inhibition de EIN2, une composante centrale de la voie de signalisation en aval. En présence d'ET, les récepteurs n'activent plus CTR1, EIN2 est activée et va pouvoir activer les voies de signalisation permettant l'induction des réponses à l'ET, ceci *via* l'activation entre autres des facteurs EIN3 et ERF1. Les mutations *ethylene overproducer (eto1*, *eto2* et *eto3)* ont pour conséquence la stabilisation des ACC synthases ce qui induit une activation constitutive de la voie de biosynthèse de l'ET. ACC, 1-amino cyclopropane 1-carboxylic-acid ; SAM, S-adénosyl méthionine.

l'ET *via* l'action d'une ACC oxydase (ACO, Adie *et al.* 2007). Chez *A. thaliana*, cinq récepteurs membranaires à l'ET sont connus : ETR1 (*Ethylene Receptor 1*), ETR2, EIN4 (*Ethylene Insensitive 4*), ERS1 (*Ethylene Response Sensor 1*) et ERS2. En absence de signal, ces récepteurs activent une Raf-like kinase, CTR1 (*Constitutive Triple Response 1*), qui à son tour régule négativement les voies de réponse à l'ET situées en aval, peut-être par des cascades de MAPK (**Figure 28**). A l'inverse, le facteur de transcription ERF1 (*Ethylene Response Factor 1*) agit comme régulateur positif de la signalisation ET mais aussi JA (Lorenzo *et al.* 2003), puisque la surexpression du gène *ERF1* active de nombreux gènes de défense, ce qui augmente la résistance à *B. cinerea* (Berrocal-Lobo *et al.* 2002).

D'autres hormones liées au développement végétal jouent aussi un rôle dans l'induction des défenses : l'acide abscissique (ABA), l'auxine (AUX), les brassinostéroïdes (BR), les cytokinines (CK) et l'acide gibbérellique (GA, Robert-Seilaniantz *et al.* 2011) mais les données sont partielles (quelques modèles biologiques uniquement). Après 10 jours d'infestation par *M. persicae*, il y a une diminution du contenu en CK, GA et AUX dans des plantules du radis infestées par rapport à des plantules non infestées (Hussain *et al.* 1973). L'expression du gène *SLW1* (*SILVERLEAF WHITEFLY 1*) chez la courge (*Cucurbita pepo*), induit lors d'une infestation par l'aleurode *Bemisia tabaci*, dépend de la voie de l'ABA (van de Ven *et al.* 2000). Les CKs participent à la résistance contre des biotrophes (*P. syringae*) en amplifiant la réponse dépendante du SA par l'activation du gène NPR1 (Choi *et al.* 2010). De même, le gènes codant une GIP (*GA-Induced Protein*) chez le sorgho (*Sorghum bicolor*), intervenant dans le développement de la plante, est induit après une infestation par le puceron *Schizaphis graminum* (Park *et al.* 2006). L'activation des différentes voies hormonales va permettre la production d'un large éventail de protéines impliquées dans la voie de biosynthèse de composés de défense plus ou moins ciblé en fonction du bio-agresseur.

2.2.5. Accumulation de composés de défense

L'ensemble des signaux précoces (< 30 min) et des signaux hormonaux décrits entraînent la formation de réponses dites tardives. Parmi celles-ci, il y a la formation d'appositions pariétales ou CWA (*Cell Wall Appositions*) également appelées papilles, sur le site d'infection ou d'infestation (Hückelhoven 2007). Pour la mise en place de la papille, une réorganisation du cytosquelette (des microfilaments d'actine) et une densification du transport et des vésicules golgiennes sont nécessaires (Hardham *et al.* 2007). Les papilles correspondent à un lieu d'accumulation de composés tels que la callose, la lignine, le H_2O_2, les phytoalexines, les protéines PR et des inhibiteurs de CWDE. Des AGP et des xyloglucanes sont aussi présents dans les papilles (Celio *et al.* 2004) et peuvent participer à la perception des pathogènes au niveau de la paroi (Hardham *et al.* 2007).

Protéines et composés pariétaux

La callose, polymère de β-(1,3)-D-glucose est produite par des protéines transmembranaires appelées callose synthases (CalS). La callose inhiberait la pénétration du bioagresseur en séquestrant des composés antimicrobiens et des enzymes comme par exemple la peroxydase

Tableau 6 Familles de protéines PR (*Pathogenesis-related*).
D'après van Loon *et al.* (2006).

Famille	Exemple type	Propriétés
PR-1	PR-1a (Tabac)	Antifongique
PR-2	PR-2 (Tabac)	b-(1,3)-chitinase
PR-3	P, Q (Tabac)	Chitinase de type I, II, III, IV, V, VI, VII
PR-4	R (Tabac)	Chitinase de type I, II
PR-5	S (Tabac)	Thaumatin-like
PR-6	Inhibiteur I (Tomate)	Inhibiteur de protéase
PR-7	P_{69} (Tomate)	Endoprotéinase
PR-8	Chitinase (Concombre)	Chitinase de type III
PR-9	Lignin-Forming peroxydase (Tabac)	Peroxydase
PR-10	PR1 (Persil)	Ribonuclease-like
PR-11	Chitinase de classe V (Tabac)	Chitinase de tpe I
PR-12	Rs-AFP3 (Radis)	Défensine
PR-13	Thionine 1.2 (*A. thaliana*)	Thionine
PR-14	LTP4 (Orge)	Protéine de transfert de lipides
PR-15	OxOa (Orge)	Oxalate oxydase
PR-16	OxOLP (Orge)	Oxalate-oxidase-like
PR-17	PRp27 (Tabac)	Inconnue

(Hardham *et al.* 2007). L'induction des gènes codant les CalS, dépend de la voie du SA (Nishimura 2003) et de la disponibilité en ions Ca^{2+} (King & Zeevaart 1974). En parallèle, le dépôt de composés phénoliques comme la lignine dans les papilles permet d'augmenter l'imperméabilité de la paroi et sa résistance à la pression mécanique appliquée par la pénétration de l'envahisseur. Les lignines sont des polymères naturels complexes résultant du couplage oxydatif de trois monolignols (alcools p-coumaryle, coniféryle et sinapyle). Ce couplage est effectué au sein de la paroi soit par des peroxydases de classe III qui utilise du H_2O_2 (Demont-Caulet *et al.* 2010), soit par des laccases qui utilisent de l'oxygène (Cai 2006).
Ces composés interviennent particulièrement dans les interactions plante-puceron. Le dépôt de callose est observé sur les plaques criblées des éléments des tubes criblés pénétrés par les stylets. Suite à 12 ou 24 h d'infestation par *M. persicae*, des dépôts de lignine ou de callose (respectivement) sont observés dans les cellules épidermiques et mésophylliennes de melon (*Cucumis melo*) en contact avec les stylets (Villada *et al.* 2009).

Il y a également une accumulation de protéines de défense appartenant à diverses familles. Parmi celles-ci, des protéines de faible poids moléculaire possèdent des activités antimicrobiennes, hydrolytiques sur les parois de champignons, toxiques par contact et/ou sont impliquées dans l'activation des réactions de défense (Van Loon *et al.* 2006). Des enzymes du métabolisme secondaire impliquées dans les voies de biosynthèse de composés phénoliques, des protéines antifongiques (thionine, PR-1, …), des enzymes hydrolytiques (chitinases, glucanases, lectines, …), des enzymes du métabolisme et du transport des lipides (protéines de transfert des lipides, lipoxygénases, …) (Kombrink & Somssich 1997). La plupart de ces protéines appartiennent aux 17 grandes familles de protéines PR identifiées (**Tableau 6**, Van Loon *et al.* 2006).

Certaines d'entre elles sont sécrétées dans la paroi pendant les réponses de défense basales. La PR1, des chitinases, des glucanases, des thionines, des protéases et des défensines peuvent être sécrétées dans la paroi afin de modifier l'intégrité des membranes ou parois des pathogènes (Hückelhoven 2007).

Production de protéines et métabolites secondaires

Dans les feuilles, de nombreux métabolites secondaires contenant du soufre sont accumulés dans des cellules mésophylliennes (camalexine, défensines), dans des cellules spécialisées (glucosinolates) ou dans les cellules du phloème (Mazid *et al.* 2011).

La camalexine (3-thiazol-2'-yl-indole) représente la phytoalexine la plus abondante chez *A. thaliana* (Ahuja *et al.* 2012). Sa synthèse s'effectue à partir du tryptophane et nécessite l'intervention de plusieurs MAPK dont la MAPK4 et du facteur de transcription WRKY33 (**Figure 24**). Plusieurs cytochrome P450 sont aussi indispensables, comme par exemple CYP71B15 aussi nommé PAD3 (*Phytoalexin Deficient 3*). La production de camalexine est induite dans les feuilles d'*A. thaliana* par une large gamme d'organismes biotrophes ou nécrotrophes (Ahuja *et al.* 2012) mais aussi par les pucerons (Kuśnierczyk *et al.* 2008). En effet, entre 24 et 72 h d'infestation par le puceron du chou *B. brassicae*, elle s'accumule dans les feuilles d'*A. thaliana* écotype L*er* et cette accumulation est corrélée à une baisse de la fécondité du puceron (Kuśnierczyk *et al.* 2008). C'est aussi le cas pour *M. persicae* selon une étude récente

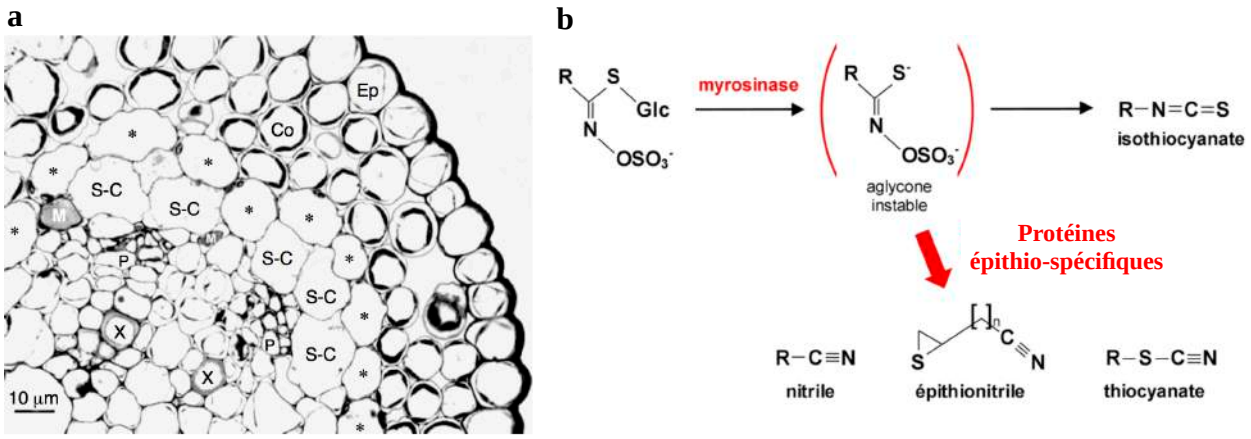


Figure 29 Le système glucosinolate-myrosinase

(a) Compartimentation des glucosinolates et myrosinases dans une coupe transversale de jeune tige d'*A. thaliana* écotype WS. Les glucosinolates sont présents dans les cellules-S riches en sulfure (S-C), à distance de l'enzyme hydrolytique, myrosinase, qui est stockée dans des cellules immédiatement adjacentes (M). Epiderme, Ep ; cortex, Co ; xylème, X ; phloème, P ; grains d'amidon. D'après Wittstock and Gershenzon (2002) **(b)** Hydrolyse enzymatique des glucosinolates. L'hydrolyse par la myrosinase produit un aglycone instable, pouvant former directement un isothiocyanate ou, suite à l'action de protéines épithio-spécifiques, un nitrile, un épithionitrile ou un thiocyanate. D'après Burow *et al*. (2009).

Tableau 7 Gènes d'*A. thaliana* codant des défensines
(*Plant defensins*, *PDF*). D'après Thomma *et al.* (2002).

Famille	Locus
PDF1.1	*AT1G75830*
PDF1.2a	*AT5G44420*
PDF1.2b	*AT2G26020*
PDF1.2c	*AT5G44430*
PDF1.3	*AT2G26010*
PDF1.4	*AT1G19610*
PDF1.5	*AT1G55010*
PDF2.1	*AT2G02120*
PDF2.2	*AT2G02100*
PDF2.3	*AT2G02130*
PDF2.4	*AT1G61070*
PDF2.5	*AT5G63660*
PDF2.6	*AT2G02140*

où différentes concentrations de camalexine sont aussi corrélées à une baisse de sa fécondité mais sa survie n'est alors pas affectée (Kettles *et al.* 2013). La diminution de fécondité de *M. persicae* va à l'encontre d'une autre étude qui concluait que la camalexine n'affecte pas sa fécondité (Pegadaraju *et al.* 2005). Notons cependant qu'une bactérie (*B. cinerea*) a développé un mécanisme de détoxification lui permettant de survivre, en induisant l'expression d'un gène (*BcATRB*) codant un transporteur ABC (*ATP-Binding Cassette*) et agissant comme protection contre la camalexine (Pedras *et al.* 1998).

Chez les *Brassicales*, ordre auquel appartient *A. thaliana*, des composés de défense spécifiques s'accumulent, les glucosinolates (GLS, Halkier & Gershenzon 2006). Les 120 GLS, identifiés dans 60 familles, sont issus du métabolisme des acides aminés (Fahey *et al.* 2001). Selon l'acide aminé de départ, ils sont classés en trois principales classes : GLS aliphatiques (alanine, méthionine, valine, leucine ou isoleucine), aromatiques (phénylalanine ou tyrosine) ou indoliques (tryptophane). Des variations de composition en GLS constituent un facteur important de résistance à une infestation ou infection. Différents écotypes d'*A. thaliana*, issus de différentes zones géographiques, ont déjà montré des profils diversifiés de GLS exprimés constitutivement (Kliebenstein *et al.* 2001 ; Lambrix *et al.* 2001). Suite à une infestation (de 6 à 48 h) par les pucerons *B. brassicae* et *M. persicae*, seuls les GLS indoliques sont induits (Kuśnierczyk *et al.* 2008), avec des variations constatées entre écotypes sauvages d'*A. thaliana* (Kuśnierczyk *et al.* 2007).
Particulièrement reconnus dans la défense contre les herbivores, ces composés sont stockés près du phloème dans des cellules spécialisées (cellules-S, riches en sulfure), à distance d'enzymes hydrolytiques spécifiques (myrosinases) stockées dans des cellules adjacentes (**Figure 29a**, Grubb & Abel 2006). Lors d'une blessure par un insecte, la compartimentation GLS/myrosinase est abolie et l'hydrolyse des GLS permet de libérer soudainement une grande diversité de produits bioactifs, des isothiocyanates, qui peuvent être convertis en dérivés nitriles, épithionitriles et thiocyanates (**Figure 29b**). Ces dérivés sont toxiques ou répulsifs contre les insectes et pathogènes (Bones & Rossiter 1996 ; Halkier & Gershenzon 2006). Cependant, certains insectes comme les pucerons contournent la toxicité des isothiocyanates, en ne perturbant que très peu la compartimentation GLS/myrosinase. Le puceron du chou *B. brassicae*, spécialiste des Brassicaceae, séquestre ainsi des GLS intacts (comme la sinigrine par exemple) dans son hémolymphe et les utilise pour sa propre défense. En effet, il possède sa propre myrosinase stockée dans des structures cristallines de certains muscles et mime parfaitement le système de défense des plantes contenant des GLS s'il est lui-même attaqué par un prédateur (Jones *et al.* 2001 ; Francis *et al.* 2001 ; 2002). A l'inverse, *M. persicae*, puceron non spécialiste des Brassicaceae, ne possède pas de myrosinase et excrète les GLS ingérés dans son miellat (Weber *et al.* 1986).

Les défensines sont des peptides antimicrobiens de faible masse moléculaire riches en résidus cystéine (Broekaert *et al.* 1995). Chez *A. thaliana*, il existe 13 gènes répartis sur plusieurs chromosomes codant des défensines (*Plant Defensins*, *PDF*) (**Tableau 7**, Thomma *et al.* 2002). Suite à des analyses phylogénétiques, un classement en deux familles des PDF a été proposé. La première famille contient sept peptides (PDF1.1 à 1.5), dont cinq sont très similaires (PDF1.1 à 1.3). De plus, les peptides matures de trois d'entre eux sont identiques (PDF1.2a, b et c). La

seconde famille (PDF2.1 à 2.6) montre plus de variations au niveau de la composition en acides aminés. L'expression des gènes *PDF1.1*, *1.2*, *2.1*, *2.2* et *2.3* dépend de l'organe considéré. Quatre sont présents constitutivement (*PDF1.1*, *2.1*, *2.2* et *2.3*) et *PDF1.2* est le seul à être induit dans les feuilles suite à un stress biotique (Thomma *et al.* 2002). Dans ce cas, l'expression du gène *PDF1.2* est dépendante de l'activation simultanée des voies de signalisation JA et ET (Penninckx *et al.* 1998). Les pucerons activent modérément ces deux voies, il semble donc cohérent que suite à une infestation par *B. brassicae*, les gènes *PDF1.2a*, *b* et *c* (mais aussi *PDF1.3*) soient surexprimés dès 6 h d'infestation (Kuśnierczyk *et al.* 2008), tout comme le gène *PDF1.2*, surexprimé de 24 à 96 h après infestation par *M. persicae* (Moran & Thompson 2001 ; Divol *et al.* 2005). Enfin, il a été montré que l'expression du gène *PDF1.2* est associée directement à la résistance basale mise en place contre une infestation par les chenilles *Spodoptera littoralis* (Ahmad *et al.* 2011).

Les lectines (ou agglutinines) représentent une grande famille de protéines possédant au moins un domaine non-catalytique pouvant se fixer spécifiquement et de façon réversible à des mono- ou oligosaccharides (Peumans & Van Damme 1995 ; Van Damme *et al.* 2008). Elles interviennent au niveau du développement et de la différenciation du phloème (Dannenhoffer *et al.* 1997), dans l'obturation des tubes criblés suite à des blessures (Read & Northcote 1983) et possèdent des activités insecticides (Carlini & Grossi-de-Sá 2002). En effet, les lectines sont capables de se lier aux tissus constituant l'intestin moyen (« *midgut* ») de l'insecte et de perturber son alimentation et sa digestion (Murdock & Shade 2002). Des lectines exprimées de façon constitutive et induite dans la sève élaborée sont identifiées, comme celles de la famille des protéines du phloème 2 (*Phloem Proteins 2*, PP2). Parmi les 30 gènes codant des « *Phloem Protein2-like* » identifiés dans le génome d'*A. thaliana*, les gènes et protéines PP2-A1 et PP2-A2 sont les seuls à avoir été caractérisés (Dinant *et al.* 2003 ; Beneteau *et al.* 2010). PP2-A1 a un effet néfaste sur les insectes car il réduit le poids des nymphes d'*A. pisum* et de *M. persicae* s'alimentant sur un milieu artificiel contenant différentes concentrations de PP2-A1 (Beneteau *et al.* 2010). De plus, la surexpression du gène *AtPP2-A1* engendre une forte baisse (60 %) du temps d'ingestion de sève élaborée de *M. persicae*, ainsi qu'une forte mortalité (Zhang *et al.* 2011).

Il existe donc une grande diversité de mécanismes et de composés secondaires produits lors de la mise en place de la résistance basale. En parallèle, de nombreuses défenses engagées peuvent être contournées par le puceron.

2.3. Le contournement des défenses

Les pucerons sont capables de contourner les défenses mises en place par la plante. En effet, en utilisant des effecteurs dans leur salive ils peuvent améliorer leur alimentation, rendant ainsi l'interaction compatible.

2.3.1. Effecteurs aphidiens contournant les défenses de la plante

Un effecteur correspond à un élément aphidien sécrété dans l'apoplasme ou le cytoplasme afin d'inhiber un ou plusieurs mécanismes de défense de la plante pour son bénéfice. Différents effecteurs capables de détourner les défenses basales de la plante ont été identifiés, notamment chez le puceron du pêcher *M. persicae* et chez le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* (Hogenhout & Bos 2011). Des protéines se liant au calcium (*Ca^{2+}-binding proteins*), capables d'empêcher l'occlusion des tubes criblés du phloème, sont présentes dans la salive liquide aphidienne. Ceci va lui permettre de maintenir un flux abondant et constant de sève élaborée (Will *et al.* 2007). Potentiellement, ces protéines pourraient prévenir l'activation des voies de signalisation Ca^{2+}-dépendantes dans les tubes criblés (Knoblauch & van Bel 1998 ; Hogenhout & Bos 2011).

Chez les pucerons, la glucose oxydase (GOX) constitue le premier effecteur découvert en 2008, dans la salive de *M. persicae* (Harmel *et al.* 2008). La GOX est capable d'inhiber la production de nicotine et la résistance chez le tabac *N. tabacum*. Cette inhibition a aussi été mise en évidence chez la chenille *Helicoverpa zea*, indiquant que la suppression de défenses par cette enzyme semble être une stratégie commune aux insectes herbivores (Eichenseer *et al.* 1999 ; Musser *et al.* 2002 ; Hogenhout & Bos 2011).

Le gène *C002*, codant une protéine sécrétée dans les tissus de la plante hôte, a aussi été identifié comme effecteur dans les glandes salivaires du puceron du pois *A. pisum*. La non-expression de ce gène (par extinction de gène) engendre une altération du comportement trophique du puceron, avec une réduction drastique du nombre de pucerons effectuant une phase d'ingestion de sève élaborée (Mutti *et al.* 2006 ; 2008). De plus, il a été montré récemment que la surexpression du gène *C002* de *M. persicae* dans des plants de tabac *N. benthamiana* augmente significativement la fécondité de *M. persicae*, ce qui confirme bien le rôle du gène *C002* dans la virulence aphidienne (Bos *et al.* 2010). Des analyses phylogénétiques de *C002* indiquent que ce gène évolue rapidement chez les pucerons et qu'il n'est pas présent chez les autres insectes, reflétant une adaptation biologique inconnue (Ollivier *et al.* 2010). Cette adaptation pourrait être le résultat d'une coévolution pour la « course à l'armement » avec la plante hôte (Hogenhout & Bos 2011).

Par ailleurs, les protéines salivaires Mp10 et Mp42, exprimées chez *N. benthamiana*, sont capables de supprimer le pic oxydatif induit par un MAMP bactérien (la flagelline fgl22). De plus, ces protéines réduisent significativement la fécondité de *M. persicae* (Bos *et al.* 2010). D'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre comment fonctionnent ces effecteurs.

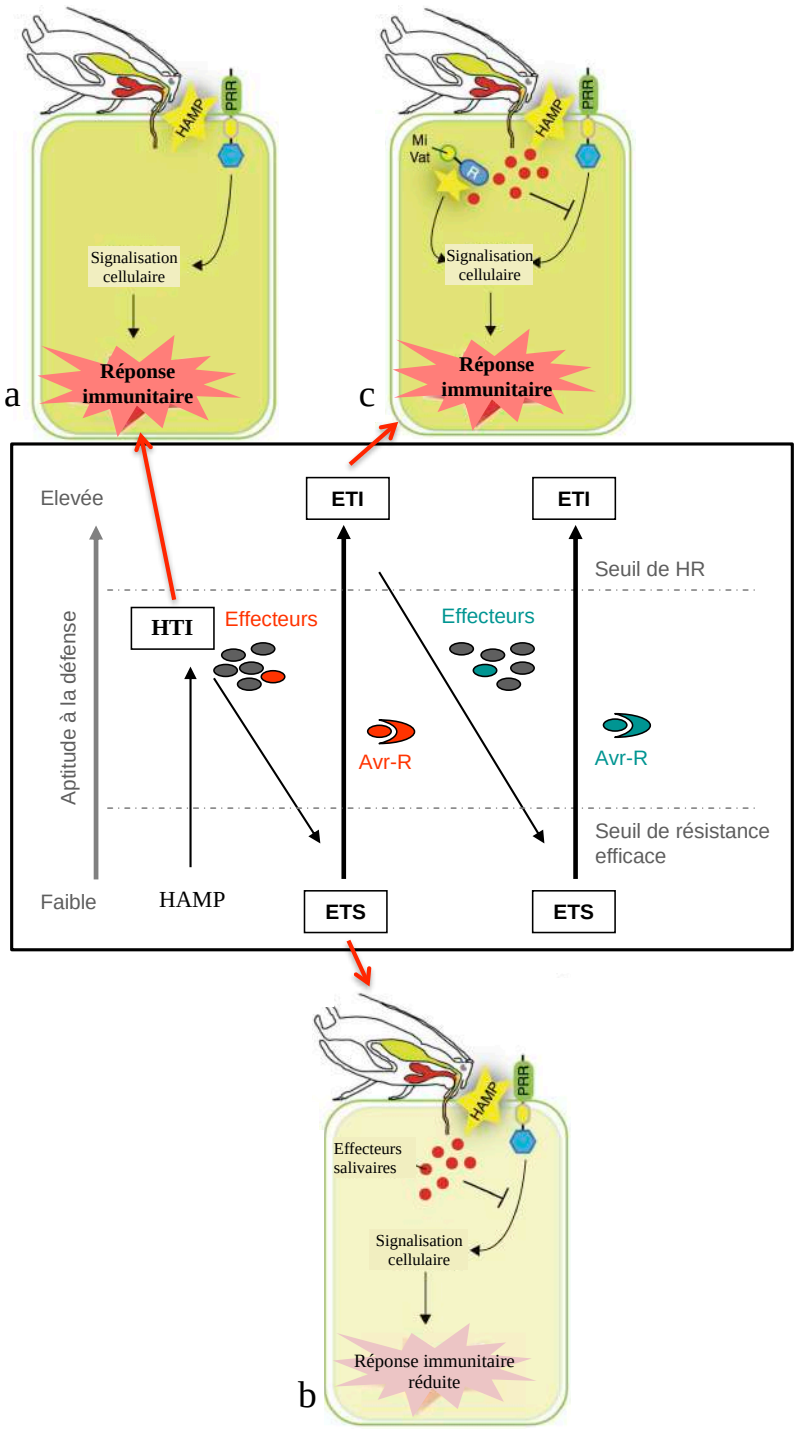


Figure 30 Le modèle Zig-Zag appliqué aux interactions plante-puceron

(a) Dans un premier temps, la plante détecte les **HAMP** aphidiens (exemple : le trans-Me-OPDA) *via* un récepteur PRR (encore hypothétique) et met en place la résistance basale **HTI** (*HAMP-Triggered Immunity*). **(b)** Dans un deuxième temps, le puceron libère des effecteurs (ronds rouges) qui vont cibler des réponses de défense basales pour les inhiber et favoriser le développement de l'insecte, résultant en une sensibilité de la plante **ETS** (*Effector-Triggered Susceptibility*). **(c)** Dans un troisième temps, pour contrer l'insecte, un effecteur (avirulent, Avr) est reconnu par la plante grâce à une protéine de résistance (R) pour déclencher une résistance spécifique **ETI** (*Effector-Triggered Immunity*), souvent accompagnée de la réaction hypersensible (HR). Dans un quatrième temps, les pucerons ayant perdu l'effecteur rouge mais gagné d'autres effecteurs (en bleu) sont sélectionnés. La plante favorise de nouveaux allèles de gènes *R*, capables de reconnaître ces nouveaux effecteurs, pour la mise en place d'une nouvelle résistance spécifique. D'après Jones *et al*. (2006) et Hogenhout & Bos (2011).

Pour contrer les différents effecteurs, la plante a développé une résistance spécifique basée sur des gènes de résistance.

2.3.2. Modèle Zig-Zag appliqué aux pucerons

Le modèle Zig-Zag représente de manière schématique l'évolution simultanée des protéines végétales et des protéines de pathogènes ou d'insectes, induisant successivement le passage d'un état de la plante résistant à un état de susceptibilité (Jones & Dangl 2006).
L'issue de toute interaction plante-puceron repose sur un continuum entre susceptibilité et résistance (**Figure 30**). Le modèle Zig-Zag appliqué aux pucerons inclue la perception des HAMP qui initient la HTI, premier niveau de résistance de la plante avec un éventail de réponses de défense suffisantes pour limiter l'infestation aphidienne (**Figure 30a**). C'est le premier "zig" vers la résistance. La HTI agit comme une réaction de défense générique à large spectre, puisqu'elle est déclenchée par des éliciteurs conservés au sein des insectes. Afin de palier la HTI, les pucerons ont développé des protéines effectrices, dites de virulence, qui vont agir pour bloquer la signalisation et/ou les réponses de défense déclenchées par les HAMP. Cette susceptibilité déclenchée par les effecteurs ou ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*) conduit l'interaction vers la sensibilité de la plante hôte (le 'zag', **Figure 30b**). En réponse à l'ETS, les plantes vont développer une immunité déclenchée par des effecteurs reconnus par des protéines NB-LRR : l'ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (un autre "zig", **Figure 30c**). Cette « attaque-réponse » peut théoriquement se produire de manière itérative avec plusieurs ETS, suivis par leur reconnaissance et une ETI. L'issue finale de l'interaction dépend ensuite de la somme totale de (HTI-ETS) + ETI (Nishimura & Dangl 2010). L'interaction entre la plante et l'insecte repose donc sur la théorie de la reine rouge, tirée de l'histoire d'Alice au pays des merveilles de Lewis Carroll, assimilable à une course aux armements sans fin où chacun des deux protagonistes est amené à évoluer pour vaincre l'autre.

2.3.3. Gènes de résistance de la plante pour contrer les effecteurs

Afin de contrer les différents effecteurs utilisés par les pucerons pour contourner la PTI, la plante a développé la résistance spécifique ETI (*Effector-Triggered Immunity*), basée sur l'utilisation de gènes de résistance (gènes *R*). Les gènes *R* agissent comme des récepteurs et codent souvent des protéines membres de la famille NBS-LRR, comme les récepteurs PRR. Les gènes *R* confèrent une résistance contre les pathogènes mais aussi contre les insectes herbivores tels que les pucerons (Hogenhout & Bos 2011). Jusqu'à maintenant, quatre gènes *R* appartenant à la famille NBS-LRR ont été caractérisés (*Mi-2.1*, *Vat*, *AKR* et *AIN*) mais seuls deux ont été clonés (*Mi-2.1*, *Vat*). D'autres gènes *R* ont été identifiés chez différentes espèces végétales mais pas encore chez *A. thaliana* (Louis 2012 ; Smith & Clement 2012) (**Tableau 8**).

Mi-1.2 confère une résistance de la tomate (*Solanum lycopersicum*) à certains clones du puceron de la pomme de terre *Macrosiphum euphorbiae* (Rossi *et al.* 1998) mais aussi à plusieurs biotypes d'aleurodes (*B. tabaci*, Nombela *et al.* 2003), une psylle (*Bactericerca cockerelli*, Casteel *et al.* 2006) et trois espèces de nématodes (*Meloidogyne* spp., Jacquet *et al.* 2005). *Mi-*

Tableau 8 Gènes de résistance contre les pucerons identifiés
Nombre de loci de résistance, produits du gène (si connu) et catégorie de résistance phénotypique. D'après Smith and Clement (2012).

Plante	Puceron	Gène(s)[a]	Catégorie(s)	Référence(s)
Blé	*Diuraphis noxia*	*Dn* (10); QTL	Ab, Ax, Tol	(Liu *et al.*, 2001; Lapitan *et al.*, 2007)
	Schizaphis graminum	*Gb* (>10); QTL	Ab, Ax, Tol	(Zhu *et al.*, 2005)
Cornille	*Aphis craccivora*	*Rac* (2)	Ab	(Myers *et al.*, 1996)
Fétuque élevée	*Rhopalosiphum padi*	*LOL* (2); (loline-endophyte alkaloid)	Ab, Ax	(Spiering *et al.*, 2005)
Framboise	*Amphorophora idaei*	*A* (12), *dw*	Ab, Ax	(Sargent *et al.*, 2007)
Luzerne	*Acyrthosiphon kondoi*	*AKR, AIN RAP1 TTR*	Ab, Ax, Tol	(Klingler *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2009)
Laitue	*Nasonovia ribisnigri*	*Nr*	Ab	(McCreight, 2008)
	Pemphigus bursarius	*Ra* or *Lra*	Ab	(Wroblewski *et al.*, 2007)
Maïs	*Rhopalosiphum maidis*	*aph* (2)	Ab	(Carena and Glogoza, 2004)
Melon	*Aphis gossypii*	*Vat* (1) (CC-NBS-LRR); QTL	Ab, Ax	(Dogimont *et al.*, 2010; Boissot *et al.*, 2010)
Orge	*Diuraphis noxia*	*Rdn* (2); QTL	Ab, Tol	(Mittal *et al.*, 2008)
	Schizaphis graminum	*Rsg* (2)	Ab, Tol	(Porter *et al.*, 2007)
Pêche	*Myzus persicae*	*Rm1*	Ab, Ax	(Pascal *et al.*, 2002)
Pomme	*Dysaphis devecta*	*Sd-* (3); QTL	Ab	(Cevik and King, 2002)
	Dysaphis	*Sm-h*; QTL	Ab	(Alston *et al.*, 2000)
	Eriosoma lanigerum	*Er* (3)	Ab, Ax	(Bus *et al.*, 2008)
Poire	*Dysaphis pyri*	*Dp-1*	Ab	(Evans *et al.*, 2008)
Sorgho	*Schizaphis*	*Ssg* (9); QTL	Ab, Tol	(Wu and Huang, 2008)
Soja	*Aphis glycines*	*Rag* (3), *rag* (2); QTL	Ab, Ax	(Rouf Mian *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010*a*)
Tomate	*Macrosiphum*	*Mi-1.2* (CC-NBS-LRR)	Ab, Ax	(Rossi *et al.*, 1998)

[a] Symbole du gène (les minuscules indiquent un héritage récessif) ; nombre de loci de résistance ; facteur(s) de résistance si connu ; QTL indique plusieurs loci de résistance cartographiés
Abréviations : Ab, antibiose ; Ax, antixénose ; QTL, quantitative trait loci ; Tol, tolérance.

1.2 représente le premier gène R contre les herbivores à avoir été cloné. La résistance aux nématodes activée par ce gène s'effectue par l'activation de la HR, associée à la mort cellulaire autour du site d'alimentation, bloquant l'alimentation du nématode (Roberts & Thomason 1986). Au contraire, la résistance au puceron de la pomme de terre activée par *Mi-1.2* est indépendante de la HR (De Ilarduya *et al.* 2003). La résistance est alors effectuée en limitant la capacité de l'insecte à s'alimenter de sève élaborée, avec une ingestion 7 à 10 fois plus longue sur un plant de tomate sensible que sur un plant résistant (Kaloshian *et al.* 2000). *Vat* confère une résistance chez le melon (*Cucumis melo*) à un biotype du puceron du melon *Aphis gossypii* (Dogimont *et al.* 2010) et les deux gènes *R AKR* et *AIN* identifiés chez la luzerne tronquée (*Medicago truncatula*) attribuent une résistance au puceron *Acyrthosiphon kondoi* (Klingler *et al.* 2005 ; 2009). Il existe d'autres gènes *R* encore non caractérisés et non clonés, comme les gènes *NR* chez la laitue, *SD1* chez le pommier, *RAG1* et *RAG2* chez le soja et *RAP1* chez la luzerne, conférant une résistance spécifique respectivement contre le puceron de la laitue (*Nasanovia ribisnigri*), le puceron des galles rouges (*Dysaphis devecta*), le puceron du soja (*Aphis glycines*) et le puceron du pois (Cevik & King 2002 ; A. pisum, McCreight 2008 ; Stewart *et al.* 2009 ; Zhang *et al.* 2010a).
La résistance associée à un gène *R* est souvent limitée à un clone d'une espèce aphidienne. Certains biotypes peuvent donc contourner et/ou supprimer les défenses de la plante.

La notion de résistance directe de la plante se traduit sur les pucerons par trois catégories de résistances phénotypiques : l'antixénose, l'antibiose et la tolérance (Van Emden & Harrington 2007). L'antixénose représente la non-préférence d'un puceron pour une plante résistante, qui a lieu lorsque des facteurs biophysiques ou allélochimiques affectent défavorablement le comportement trophique de l'insecte, aboutissant à une acceptation retardée et à un possible rejet pur et simple d'une plante en tant qu'hôte. L'antibiose se produit lorsqu'il y a des effets défavorables d'une plante résistante sur la survie, le développement et la fécondité du puceron. La tolérance représente un ensemble complexe de traits génétiques permettant à une plante de résister ou de récupérer des dommages causés par les pucerons sans nuire à la croissance ou la survie de ceux-ci. Le **Tableau 8** présente les catégories de résistance identifiées contre 20 espèces de pucerons. Dans tous les cas, une antibiose seule ou combinée avec d'autres catégories de résistance a été identifiée (Smith & Clement 2012).

Les trois catégories de résistance que nous venons de caractériser dépendent directement des signalisations hormonales mises en place lors de la résistance directe (constitutive) (**Figure 31**). L'antixénose peut être due par exemple à la présence et la densité de trichomes (glandulaires ou non), à la présence de cires épicuticulaires, à la structure de la paroi et sa rigidité modifiée, notamment par la structure des pectines ou encore à la présence de composés anti-appétants comme les glucosinolates, les alcaloïdes et autres composés que nous avons déjà vus précédemment. L'antibiose est issue notamment de la présence de ROS ou de toxines comme les lectines, des inhibiteurs de protéase ou autres composés inhibiteurs de croissance et de développement des pucerons. La tolérance est représentée par exemple par la limitation de la perte en eau, par la fermeture des stomates induite par l'acide abscissique (Wang *et al.* 2001) ou par la réparation rapide des tissus endommagés par un taux d'auxine et d'éthylène important (Reid & Ross 2011).

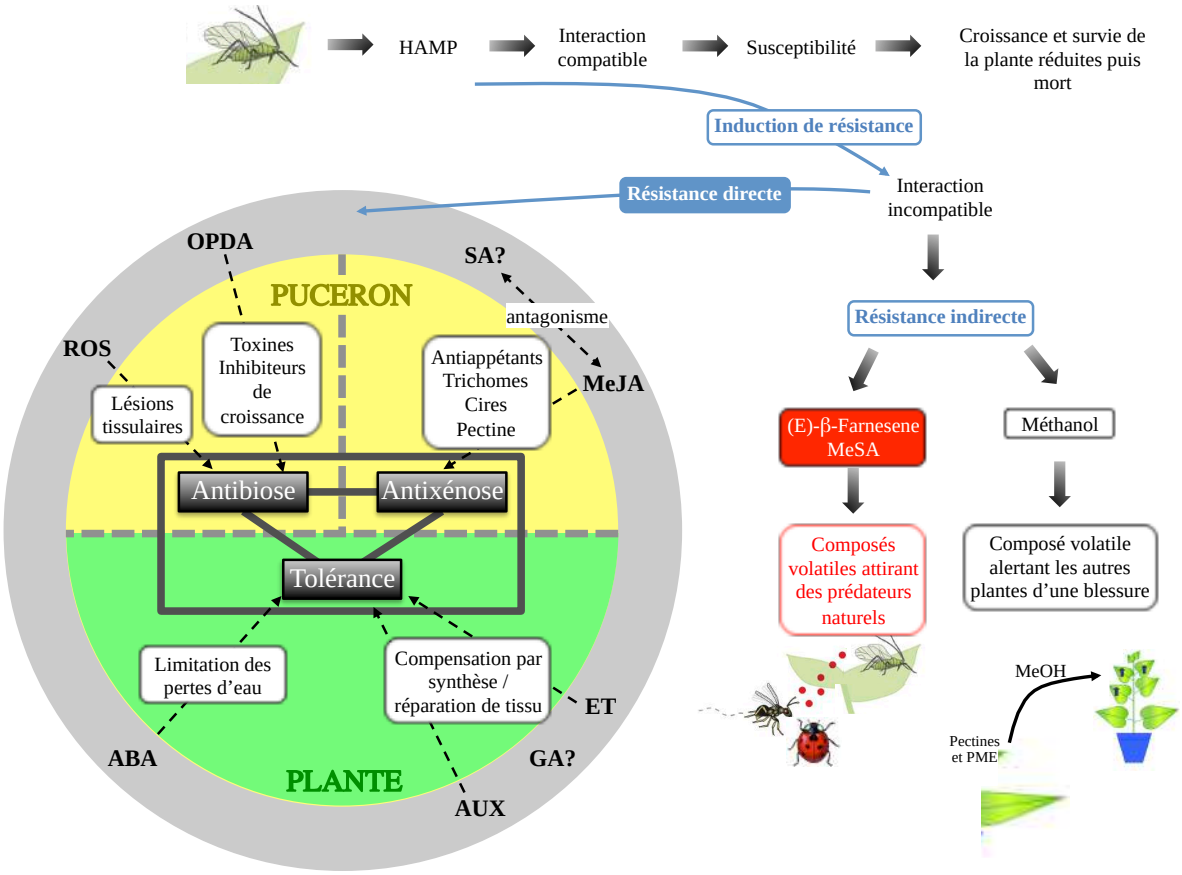


Figure 31 Principales étapes de l'activation des réponses de défense de la plante aux HAMP

Ces étapes aboutissent à une interaction plante-puceron compatible (susceptibilité de la plante) ou incompatible (résistance de la plante). Des signaux dirigés par les phytohormones activent des réponses de résistance directes ou indirectes. La résistance directe pourrait résulter soit d'une induction de ROS, OPDA, MeJA ou SA, qui produisent des facteurs anti-aphidiens exprimant une antibiose ou une antixénose, soit de l'induction de GA, ABA, ET ou IAA, qui produisent des composés métaboliques contribuant à la tolérance. Les facteurs de la plante ou du puceron contribuant à une antixénose, une antibiose ou une tolérance peuvent résulter à la fois de l'expression de gènes de résistance induits ou constitutifs. Abréviations: ABA, acide abscissique; AUX, auxine; ET, éthylène; GA, acide gibbérellique; HAMP, *Herbivore-Associated Molecular Pattern*; IAA, acide indole 3-acétique; MeJA, méthyl jasmonate; OPDA, acide 12-oxo-phytodiénoique; ROS, espèce réactive de l'oxygène; SA, acide salicylique. D'après Smith and Clement (2012), Dorokhov *et al.* (2012) et Gosset *et al.* (2009).

Une résistance indirecte peut aussi être induite suite à l'infestation aphidienne, se traduisant par la libération de composés organiques volatiles (VOC) par la plante (**Figure 31**). Ces composés peuvent attirer plusieurs ennemis des pucerons comme des syrphes, des guêpes parasitoïdes ou des coccinelles. Par exemple, le MeSA, un VOC induit chez le soja par le puceron du soja (*A. glycines*), attire son prédateur coléoptère, *Coccinella septempunctata*, vers la plante infestée pour réduire la population aphidienne (Zhu & Park 2005). Le (E)-β-farnesene (EBF), qui est une phéromone d'alarme pour plusieurs espèces de pucerons (Pickett *et al.* 1992), attire aussi des insectes prédateurs, comme par exemple le parasitoïde *Diaeretiella rapae* de *M. persicae* (Beale *et al.* 2006). Etrangement, la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) contient du EBF dans son arsenal de VOC induits par *M. persicae*. Celui-ci apporte une protection pour la plante par un effet répulsif sur le puceron, en attirant les parasitoïdes ou en habituant les pucerons à leur phéromone d'alarme afin qu'ils soient plus vulnérables aux prédateurs (Gosset *et al.* 2009 ; De Vos & Jander 2010). Enfin, le méthanol produit lorsque les PME déméthylent activement les HG, peut servir de communication entre plantes (*N. benthamiana*) afin d'alerter les plantes voisines d'une blessure ou d'un stress. De plus, au niveau des feuilles de ces plantes voisines, une résistance contre la bactérie *Ralstonia solanacearum a été* observée, ainsi qu'une susceptibilité au virus TMV. Les modifications de réponse à ces deux stress biotiques impliquent des gènes induits par le méthanol (dont la PR2 et un PMEI). (Dorokhov *et al.* 2012).

2.4. Les éléments intervenant dans la résistance de la plante aux pucerons

L'ensemble des défenses impliquées durant la résistance de la plante contre les pucerons déclenchée lors de la HTI et l'ETI fait donc intervenir de nombreux éléments, issus de diverses catégories (**Tableau 9**). Au niveau physiologique, beaucoup d'éléments impliqués dans la défense interviennent dans la résistance contre les aphides. Les gènes R, récepteurs déclenchant l'ETI, agissent en complément des différents mécanismes déclenchés par la PTI. Parmi ces derniers, le déclenchement du pic oxydatif suivi éventuellement de la réaction hypersensible, intervient dans la signalisation locale, autour de la zone de pénétration des stylets. La signalisation à longue distance, contribuant à la résistance systémique, est activée par les différentes voies hormonales impliquées dans la défense (SA, JA/ET) ou dans le développement (CK, GA, AUX). Leurs activations aboutissent notamment à la production de divers composés de défense, dont plusieurs composés organiques volatils, qui constituent des signaux qui peuvent interagir à longue distance avec les pucerons, leurs prédateurs/ennemis ou avec les autres plantes.

La progression des stylets du puceron dans l'apoplasme peut être altérée par la structure de la paroi (**Tableau 9**), comme la rigidification des parois primaire ou secondaire, en particulier lorsque les pectines sont hautement méthylées ou reliées à des protéines de structure comme les protéines à arabinogalactanes, ou lorsque les HG ou les RGII forment des complexes en présence respectivement d'ions calcium ou borate. Les protéines de structure comme les extensines reliant les fibrilles de cellulose entre elles peuvent aussi altérer leur progression. Il en est de même pour les enzymes pariétales modifiant la rigidité de la paroi, comme les expansines ou les endoglucanases dégradant le réseau cellulosique et les enzymes modifiant les HG comme les

Tableau 9 Synthèse des éléments pouvant intervenir dans la résistance de la plante contre les pucerons
La liste des éléments intervenant dans cette résistance n'est pas exhaustive, elle est basée sur les différents exemples cités précédemment dans le Chapitre 1 Synthèse bibliographique.

Catégorie	Nature de l'élément
Structure de la paroi	
	Agencement des composés pariétaux
	Degré de méthylestérification des HG
	HG-boîte à œufs
	RGII-borate esters
	Protéines à arabinogalactanes
	Extensines
Enzymes pariétales	
	Estérases (pectine méthylestérases/acétylestérases)
	Hydrolases (polygalacturonases, lyases)
	Expansines
	Endoglucanases
Gènes de résistance	
	Mi1.2
	AKR
	AIN
	VAT
Pic oxydatif et réaction hypersensible	
	Réaction hypersensible
	Peroxyde d'hydrogène
	Oxyde nitrique
Hormones	
	Acide salicylique
	Acide jasmonique/éthylène
	Cytokinines
	Acide gibbérellique
	Auxine
Composés de défense	
	Callose (tubes criblés)
	Phytoalexines (camalexine)
	Composés phénoliques (lignines)
	Glucosinolates
	Protéines phloémiennes
	Protéines *PR*
	Défensines (PDF1.2)
Composés organiques volatiles (VOC)	
	Salicylate de méthyle
	β-farnesène
	Méthanol

hydrolases (PG, PL, etc.) dégradant la matrice pectique. Mon projet de thèse va nous renseigner sur l'implication des estérases et en particulier des PME, dans la défense contre les pucerons. Dans le cadre de la course à l'armement menée entre le puceron et la plante, quel pourrait être le rôle des HGME ? Présentes dans les interactions contre l'ensemble des agresseurs biotiques d'une plante et ayant un rôle aussi bien dans la résistance constitutive que dans la résistance induite, ceci suppose que les HGME peuvent faire partie des cibles visées par les effecteurs des agresseurs pour contourner les défenses mises en place.

La Partie 3 ci-après ne se limitera pas à des exemples liés aux pucerons mais sera élargie à l'ensemble des bioagresseurs. Ce travail a été élaboré dans le cadre de la réalisation d'une revue intitulée « *HomoGalacturonan-Modifying Enzymes: structure, expression and roles in plants*» (*Journal of Experimental Botany*, Vol 65, No. 18, pp. 5125-5160, 2014). L'extrait présenté ci-après correspond aux rôles des HGME dans la réponse aux stress. Dans l'**Annexe 5** la revue intégrale est présentée.

Tableau 10 Gene expression variations of homogalacturonan-modifying enzymes after biotic stresses
(a) pectin methylesterases (PMEs) and pectin acetylesterases (PAEs) ; **(b)** polygalacturonases (PGs) and pectin lyase-*like* (PLLs) involved in plant-bioaggressor interactions. Piercing-sucking insects (yellow box), chewing insects (turquoise), nematodes (blue), bacteria (black), fungi (light gray), arbuscular mycorrhizal fungus (dark gray), viruses (red) and parasitic flowering plants (green). Bolded species names indicate necrotrophic pathogens and underlined gene names refer to characterized enzymes.

a

Gene name	AGI or accession	Stress	Species name(s)	Induction	References
Pectin Methylesterases (PMEs)					
		Aphid	*Brevicoryne brassicae*	32 aphids/plant; 48 hpi	Kusnierczyk *et al.* 2008
AtPME17	At2g45220			upregulated 48 hpi (x4.53)	
AtPMEPCRF (61)	At5g53370			upregulated 6, 12, 24, 48 hpi (x1.35, 1.44, 1.83, 1.85)	
Apium graveolens cv. Dulce (Celery)		Aphid	*Myzus persicae*	20 (3 dpi) or 100 aphids (7 dpi)/plant	Divol *et al.* 2005
AgPME	CN254944			upregulated (x3.41, 2.41)	
AgPME	CN254453			upregulated (x3.48, 2.19)	
		Whitefly	*Bemisia tabaci*	100 whiteflies/plant; 21 dpi	Kempema *et al.* 2007
AtPME17	At2g45220			upregulated (x8.06)	
AtPMEPCRA (18)	At1g11580			downregulated (x-1.70)	
		Chewing insect	*Spodotera littoralis OS*	1mm holes punctured and 1 uL of insect OS applied; 6, 24 hpi	Consales *et al.* 2011
AtPME32	At3g43270		(Oral secretion)	upregulated (x2.17, 1.58)	
AtPMEPCRA (18)	At1g11580			upregulated (x3.33, 1.77)	
		Chewing insect	*Pieris brassicae*	10-40 eggs/plant; 24, 48, 72 hpi	Little *et al.* 2007
AtPME44	At4g33220			downregulated (x-1.54, -1.65, -1.39)	
Nicotiana attenuata (Tobacco)		Chewing insect	*Manduca sexta* OS	Leaf wounded with a pattern wheel + 20 uL of diluted insect OS; 9 hpi	Von Dahl *et al.* 2006
NaPME	DQ115979			upregulated (x2.59)	
		Nematode	*Meloidogyne javanica*	10-12 J2 nematodes/root tip; 3 dpi	Barcala *et al.* 2010
AtPME	At5g20860			upregulated (x3.05)	
AtPME	At1g11580			upregulated (x3.56)	
AtPME17	At2g45220			downregulated (x-3.54)	
		Nematode	*Heterodera schachtii*	250 J2 nematodes/plant; 3, 8, 13 dpi	Hewezi *et al.* 2008
AtPME3	At3g14310		*or Meloidogyne incognita*	upregulated (x2.0, 3.5, 3.0)	
Lycopersicum esculentum (Tomato)		Nematode	*Globodera rostochiensis*	10,000 J2 nematodes/plant; 14 dpi	Uehara *et al.* 2007
LePME	SNG-U213346			upregulated (x7.0)	
		Nematode	*Heterodera schachtii*	250 J2 nematodes/plant; 3 dpi	Puthoff *et al.* 2003
AtPME2	At1g53830			downregulated (x3.8)	
AtPME17	At2g45220			downregulated (x3.9)	
		Bacterium	***Pectobacterium carotovorum***	5×10^7 CFU/mL; 14 hpi	Raiola *et al.* 2011
AtPME3	At3g14310			upregulated (x2.5)	
		Fungus	***Botrytis cinerea***	5×10^5 conidia/mL; 72 hpi	Raiola *et al.* 2011
AtPME3	At3g14310			upregulated (x7.0)	
		Fungus	***Alternaria brassicola***	10, 24, 48 hpi	Narusaka *et al*. 2005
AtPME3	At3g14310			upregulated (x7.2, 2.9, 4.1)	
		Fungus	***Alternaria alternata***	10, 24, 48 hpi	Narusaka *et al*. 2005
AtPME3	At3g14310			upregulated (x11.2, 11.5, 6.8)	
Linum usitatissimum (Flax)		Fungus	***Fusarium oxysporum***	2 dpi (RT-PCR)	Wojtasik *et al.* 2011
LuPME3	AF188895		***or F. culmorum***	downregulated	
LuPME5	AF355057			downregulated	
Medicago truncatula (Barrel medic)		AM fungus	*Glomus mosseae*	28 dpi	Hohnjec *et al.* 2005
MtPME	TC78420		or *Glomus intraradices*	upregulated (x2.56 GM, x2.66 GI)	
MtPME	TC82059			upregulated (x2.33 GM, x4.11 GI)	
Sesbania rostrata (Sesbania)		*Rhizobium* bacterium	*Azorhizobium caulinodans*	48 hpi	Lievens *et al.* 2001
SrPME1	Srdd18			upregulated (RT-PCR)	Lievens et al. 2002
Solanum tuberosum cv Igor (Potato)		Virus	PVY^{NTN}	0.5 hpi	Baebler *et al.* 2009
StPME	STMHY50			downregulated (x-1.27)	
		Virus	TuMV	5 dai	Yang *et al.* 2007
AtPME3	At3g14310			downregulated (x-2.64)	
		Virus	CaLCuV	12 dai	Ascencio-Ibanez *et al.* 2008
AtPMEPCRA (18)	At1g11580			downregulated (x-1.14)	
		Virus	CMV, ORMV, TuMV, PVX, TVCV	4 dai	Whitham *et al.* 2003
AtPMEPCRA (18)	At1g11580			upregulated (x2.2 to 3.8)	
Vigna inguilata (Cowpea)		Parasitic plant	*Striga gesnerioides*	6 dai or 13 dai	Huang *et al.* 2012
VuPME	33686210			upregulated 6 dai (x3.24) and 13 dai (x3.29)	
Pectin Acetylesterases (PAEs)					
		Whitefly	*Bemisia tabaci*	100 silverfly/plant, 21 dpi	Kempema *et al.* 2007
AtPAE	At4g19420			upregulated (x2.89)	
AtPAE	At5g45280			downregulated (x-1.78)	
		Aphid	*Myzus persicae*	20 (3 dpi) or 100 aphids (7 dpi) /plant	Divol *et al.* 2005
AtPAE	CN254169			upregulated (x3.78, 2.16)	
Malus domestica (Apple tree)		Aphid	*Dysaphis plantaginea*	20 aphids/leave, 72 hpi	Qubbaj *et al.* 2005
MdPAE	CB035291 (=PAE *Vigna radiata*)			upregulated	
		Chewing insect	*Spodotera littoralis* OS	1mm holes punctured and 1 uL of insect OS applied; 6, 24 hpi	Consales *et al.* 2011
AtPAE	At2g46930			upregulated (x2.83, 2.30)	
		Nematode	*Meloidogyne incognita*	1, 2, 3, 5, 7 dpi	Vercauteren *et al.* 2002
AtPAE	AY050847 (=PAE *Vigna radiata*)		or *Heterodera schachtii*	upregulated	

3. Les rôles des enzymes modifiant les homogalacturonanes dans les réponses de la plante aux stress biotiques

3.1. Biotic stresses modify gene expression of HG-modifying enzymes

Plant HGMEs are involved in various biotic interactions: necrotrophic, hemibiotrophic or biotrophic pathogens (fungi, oomycetes, bacteria, viruses), phytophagous organisms (piercing-sucking insects, chewing insects, nematodes), endosymbiotic microorganisms (arbuscular mycorrhizae, bacteria) or plant parasites that feed and then develop on host plants. Piercing-sucking insects wound the plant by inserting their stylets (mouthpart) into tissue to suck cell contents or sieves. This wounding stress may be mimicked using needle punctures on leaves. Plant HGME gene expression is modified by all of these stresses but the observed patterns of expression are dependent upon the bioaggressor (**Table 10**). For instance, no induction of PG gene expression has yet been reported after chewing insect and plant parasite infestations. Similarly, no induction of PAE or PL gene expression was shown following infections by viruses, endosymbiotic microorganisms and plant parasites. For each bioaggressor, the pattern of HGME expression differs depending on the plant species, ecotype (or cultivar) and plant phenology. While *A. thaliana AtPME3* (*At3g14310*) was overexpressed in the C24 ecotype (Hewezi *et al.* 2008) after 3 days of infestation with 250 J2 nematodes (*Heterodera schachtii*), no such effect was reported in Col-0 for a similar infestation level. In contrast, in this ecotype, the expression of two other PMEs (*At2g45220* and *At1g53830*) was down-regulated following infestation (Puthoff *et al.* 2003). This difference could also be related to plant phenology as, although of similar age (14 days-old for C24 and 12 days-old for Col-0), the plants were grown under distinct photoperiods (16/8 and 12/12 day/night, respectively).

The analysis of available microarray data-sets from *A. thaliana* Col-0 ecotype (www.genevestigator.com, Hruz *et al*. 2008) for distinct pathogens shows that the expression of a number of HGME genes is mostly down-regulated whatever the type of biotic stress: necrotrophic (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*), hemibiotrophic (*Phytophthora infestans*) or biotrophic (*Pseudomonas syringae*) pathogens, phytophagous organisms (*Bemisia tabaci*, *Meloidogyne incognita*), virus (*Cabbage leaf curl virus* CalCuV) or wounding (needles, **Figure 32**). In general, within the smallest multigenic families of HGMEs such as PAEs and PLs, up to 67% and 42% of genes, respectively, show distinct expression patterns in response to biotic stresses. In contrast, figures are in the range of 29% and 24% for PMEs and PGs, respectively. In more detail, when considering the number of regulated HGME genes and their expression levels (up- or down-regulation), two clusters can be distinguished. The first includes responses to *P. infestans*, *B. tabaci*, *B. cinerea*, CalCuV and *P. syringae* and shows an overall down-regulation of most of the genes. The second cluster, which has far fewer modifications of gene expression, comprises the responses to *M. incognita*, *F. oxysporum* or wounding. Some genes are specifically expressed in each cluster (PL *At5g63180*, PGs *At4g23820*, *At3g06770* and *At3g16850* or PME *At1g53830* and PL *At5g55720* in cluster one and two, respectively). On this

b

Gene name	AGI or accession	Stress	Species name(s)	Induction	References
Polygalacturonases (PGs)					
		Aphid	*Brevicoryne brassicae*	32 aphids/plant	Kusnierczyk *et al.* 2008
AtPG	At5g49215			downregulated 6, 12, 24, 48 hpi (x-1.21, -1.46, -1.38, -1.52)	
AtPG	At3g62110			downregulated 6, 12, 24, 48 hpi (x-1.53, -1.43, -1.56, -1.55)	
AtPG	At1g60590			downregulated 6, 12, 24, 48 hpi (x-1.33, -1.45, -1.39, -1.51)	
AtPG	At4g23820			downregulated 6, 12, 24, 48 hpi (x-1.14, -1.27, -1.51, -1.62)	
AtPG	At3g06770			downregulated 6, 12, 24, 48 hpi (x-1.48, -1.83, -1.92, -1.83)	
AtPG	At1g10640			downregulated 6, 24, 48 hpi (x-1.78, -1.41, -1.88)	
		Aphid	*Myzus persicae* saliva infiltration	50 aphids/plant, 24 (OS), 48, 72 (OS+feeding) hpi	De Vos *et al.* 2009
AtPG	At1g60590			downregulated (x-2.69, -22.7)	
		Nematode	*Heterodera schachtii*	250 J2 nematodes/plant, 3 dpi	Puthoff *et al.* 2003
AtPG	At2g41850			upregulated (x3.7)	
AtPG	At1g05660			downregulated (x3.1)	
		Nematode	*Meloidogyne javanica*	10-12 J2 nematodes/root tip; 3 dpi	Barcala *et al.* 2010
AtPG	At4g23820			upregulated (x3.03)	
Medicago truncatula (Barrel medic)		AM fungus	*Glomus mosseae*	28 dpi	Hohnjec *et al.* 2005
MtPG	TC88957		or *Glomus intraradices*	upregulated (x2.53 GM, x4.50 GI)	
Medicago truncatula (Barrel medic)		*Rhizobium* bacterium	*Sinorhizobium meliloti*	24, 48 dpi	Lohar *et al.* 2006
MtPG	TC78631			upregulated (x1.14, 1.41)	
MtPG	TC89800			upregulated (x1.45, 1.25)	
MtPG	TC91368			upregulated (x1.14, 1.12)	
MtPG	TC87651			upregulated (x2.88, 2.23)	
Medicago sativa (Alfafa)		*Rhizobium* bacterium	*Sinorhizobium meliloti*	24 dpi	Munoz *et al.* 1998
MsPG	MsPG3			upregulated (RT-PCR)	
Solanum tuberosum cv Igor (Potato)		Virus	PVY^{NTN}	0.5 hpi	Baebler *et al*. 2009
StPG	STMIS28			downregulated (x-1,43)	
Pectate lyase-like proteins (PLLs)					
		Aphid	*Brevicoryne brassicae*	32 aphids/plant, 6, 12, 24, 48 hpi	Kusnierczyk *et al.* 2008
AtPL	At1g67750			downregulated (x-2.00, -1.62, -1.64, -1.85)	
Glycine max (Soybean)		Aphid	*Aphis glycines*	40 aphids/plant, 6 hpi	Li *et al.* 2008
GmPL	AI748551 (At1g67750)			downregulated (x-1.52)	
GmPL	AW099533			downregulated (x-1.54)	
GmPL	AW309146 (At1g11920)			downregulated (x-1.62)	
		Chewing insect	*Spodotera littoralis* OS	1mm holes punctured and 1 uL of insect OS applied; 6, 24 hpi	Consales *et al.* 2011
AtPNL	At3g15720			upregulated (x5.28, 2.0)	
AtPNL	At3g61490			upregulated (x12.13, 2.0)	
		Chewing insect	*Pieris brassicae*	downregulated (x-1.48, -1.45, -1.23)	Little *et al.* 2007
AtPNL	At5g48900			10-40 eggs/plant, 24, 48, 72 hpi	
		Nematode	*Meloidogyne javanica*	10-12 J2 nematodes/root tip; 3 dpi	Barcala *et al.* 2010
AtPL	At3g53190			upregulated (x4.88)	
Medicago truncatula (Barrel medic)		AM fungus	*Glomus mosseae*	28 dpi	Hohnjec *et al.* 2005
MtPL	TC88957		or *Glomus intraradices*	upregulated (x2.03 GM, x3.00 GI)	
Medicago truncatula (Barrel medic)		*Rhizobium* bacterium	*Rhizobium meliloti*	6, 12, 24, 48 dpi	Lohar *et al.* 2006
MtPL	TC89125			upregulated (x5.12, 2.37, 2.73, 1.18)	
Vigna inguilata (Cowpea)		Parasitic plant	*Striga gesnerioides*	13 dai	Huang *et al.* 2012
VuPL	33691436			downregulated (x-8.86)	

basis, it would be possible to distinguish between rather ubiquitous biotic stress-related HGMEs (PME *At2g45220* and PL *At3g07010*) and specific ones (PMEs *At5g04960-At3g10710* with *M. incognita*, PME *At2g47280* and PGs *At3g48950-At5g27530* with CalCuV, or PGs *At1g70500-At3g57510* with *P. syringae*). As both clusters include a necrotrophic fungus (*B. cinerea* and *F. oxysporum*), the changes in the expression of HGMEs do not appear dependent on the bioaggressor lifestyle *per se*. The expression of HGME genes is more likely to depend on the bioaggressor species (**Figure 32**). For instance, the number of HGME genes regulated following a 48 h infestation by *B. cinerea* was 3-fold higher than for an *F. oxysporum* infestation. This suggests distinct response pathways at the cell wall level. Interestingly, whatever the HGME family considered, *F. oxysporum* induces the fewest changes in gene expression levels. While it has been suggested that necrotrophs and hemibiotrophs can modulate the expression of a higher number of PMEs than biotrophs (Lionetti *et al.* 2012), it seems important to consider the pathogen species and probably the duration of infection. For example, after 48 h of infestation, HGME modifications induced by the two necrotrophic fungi, *F. oxysporum* and *B. cinerea*, belong to the two different clusters defined before while, within the same cluster, most HGME genes are more extensively modified after 24 h of infection by the biotrophic bacterium *P. syringae* than by the necrotrophic fungus *B. cinerea* (29, 24, and 42% against 23, 16, and 35% of PME, PG, and PL, respectively). Only PAE are recruited at the same level in both infections. Changes in the expression of HGME genes were observed for the duration of an interaction that can reach several weeks in the case of piercing-sucking insects and nematodes; the time needed to complete development steps or even a whole reproduction cycle. After 21 days of continuous feeding in a single phloem sieve element by whitefly nymphs *B. tabaci*, or after 28 days of infestation by the nematode *M. incognita*, the number of genes with modified expression was almost the same as after *B. cinerea* infection. Comparing the two piercing-sucking phytophagous insects, each belonging to the two different clusters, the overall number of PMEs and PLs differentially expressed is relatively similar, but differences lie in the identity of the isoforms. The changes in gene expression are likely to concern isoforms that are organ-specific; nematodes feeding on roots and whiteflies on leaves. Interestingly, 24 h after leaf wounding, the HGME pattern belongs to the same cluster as that of nematode infestation. Current challenges include the identification of the specific roles of HGME isoforms in biotic interactions (host species, bioaggressor lifestyle, plant phenology, attacked organ, duration of infestation/infection). This might help to build general and specific models of the response of the plant at the cell wall (pectin) level.

3.2. Role of HGMEs in the establishment of feeding structures during biotic interactions

Except for chewing insects and necrotrophic pathogens, in most cases a feeding connection is established during plant-bioaggressor interactions. Most hemibiotrophic, obligate biotrophic fungi or oomycetes use an appressorium followed by a penetration peg that goes through the plant cell wall to develop a haustorium for host cell nutrient absorption. Nutrient trafficking passes through the plant extrahaustorial membrane and matrix to the hyphae wall and membrane (Szabo and Bushnell, 2001; Underwood, 2012) while the whole haustorium is encased. Haustoria are also described as special organs of most parasitic plants and arbuscular

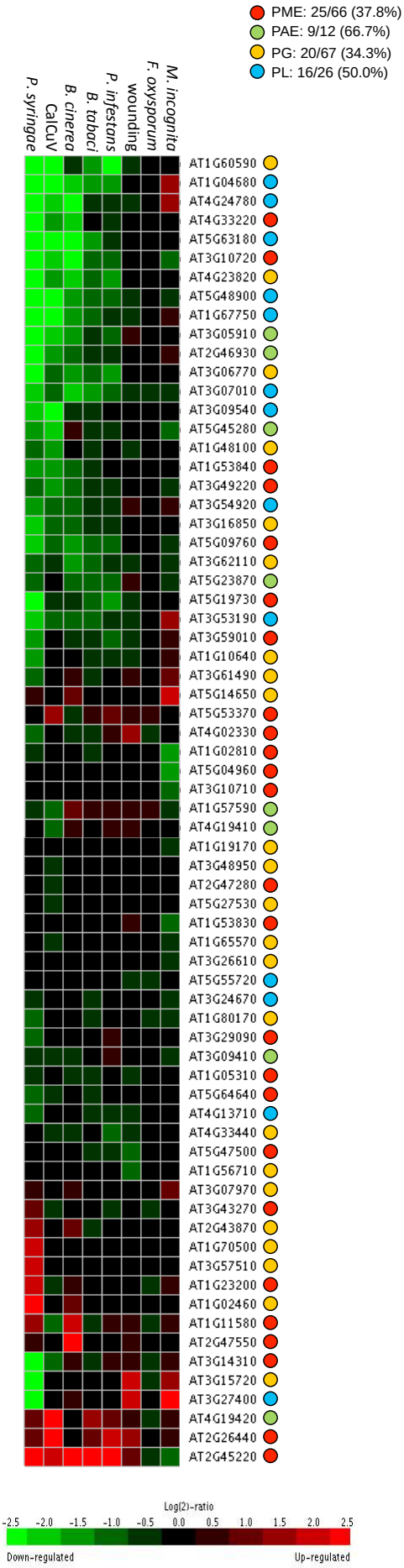


Figure 32 Expression pattern of PME, PAE, PG and PL mRNA in *A. thaliana* Col-0 in response to biotic stresses

Necrotrophic fungi (48h, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*), hemibiotrophic oomycete (24h, *Phytophthora infestans*), biotrophic bacterium (24h, *Pseudomonas syringae*), herbivore insects (21 days, *Bemisia tabaci*), nematode (28d, *Meloidogyne incognita*), virus (24h, *Cabbage leaf curl virus* CalCuV) and leaf wounding with needles (24h). PMEs, PAEs, PGs and PLLs (red, green, orange and blue circles) are shown together. Data were analyzed using the Genevestigator Meta-Analyzer Tools (www.genevestigator.com, Hruz *et al*, 2008). Only probes with a single gene and genes showing a minimal expression were used for the analysis. For each HGME family, the percentage (%) of genes expressed among all family members is indicated.

mycorrhizae fungi for penetration and development of vascular connections within the host plant for feeding (Leake, 1994; Lee, 2007). Cell wall remodeling, and thus cell wall degrading enzymes (CWDEs), including HGMEs, are necessary to establish a conductive system (Deising *et al.* 1995). CWDEs are secreted by pathogens, plant parasites or mycorrhizae fungi to develop the haustorium and by the plant to restrict its development, especially through cell wall apposition (papilla). Although callose and lignin have been described as the main embedded compounds for cell wall strengthening in the vicinity of the haustorium, pectate gel generated following PME activity could also play a role (Micheli, 2001). In fact, two PME genes are overexpressed in *Medicago truncatula* roots infected by the endosymbiotic fungus *Glomus* sp. (Hohnjec *et al.* 2005). In cowpea (*Vigna unguiculata*) infected by the holoparasite *Striga gesnerioides*, in parallel with the overexpression of one PME gene, one PLL is underexpressed in roots (Huang *et al.* 2012). Although to date no specific role has been demonstrated for plant HGMEs during haustorium differentiation, in wheat leaves infected by the pathogen *Blumeria graminis*, papillae size correlated with peroxidase activity and H_2O_2 accumulation, depending on the DA of plant pectin fragments used as elicitors (Randoux *et al.* 2010).

HGMEs are also good candidates for modulating cell wall structure during intrusive cell growth that occurs when plants interact with biotrophic, hemibiotrophic and arbuscular mycorrhizal fungi (Perfect and Green, 2001) and with parasitic plants (Leake, 1994). HGMEs could also modulate the interaction with aphids and nematodes (Wyss and Zunke, 1986; Tjallingii and Esch, 1993). For instance, the trophic behavior of the aphid *Myzus persicae* was modified within 8 hours of infestation in *A. thaliana* plants knocked out for the expression of the *AtPME17* gene (Wattier *et al*. unpublished). Interestingly, the expression of *PME17* is markedly increased following interactions with other aphids (*Brevicoryne brassicae*) or whitefly (*B. tabaci*) (**Figure 32**) (Kempema *et al.* 2007; Kuśnierczyk *et al.* 2008). As the salivation phases were longer in the *pme17* mutant, PME17 could have a role in facilitating the progression of the stylets in wild-type plants. Similarly, very early in root knot and cyst nematode infections (*M. incognita* and *Heterodera schachtii*, respectively), an up-regulation of one *AtPAE* was shown using *in situ* localization (Vercauteren *et al.* 2002). The activity of this HGME could be involved in softening the plant cell wall to establish a feeding site, which is an induced multi-nucleate and physiologically active aggregation of fused root cells that exclusively provides nutrients during the nematode sedentary life (Szabo and Bushnell, 2001; Vercauteren *et al.* 2002). Similarly, AtPME3 seems to be crucial in the early phase of the establishment of the syncytium, the feeding site of the cyst nematode, as it appeared to be a virulent target in the *A. thaliana* - *H. schachtii* interaction (Hewezi *et al.* 2008). Using a yeast two-hybrid screen, PME3, whose gene expression was increased during infestation, was identified as interacting with a cellulose-binding protein (CBP) secreted by *H. schachtii* (Hewezi *et al.* 2008). Results obtained using transgenic lines suggest that PME3 could be recruited by CBP to modify the plant cell wall, thus helping cyst nematode parasitism. However, this is unlikely to be the whole mechanism for parasitism success. Similarly, a so-called “welcoming program”, characterized by huge cell reorganizations and by the formation of root hairs, has been related to the facilitation of the intercellular progression of infection threads or hyphae during the initiation of endosymbiotic interactions (van Brussel *et al.* 1992; Bonfante, 2001; Hause and Fester, 2004). For instance, during legume-*Rhizobium* or arbuscular mycorrhizal fungus symbioses, several plant HGMEs were involved in the early stages of the interaction (Lohar *et al.* 2006; Oldroyd *et al.* 2011). Four

Tableau 11 Biochemical implication of HG-modifying enzymes (PMEs, PAEs, PLLs) and their inhibitor proteins (PMEIs, PGIPs, PNLIP) in plant resistance against bioaggressors

Piercing-sucking insects (yellow box), chewing insects (turquoise), bacteria (black), fungi (light gray) and viruses (red). Bolded species names indicate necrotrophic pathogens.

Gene name	Utilization	Stress		Induction	References
Pectin methylation and PME activity					
Sorghum bicolor (Sorgho) DM of pectin		Aphid	*Schzaphis graminum*	Resistant variety has higher methylated pectins than the suceptible	Dreyer & Campbell 1984
Phaseolus vulgaris (Bean) DM of pectin	near-isogenic lines	Fungus	*Collectotrichum lindemuthianum*	Resistant line has higher methylated pectins than the suceptible	Boudart *et al*. 1998
Solanum tuberosum cv Bintje or ADG (Potato) DM of pectin		Bacterium	***Pectobacterium carotovorum***	Resistant genotype (ADG) has higher methylated pectins than the susceptible genotype (Bintje)	Marty *et al*. 1997
Potato DM of pectin	somatic hybrid of 3 cv (Record, Estima, Katahdin)	Bacterium	***Pectobacterium carotovorum***	Resistant genotype has higher methylated pectins than the susceptible genotype	McMillan *et al* 1993
Lycopersicum esculentum (Tomato) DM of pectin	(Hawaii7996, Wva700)	Bacterium	***Ralstonia solanacearum***	Resistant genotype (Hawaii7996) has higher methylated pectins than the susceptible genotype (Wva700)	Wydra *et al* 2006
Nicotiana attenuata (Tobacco) *PME activity*	WT	Chewing insect	*Manduca sexta* OS	Leaf wounded with a pattern wheel; 20 uL of diluted insect OS applied; PME activity increased (29%) 30 min after OS applied	Von Dahl *et al.* 2006
N. tabacum (Tobacco) *PME*		Virus	TMV	PME specifically recognized the TMV-MP (movement protein)	Dorokhov *et al.* 1999
N. tabacum cv. Turk (Tobacco) *PME*		Virus	TMV	Mutant TMV without MP proteins cannot link to tobacco PME (no lesions on leaves after TMV mutant infection)	Chen *et al.* 2000
N. tabacum cv. Samsun (Tobacco) *PME activity*	ProPME	Virus	TMV	PME activity increased>resistance increased (size of leaf necrosis and short & long distance transport decreased)	Gasanova *et al.* 2008
N. tabacum cv. Turk (Tobacco) *PME activity*	antisense suppression	Virus	TMV	PME activity decreased>symptome appearence delayed (5 to 12 times slower in the antisense line than in WT)	Chen & Citovsky 2003
AtPME3	*pme3* KO At3g14310	Fungus	***Botrytis cinerea***	PME activity decreased>DM decreased>resistance decreased	Raiola *et al.* 2011
AtPME3	*pme3* KO At3g14310	Bacterium	***Pectobacterium carotovorum***	PME activity decreased>DM decreased>resistance decreased	Raiola *et al.* 2011
Fragaria vesca (Wild strawberry) *PME activity*	*overexpression line (FaPE1)*	Fungus	***Botrytis cinerea***	OGA with low DM>resistance increased	Osorio *et al.* 2008
Pectin acetylation					
DA of pectin	mutant *rwa2* *(with 20% decreased acetylester content)*	Fungus	***Botrytis cinerea***	Pectin acetylation decreased > resistance increased	Manabe *et al*. 2011
DA of pectin	chemical acetylation	Fungus	*Blumeria graminis*	OGA with high DA > resistance increased	Randoux *et al*. 2010
Pectate Lyase-Like (PLL)					
AtPMR6	At3g54920	Fungus	*Erysiphe cichoracearum*	10^8 colony-forming units/mL; 1, 2, 4 dpi confers resitance to *E. cichoracearum*	Vogel *et al*. 2002
Pectin Methyl Esterase Inhibitors (PMEIs)					
AtPMEI1 *ATPMEI2*	overexpression lines At1g48020 At3g17220	Fungus	***Botrytis cinerea***	ATPMEI increased>PME activity decreased>DM increased>resistance increased	Lionetti *et al.* 2007
Capsicum annuum (Pepper) *CaPMEI1*	Transgenic Pepper silences CaPMEI1	Bacterium	*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*	CaPMEI inhibited > susceptibility increased	An *et al*. 2008
Capsicum annuum (Pepper) *CaPMEI1*	Transgenic *A. thaliana* overexpresses CaPME	Bacterium	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*	CaPMEI overexpressed > resistance increased, but no resistance to the biotrophic fungus *Hyaloperonospora parasitica*	An *et al*. 2008
Actinidia chinensis (Kiwi) *AcPMEI*	Transgenic wheat expresses AcPMEI	Fungus	***Fusarium graminearum***	AcPMEI expression >PME activity decreased>DM increased>resistance increased	Volpi *et al*. 2011
Actinidia chinensis (Kiwi) *AcPMEI*	Transgenic wheat expresses AcPMEI	Fungus	***Bipolaris sorokiniana***	AcPMEI expression >PME activity decreased>DM increased>resistance increased	Volpi *et al*. 2011
Polygalactuonase-Inhibitor Proteins (PGIPs)					
AtPGIP1	Antisense suppression	Fungus	***Botrytis cinerea***	AtPGIP1 increased > resistance increased	Ferrari *et al*. 2006
Brassica rapa (Chinese cabbage) PGIP	overexpression lines	Bacterium	***Pectobacterium carotovorum***	BrPGIP2 overexpressed > resistance increased	Hwang *et al*. 2010
Lycopersicum esculentum (Tomato) pPGIP	expression of a pear PGIP	Fungus	***Botrytis cinerea***	pPGIP increased > resistance increased (*B. cinerea* endo-PGs inhibited)	Powell *et al*. 2000
Vitis vinifera (Grape) VvPGIP1	overexpression lines	Fungus	***Botrytis cinerea***	VvPGIP1 increased > resistance increased (BcPG1 inhibited)	Joubert *et al*. 2006
Vitis vinifera (Grape) pPGIP	expression of a pear PGIP	Fungus	***Botrytis cinerea***	pPGIP increased > resistance increased	Aguero *et al*. 2005
AtPGIP1, AtPGIP2	overexpression lines	Fungus	***Botrytis cinerea***	AtPGIPs increased > resistance increased	Ferrari *et al*. 2003
Phaseolus vulgaris (Bean) PvPGIP2	overexpression lines	Fungus	***Botrytis cinerea***	PvPGIP2 increased > resistance increased (BcPG1 inhibited)	Manfredini *et al*. 2005
Phaseolus vulgaris (Bean) PvPGIP2		Fungus	***Fusarium moniliforme***	PvPGIP2 inhibits FmPG	Federeci *et al*. 2001
Phaseolus vulgaris (Bean) PvPGIP		Fungus	*Aspergillus niger*	PvPGIP inhibits AnPG (EndoPGII)	King *et al*. 2002
Phaseolus vulgaris (Bean) PvPGIP2		Fungus	***Botrytis cinerea***	PvPGIP2 increased > resistance increased (BcPG1 inhibited)	Sicilia *et al*. 2005
Pectin Lyase Inhibitor Protein (PNLIP)					
Beta vulgaris (Sugar beet) *PNLIP*	PNLIP	Fungus	***Rhizoctonia solani***	Barley-grain inoculum applied for 2 weeks at 25°C PNLIP activity higher in rotted tissues than in healthy	Bugbee *et al.* 1993

PG genes and one PLL gene were overexpressed in *Medicago truncatula* - *Rhizobium meliloti* interactions, while in *Medicago sativa* one PG was specifically localized in the cell wall of nodule primordia and invasion zones from 1 hour to 2 days post-inoculation (Muñoz *et al.* 1998; Lohar *et al.* 2006). Using mutant plants, a PL from *Lotus japonicus* appears essential for the proper initiation of *Rhizobium trifolii* infection (Xie *et al.* 2012). Moreover, *in-situ* localization showed that PMEs could contribute to the development of new vascular tissues during rhizobial infection (Lievens *et al.* 2002). This is consistent with the analysis of microarray data sets, showing that *M. truncatula* PGs, PLLs and PMEs are overexpressed 28 days after inoculation with *Glomus* sp. (Hohnjec *et al.* 2005) and that PG activity is localized in the cell wall of lateral root primordia (Peretto *et al.* 1995). The specific case of parasitic plants is of interest as, like host plants, they secrete their own HGMEs to facilitate their penetration into the host plant root cortex. For instance, *Orobanche* sp. secretes PMEs and their activity is correlated with the localization of low esterified HG in the cell wall and the middle lamella at the site of contact between host and parasitic cells (Ben-Hod *et al.* 1993; Losner-Goshen *et al.* 1998). This plant-plant interaction raises fascinating questions concerning the roles and specificity of host and parasite HGMEs. In particular, the study of the potential inhibition of parasitic plant PMEs by host plant PMEIs would be of great interest.

Host plant HGMEs are thus largely involved during the establishment of the feeding structures of bioaggressors, both to facilitate their intrusion and to restrict their excessive spreading. Their role in the fine-tuning of cell wall remodeling in favor of parasitic success at an early stage suggests that HGME activity has been diverted during a co-evolution process. Virulence factors of bioaggressors that target plant protein involved in defense responses, and the binding of exogeneous protein to some plant PMEs, appear as examples. Reported for plant-nematode interactions, this targeting has previously been highlighted for plant-virus interactions. The movement protein (MP) of the Tobacco Mosaic Virus (TMV), which can be transmitted by piercing-sucking insects, interacts with a PME purified from tobacco leaves and this interaction is required for TMV cell-to-cell movement in the host plant (Dorokhov *et al.* 1999; Chen *et al.* 2000). The reduction of total PME activity, using antisense suppression of the expression of one PME or the overexpression of a characterized PMEI, led to the delayed systemic movement of TMV (Chen and Citovsky, 2003). In the meantime, using transgenic plants overexpressing PME, an inverse correlation between PME activity and TMV lesion sizes has been demonstrated (Gasanova *et al.* 2008). In this respect, the common hypothesis that plant HGMEs play a role in plant resistance by mediating cell wall strengthening or producing endogenous elicitors is probably too simplistic.

3.3. Roles of HGMEs in structural resistance

The cell wall represents an impenetrable physical barrier with constitutive rigidity to fend off bioaggressor attacks (Vallarino and Osorio, 2012). A high DM of HG has been correlated to genotype resistance to the aphid *Schizaphis graminum*, the biotrophic fungus *Colletotrichum lindemuthianum* and the necrotrophic bacterium *Ralstonia solanacearum* (**Table 11**) (Dreyer and Campbell, 1984; Boudart *et al.* 1998; Wydra and Beri, 2006). This could be related to changes in cell wall elasticity and mechanics. As shown during organ initiation (Peaucelle *et al.* 2011*a*), the lowest wall elasticity is correlated to the highest DM. Furthermore, a high constitutive DM of

pectin was structurally related to the borate-RGII cross-link in regulating cell wall stiffness (Ishii and Matsunaga, 2001). As such, plant resistance to the necrotrophic bacterium *Pectobacterium carotovorum* is associated with a high DM of pectin in wild potato plants (McMillan *et al.* 1993; Marty *et al.* 1997) and in the *pme3* mutant of *A. thaliana* (Raiola *et al.* 2011). The enhanced DM level obtained by mutation of *PMEs* or by overexpression of *PMEI*s *in planta* increased the resistance of dicotyledonous and monocotyledonous species to biotrophic or necrotrophic pathogens, but not to the full range of pathogens for each plant (**Table 11**) (Raïola *et al.* 2011; An *et al*. 2008; Volpi *et al*. 2011; Lionetti *et al*. 2007). Furthermore, *in vitro*, the hydrolysis of plant pectin by endo-PGs from several necrotrophic pathogens is decreased when pectins of high DM are used as carbon sources (Bonnin *et al.* 2002). The resistance observed could therefore be related to a decrease in the number of specific substrates for endogenous PGs, as well as the physical or chemical properties of pectins, such as the isoform pattern of HGME activity or the amount of branched pectins. Using antisense tomato plants, the decrease in plant PG activity reduced, as expected, fruit softening and ripening but also increased tomato resistance against biotrophic or necrotrophic pathogens (Damasceno *et al.* 2011). Nevertheless, enhancing resistance through the modulation of the DM of HG is unlikely to be an easy strategy as it appears pathogen-specific. For instance, increased PME activity and the associated lower DM of pectins in transgenic strawberry overexpressing one PME enhanced fruit resistance to the necrotrophic fungus *B. cinerea* (Osorio *et al.* 2008). Understanding this opposite effect is complex as PME activity on HG can have two distinct consequences. On one hand, the linear activity of PME can give rise to blocks of free carboxyl groups that non-covalently interact with Ca^{2+} ions, conferring a gel-like structure and cell wall strengthening (Morris *et al.* 1982; Micheli, 2001). On the other hand, random PME activity promotes the action of pectin depolymerases (endo-PG or lyase activities) increasing both cell wall loosening and porosity and producing OGs that elicit plant defense responses (Baron-Epel *et al.* 1988; Ehwald *et al.* 1992). Thus, in transgenic plants with modified HGME activity, either the direct or the indirect effect on HG structure could play a role in plant resistance. For example, constitutive gene expression of antimicrobial proteins (*PR5*) in transgenic strawberry overexpressing one PME enhanced basal resistance to *B. cinerea*, while a decrease in their level (PR1 and PR10) in *PMEI1*-silenced pepper conferred decreased basal resistance to the biotrophic bacterium *Xanthomonas campestris* (Osorio *et al.* 2008; An *et al.* 2008). Among PMEs, some (At1g11580) that have a Ribosome-inactivating protein (RIP) activity might be considered antimicrobial proteins themselves. RIPs are known to be involved in plant defense against viruses (De-la-Peña *et al.* 2008). Resistance to the fungus *Puccinia graminis* was associated with a random distribution of the methylesters of HGs in the near-isogenic resistant line as compared with a more blockwise distribution in the susceptible cultivar (Wiethölter *et al.* 2003). The degree of acetylation of pectins is likely to play an important role in plant resistance too. While the Arabidopsis mutant *reduced cell wall acetylation rwa2* was more resistant against the necrotrophic fungus *B. cinerea*, it was susceptible to the biotrophic fungus *Golovinomyces cichoracearum*. The “antagonistic responses” to these pathogens are consistent with the two distinct plant defense pathways induced (jasmonic acid/ethylene, JA/ET, *vs*. salicylic acid, SA). All these results suggest an indirect link between cell wall-related basal structural resistance and inducible plant defenses. The mutation of the plant putative pectate lyase PMR6 (*POWDERY MILDEW RESISTANT 6*), required for the virulence of *Erysiphe* sp. increased the content and DM of pectin as well as plant

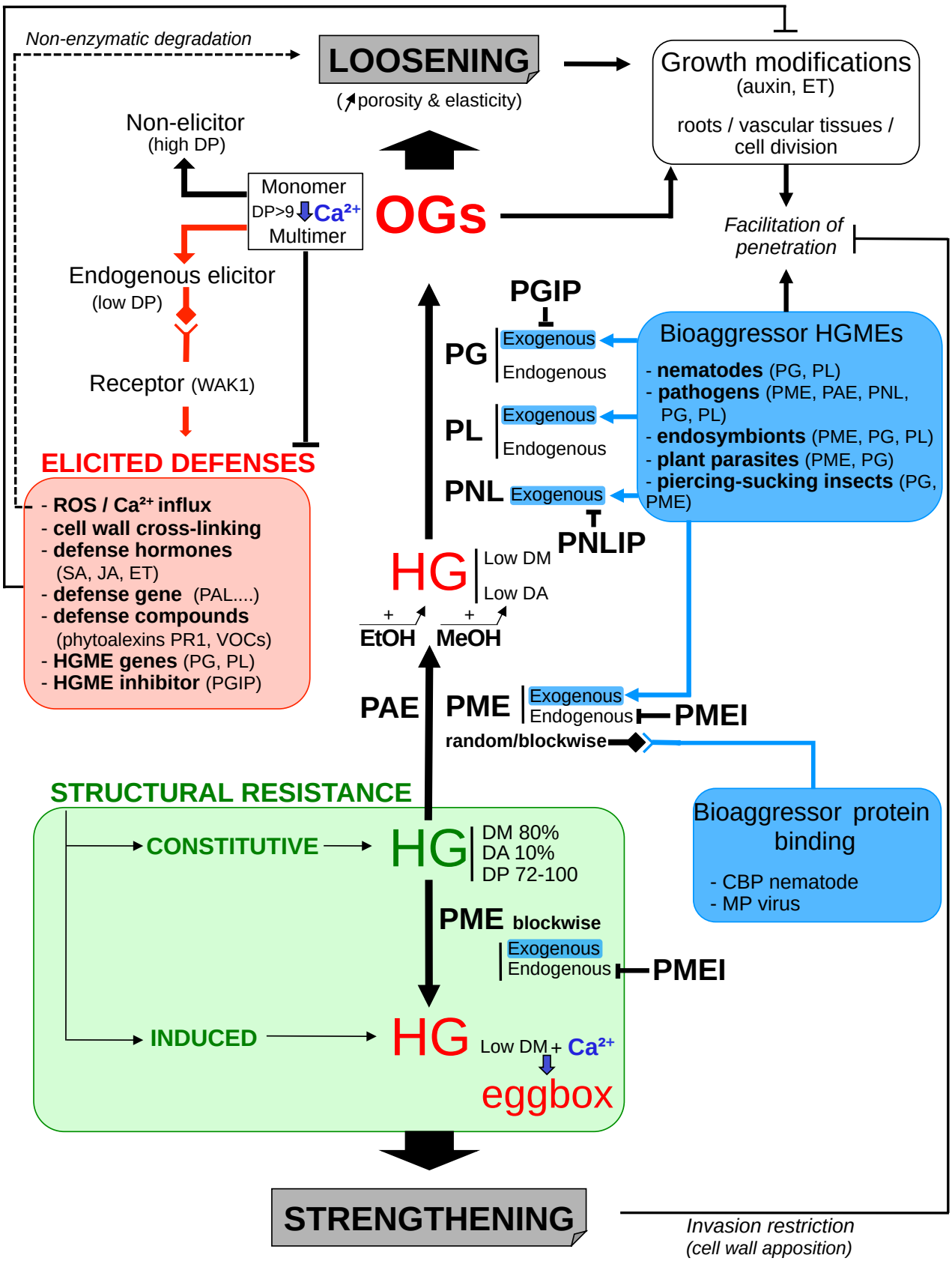
resistance but surprisingly did not change either fungus penetration success or SA and JA/ET-dependent defense responses. Similar results were obtained using *pmr5* mutant; *PMR5* encodes a protein of unknown function required for pectin production and is likely to be targeted to the endoplasmic reticulum/secretory pathway. These results suggest non-elicitor OG production, highlighting the dual role of HGMEs in the control of cell wall stiffness during plant bioaggressor interactions. Finally, since HGME activities result in direct (strengthening) or indirect (OG elicitor production) resistance, they appear good candidates for virulent factor targeting.

3.4. HGMEs are involved in induced resistance against biotic stresses

The role of HGMEs in the production of endogenous elicitors during plant-bioaggressor interactions has been indirectly shown through the induction of all the main known plant defense responses following application of purified OGs, end-products of HGMEs. Indeed, within early signaling events, OGs induce H^+ and Ca^{2+} influx, K^+ efflux, membrane depolarization, extracellular medium alkalinization (Mathieu *et al.* 1991), protein phosphorylation/dephosphorylation, mitogen-actived protein kinase (MAPK) cascades, GTP-binding protein, and reactive oxygen species (ROS) production (H_2O_2, O_2^-) (Shibuya and Minami, 2001; Vallarino and Osorio, 2012). They also induce the expression of defense genes encoding proteins involved in i) defense protein accumulation such as protease inhibitors, pathogenesis-related proteins (PRs) or polygalacturonase-inhibitor proteins (PGIPs), ii) SA and JA/ET biosynthesis and signaling, iii) biosynthesis of defensive secondary metabolites like phytoalexins, or iv) plant cell wall reinforcement (Shibuya and Minami, 2001) (**Figure 33**). Some cell wall proteins were reported to be involved in cell wall strengthening and papilla formation (peroxidase, Hydroxyproline Rich Glyco-Protein, HRGP). Among HGMEs, only PG and PL were identified following elicitation by OGs. Wound-inducible PG activity was correlated to H_2O_2 production in most plants belonging to different families (Orozco-Cardenas and Ryan, 1999). Both responses were induced by OG treatment in tomato leaves (Orozco-Cardenas and Ryan, 1999), where *PG* gene expression and its corresponding activity were transiently increased (Bergey and Orozco-Cardenas, 1999). On the contrary, in Arabidopsis seedlings, a mixture of OGs (DP 9-16) did not change overall *PG* gene expression but repressed *PL-PMR6* expression (Denoux *et al.* 2008). These differences are probably related to the plant species as well as the type and concentrations of OGs used. In fact, several studies have shown that the ability of OGs to act as elicitors is dependent on their chemical structure (DP, DM and pattern of methylesterification, DA) (Ochoa-Villarreal *et al.* 2012). OGs with DP ranging from 1 to 20 are efficient elicitors (Côté and Hahn, 1994) (**Figure 33**). The treatment by flagellin, a Microbial Associated Molecular Pattern (MAMP) from bacteria, is mimicked by OGs in a range of DP from 9 to 16 to induce plant defenses including cell wall reinforcement (Denoux *et al.* 2008). The critical DP triggering plant elicitation is dependent on both the type of defense responses measured for a given plant and the type of plant species (Côté and Hahn, 1994). OGs with a high DA led to wheat resistance against the necrotrophic fungus *B. graminis* (Randoux *et al.* 2010) while fully methylated OGs failed to induce defense signaling in soybean (Navazio *et al.* 2002). This variability highlights the difficulty of unraveling the relationship between the structure and function of OGs. Furthermore, in adequate ionic conditions, the Ca^{2+}-egg box

conformation of OGs improves their biological activity (**Figure 33**). For example, dimeric and trimeric association of OGs induced a higher level of early and late defense responses in carrot (Messiaen *et al.* 1993). The ability of multimeric forms of OGs to elicit plant responses appears to depend on their maturation, which is likely to be necessary for their fixation on OG receptors (Cabrera *et al.* 2008). To date, Wall Associated Kinase 1 (WAK1), belonging to the WAKs gene family (5 in Arabidopsis), is the only receptor characterized for OG recognition inducing the defense signaling cascade (Wolf *et al.* 2012a) (**Figure 33**). Using chimeric proteins, the binding of OGs on its ectodomain was shown to activate specific plant defenses following recognition by an LRR-receptor kinase (EFR). Conversely, its intracellular kinase domain induced OG-specific plant defenses after treatment by the EFR specific elicitor (Brutus *et al.* 2010). Interestingly, OG monomers, dimers and trimers have been reported to be inhibitors of disease resistance reactions independently of the way they are produced (plant cell wall autolysis or pathogen CWDE digestion) (Messiaen *et al.* 1993; Moerschbacher *et al.* 1999) (**Figure 33**). As monomeric OGs inhibit phytoalexin accumulation (*i.e.* Phenylalanine Ammonia Lyase, PAL, activity) in carrot in contrast to the dimeric one (Messiaen *et al.* 1993), HGME activity associated with ionic cell status may be a way to regulate plant responses by modifying OG structure. In non-challenged plant, the difference in the rate of activity between intrinsic plant exo-PG and endo-PG that give rise to different OG structures (elicitors or not) supports a regulation of the balance between active/non-active OG forms by plant HGMEs during stress. Nevertheless, in plant-bioaggressor interactions, although the endogenous OG production is mostly described as being in favor of the plant, it may also benefit the bioaggressor. The combination of the action of both virulent microbes and plant HGMEs might suppress OGs with an eliciting function. PG, PL and PME are found in plants and in secretions of most bioaggressors (microbes, nematodes, insects) (Shen *et al.* 2003; 2005; Harmel *et al.* 2010; Sharma *et al.* 2013) (**Figure 33**). The types and distribution of HGMEs vary depending on the bioaggressor considered. For instance, among phytophagous insects, no HGME activity has been measured in chewing insects. In aphididae, PME activity has been detected in the saliva of all tested aphids except for *Sitobion avenae* while they all possess PG activity (Harmel *et al.* 2010). The differences in HGME content of bioaggressors, together with the activity of plant enzymes, may have an effect on the quantity and structure of OGs released, thus enhancing or inhibiting specific MAMPs or HAMPs (Herbivore Associated Molecular Patterns) plant defense responses (Felton and Tumlinson, 2008). While oxidative burst can be induced by OGs, ROS themselves (hydrogen peroxide) can give rise to a non-enzymatic OG production by oxidative break down of pectins (Miller, 1986; Fry, 1998) (**Figure 33**).

The aphid *Diuraphis noxia* induced massive H_2O_2 accumulation in resistance of wheat while this effect was not detectable in the *Brevicoryne brassicae* – Arabidopsis interaction (Moloi and van der Westhuizen, 2006; Kuśnierczyk *et al.* 2008). The observation of H_2O_2 accumulation in both compatible and incompatible interactions between the aphid *Macrosiphum euphorbiae* and tomatoes suggested that they might not have a preponderant role as enhancers of endogenous elicitor production (De Ilarduya *et al.* 2003). If the production of effective OGs is considered related to the balance between endogenous and exogenous HGME activities, specific regulators of HGMEs (PMEI, PGIP, PNLIP) have to be taken into account (**Table 11, Figure 33**). Among these protein inhibitors, at least one PGIP appears specifically directed to exogenous HGMEs and is used as a marker of the plant defense response. Plant PGIPs interact with PGs from


Non-enzymatic degradation
LOOSENING
(porosity & elasticity)
Growth modifications
(auxin, ET)
roots / vascular tissues / cell division
Non-elicitor
(high DP)
Monomer
DP>9 Ca2+
Multimer
OGs
Facilitation of penetration
Endogenous elicitor
(low DP)
Receptor (WAK1)
ELICITED DEFENSES
- ROS / Ca2+ influx
- cell wall cross-linking
- defense hormones (SA, JA, ET)
- defense gene (PAL....)
- defense compounds (phytoalexins PR1, VOCs)
- HGME genes (PG, PL)
- HGME inhibitor (PGIP)
PGIP
PG
Exogenous
Endogenous
PL
Exogenous
Endogenous
PNL
Exogenous
PNLIP
Bioaggressor HGMEs
- nematodes (PG, PL)
- pathogens (PME, PAE, PNL, PG, PL)
- endosymbionts (PME, PG, PL)
- plant parasites (PME, PG)
- piercing-sucking insects (PG, PME)
HG
Low DM
Low DA
EtOH
MeOH
PAE
PME
Exogenous
Endogenous
PMEI
random/blockwise
Bioaggressor protein binding
- CBP nematode
- MP virus
STRUCTURAL RESISTANCE
CONSTITUTIVE
HG
DM 80%
DA 10%
DP 72-100
PME blockwise
Exogenous
Endogenous
PMEI
INDUCED
HG
Low DM + Ca2+
eggbox
STRENGTHENING
Invasion restriction
(cell wall apposition)

various bioaggressors such as bacteria, fungus, and phytophagous insects (Albersheim and Anderson, 1971; D'Ovidio *et al.* 2004; Schacht *et al.* 2011) but are unlikely to target plant PGs (Cervone *et al.* 1990; Federici *et al.* 2001). PGIPs from different plant species can reduce PG activity from distinct pathogen species (**Table 11**) and one single PGIP can inhibit different fungal PGs; the PGIP2 of common bean inhibits *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger* and *B. cinerea* PGs (Federici *et al.* 2001; King *et al.* 2002; Sicilia *et al.* 2005). The expression of a pea PGIP gene was induced during pea defense against the cyst nematode *Heterodera goettingiana*; none of the PGs from the nematode was shown to interact with the plant PGIP (Veronico *et al.* 2011). Results concerning potential pectin lyase inhibitor protein (PNLIP) are rather scarce. A PNLIP from sugar beet (*Beta vulgaris*) was shown to inhibit fungal pectin lyases from *Rhizoctonia solani*, *Phoma betae* and *Aspergillus japonicus*, but information about the inhibitor structure and regulation in plants is so far lacking (**Table 11**) (Bugbee, 1993; Juge, 2006). Plant PMEIs, which only target plant PMEs, could however play a role in resistance to pathogen by targeting specific plant PME isoforms thus modulating the structure of pectins (Lionetti *et al.* 2007).

Figure 33 Involvement of HGMEs in plant defense responses to biotic stresses

Homogalacturonans (HGs) embedded in the cell wall after their synthesis in the Golgi apparatus with a high degree of polymerization (DP, minimum 72-100 galacturonic acid residues; Thibault *et al.* 1993) are *O*-acetylated (with a degree of acetylation (DA) of about 10%; Ralet *et al.* 2005), and highly methylated (with a degree of methylesterification (DM) of about 80%; O'Neill and Albersheim, 1990). Depending on the stress and growth states, these HGs will be demethylesterified by pectin methylesterases (PMEs) and/or deacetylated by pectin acetyl esterases (PAEs), both enzyme activities being associated with the release of volatile compounds methanol and ethanol, respectively. Depending on the cell wall properties, PMEs can act linearly, giving rise to blocks of free carboxyl groups that interact with bivalent ions (Ca^{2+}) and contributing to cell wall strengthening (*green frame*), or can act randomly, promoting the action of downstream cell wall hydrolases (polygalacturonases PGs, pectate lyases PLs) and then contributing to cell wall loosening (Micheli, 2001). Cell wall strengthening restricts bioaggressor progression while cell wall loosening may facilitate their penetration. The various bioaggressors (*blue frames*) that attempt to breach the plant cell wall release their own HGMEs (exogenous), including pectin lyases (PNLs), that could amplify or compete with the hydrolysis by plant HGMEs (endogenous). Consequently, following the activity of plant and bioaggressor hydrolases, small HG fragments called oligogalacturonides (OGs) are released. Most of these enzymes (plant PMEs or bioaggressor PGs, PNLs) could be modulated by PME, PG or PNL inhibitors (PMEIs, PGIPs, PNLIPs). Depending on their DP and the amount of free Ca^{2+}, the OG monomers obtained can form multimers with an egg box conformation (Cabrera *et al.* 2008) and/or can act as endogenous elicitors. After OG recognition by a specific receptor (Wall Associated Kinase 1, WAK1; Brutus *et al.* 2010), various defense responses (*red frame*) are induced against the bioaggressor (Ridley *et al.* 2001) and could interact with growth modifications. Among them, ROS production (hydrogen peroxide) can contribute to cell wall loosening with a non-enzymatic degradation of cell wall polysaccharides including HG (OG production; Miller, 1986; Fry, 1998). Plant PMEs also appear to act more directly during an interaction with some bioaggressors as they (*bottom blue frame*) specifically bind to a virus movement protein (MP; Chen *et al.* 2000) or a nematode cellulose-binding protein (CBP; Hewezi *et al.* 2008).

Plant HGMEs are involved in the emission of two volatile organic compounds (VOCs), methanol (MeOH) and ethanol (EtOH) (Yadav *et al.* 2009), released by PME and PAE activity, respectively (**Figure 33**). PME-mediated pectin remodeling appears to be the main methanol producer while ethanol is mostly attributed to fermentive reactions of glucose (Fall, 1998; Seco *et al.* 2007). Among the huge range of VOCs produced during plant defense responses, an increase in methanol emissions has been measured after wounding (Dorokhov *et al.* 2012*a*) and feeding by herbivore caterpillars (Peñuelas *et al.* 2005; Körner *et al.* 2009). In tobacco leaves, rapid and sustained emission of methanol was observed after *Manduca sexta* wounding, and was enhanced in the presence of caterpillar oral secretions, due to both up-regulation of gene expression and activity of plant PMEs and a decrease in the DM of pectins (Dahl *et al.* 2006). The role of methanol in induced plant resistance appears dual. It may either diffuse as a signal or be catabolized into compounds that might be used in plant defense. First converted by a putative methanol oxidase into formaldehyde, a lethal compound, it is quickly bound to a nucleophile such as glutathione (s-formylglutathione), turned into formate and used as a carbon source incorporated into plant one carbon metabolism (C1 folate pool) or the Calvin-Benson cycle (CO_2) (Gout *et al.* 2000; Achkor *et al.* 2003; Wojtasik *et al.* 2011). Ethanol may also be oxidized into acetyl coenzyme A via alcohol dehydrogenases involved in primary metabolism (Leblová *et al.* 1977). In Arabidopsis, glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, known as S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR), plays a key role in regulating nitric oxide and S-nitrosoglutathione levels as well as being a signal in systemic resistance against pathogens (Martínez *et al.* 1996; Rustérucci *et al.* 2007). As nitric oxide and S-nitrosothiols are signaling molecules that regulate immunity, methanol release by PMEs seems to act as a quantitative signal during plant herbivore interactions. Silencing the endogenous PME gene suppressed methanol release and led to reduced accumulation of PGIP involved in tobacco leaf resistance against *M. sexta* (Körner *et al.* 2009). While wounding regulated the GSNOR gene, the direct effect of methanol on its regulation is still not clear (Downie *et al.* 2004). For instance, several methanol-inducible genes were identified, some of which are known to encode proteins involved in plant resistance, especially in antibacterial resistance, virus spreading (Dorokhov *et al.* 2012*a*) or anthocyanin and flavonoid content (Downie *et al.* 2004). PME-mediated MeOH production was recently shown to act as a cross-kingdom signal (Dorokhov *et al.* 2012*b*). Indeed, in mice, some methanol-inducible genes are involved in their preference for methanol sources such as wounded leaves. As caterpillar oral secretions increased VOC emission, which is known to attract predators or parasitoids against insects or nematodes (Kahl *et al.* 2000; Heil, 2008), as well as MeOH (Dahl *et al.* 2006), PME appears to play a role in both indirect (VOCs) and direct plant defenses (signal/elicitor producer).

4. Le modèle d'étude

Après avoir décrit quelques éléments d'intérêt de la biologie d'*A. thaliana*, nous aborderons les notions de variations entre accessions naturelles, notamment entre les deux accessions WS et Col, puisque c'est à partir de celles-ci que les plantes mutantes que nous utiliserons ont été créées.

4.1. La plante

4.1.1. Un outil pour les études de génomiques fonctionnelles

Arabidopsis thaliana (L.) Heyhn ou « Arabette des Dames » est une plante herbacée annuelle (30-40 cm à l'âge adulte), dicotylédone, appartenant à la famille des Brassicaceae. Elle est très utilisée pour étudier l'effet de stress sur une plante, notamment en ce qui concerne les interactions plante-puceron (Louis 2012 ; Louis & Shah 2013). *A. thaliana* a le plus petit génome végétal connu. Son génome diploïde (2n = 10) relativement petit, 125 millions de bases répartis sur 5 chromosomes, fût le premier génome de plante entièrement séquencé en 2000 (Arabidopsis Genome Initiative 2000) ce qui a permis le développement de nombreux outils génétiques et bioinformatiques et a placé la plante parmi les modèles végétaux les plus populaires (4176 publications répertoriées sur PubMed en 2012). Depuis novembre 2010, la version 10 de l'annotation du génome d'*A. thaliana* est disponible sur le site internet « The Arabidopsis Information Resource » (TAIR ; http://www.arabidopsis.org). La version TAIR10 du génome indique 27416 gènes codant des protéines (Lamesch *et al.* 2012). Cette annotation est particulièrement utile pour l'analyse des résultats de puces à ADN (« *microarrays* »). Par ailleurs, sa petite taille, son cycle de développement court (8 semaines environ de la germination à l'obtention de graines matures) et sa capacité à s'autoféconder rendent sa culture facile en laboratoire.

A. thaliana est aussi utilisée comme organisme de référence pour la recherche végétale fondamentale et appliquée ainsi que dans le domaine de l'évolution et la génétique. L'utilisation de plantes mutantes d'*A. thaliana* a commencé dans les années 1950 (Langridge 1958) et l'obtention de mutants homozygotes par insertion d'un ADN de transfert (ADN-T) à l'aide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* est devenue très courante (Alonso *et al.* 2003a). De larges collections de mutants ont été créées, avec un fond génétique Col-0 comme dans la collection SALK élaborée aux USA (La Jolla) contenant 48329 lignées d'insertion représentant 27034 gènes (http://signal.salk.edu) ou un fond génétique WS comme la collection FLAG élaborée en France (Versailles) contenant 54915 lignées d'insertion (http://138.102.70.6). *A. thaliana* représente un bon modèle d'étude pour les recherches menées sur la paroi végétale (Liepman *et al.* 2010). Environ 10 % du génome d'*A. thaliana*, soit environ 2500 gènes, sont impliqués dans différents aspects du métabolisme de la paroi végétale, comme la biosynthèse des polymères, le transport, le dépôt, le remodelage, le recyclage et la régulation de ces processus (McCann & Carpita 2008). L'utilisation de mutants constitue un puissant outil pour caractériser la fonction de composantes pariétales (Reiter *et al.* 1997).

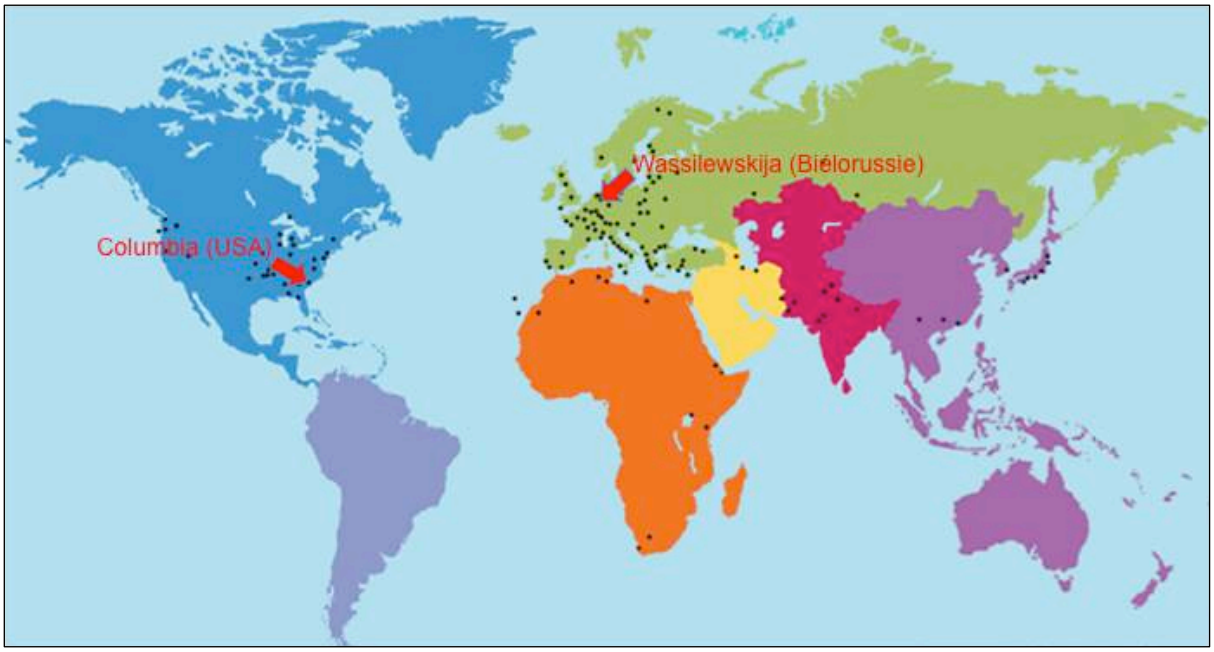


Figure 34 Distribution mondiale des principaux écotypes d'*Arabidopsis thaliana*

Les deux écotypes étudiés sont indiqués : Col-0 (Columbia, USA) et WS-0 (Wassilewskija, Biélorussie). D'après http://www.arabidopsis.org

Outre le laboratoire, cette espèce originaire d'Asie centrale a aujourd'hui colonisé la plupart des régions tempérées de l'Eurasie et plus récemment l'Amérique du Nord (**Figure 34**). Sa dispersion a abouti à une grande diversité d'écotypes naturels, nommés selon le lieu où ils ont été récoltés et dont les semences sont disponibles dans des banques de ressources génétiques végétales (*Versailles Arabidopsis Stock Center* VASC, A*rabidopsis Biological Ressource Center* ABRC ou *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* NASC). Le VASC regroupe par exemple les graines de plus de 600 écotypes. Si le génome *A. thaliana* de référence est aujourd'hui celui de l'écotype Columbia-0 (Col-0), le séquençage du génome complet de 1001 autres lignées est actuellement en cours afin d'appréhender la variabilité génétique naturelle de cette espèce (Weigel & Mott 2009).

4.1.2. Variations entre accessions naturelles

Les accessions naturelles d'*A. thaliana* ont été nommées auparavant « écotypes ». Même si beaucoup de collections d'accessions naturelles ne rentrent pas dans la définition stricte d'un écotype, elles sont communément appelées écotypes. La définition de Gregor *et al.* (1936) d'un écotype est celle encore admise de nos jours (Lowry 2012), comme étant « une population distinguable par des caractéristiques physiologiques et morphologiques, le plus souvent de nature quantitative ; interfécond avec d'autres écotypes mais ne pouvant pas échanger des gènes à cause des barrières écologiques ». Le terme neutre accession est donc préférable, ce qui signifie simplement qu'un identifiant unique lui a été assigné dans une collection (Alonso-Blanco & Koornneef 2000 ; Weigel 2012). Plus de 7000 accessions ont été collectées et sont disponibles dans les différentes banques (Weigel 2012). Parmi ces accessions, WS provient de Wassilewskija en Biélorussie (longitude 27,6 ; latitude 53,9) et Col provient de Columbia (USA, longitude 92,3 ; latitude 38,3) (**Figure 34**).

Parallèlement aux différences de localisation, les accessions présentent des variations en termes de forme (des feuilles, etc.), de développement (pilosité, etc.) et de physiologie (durées de dormance et de floraison, résistance aux maladies). De nombreuses études ont été réalisées afin de mettre en évidence des différences de réponses à l'environnement et des différences d'évolution des traits morphologiques. Concernant les interactions plante-insecte, une étude a déjà été menée pour comparer la susceptibilité/résistance de 82 accessions d'*A. thaliana* au puceron *M. persicae*, en étudiant l'effet antibiose observé suite à 24 h d'infestation (Cabrera y Poch *et al.* 1998). Des différences de teneurs en glucosinolates (GLS) ont été mises en évidence chez 39 écotypes (Kliebenstein *et al.* 2001) et des différences en produits issus du système GLS-myrosinase ont été observées chez 122 écotypes (Lambrix *et al.* 2001).

Nous comparerons donc les écotypes WS et Col dans leur réponse aux aphides, d'autant que les mutants PME et PMEI caractérisés au laboratoire sont issus de ces deux écotypes.

4.1.3. Choix des gènes étudiés

Parmi les 66 isoformes et les 15 gènes caractérisés de PME chez *A. thaliana* (**Tableau 3**), seule la PME3 semble intervenir dans la réponse de la plante aux stress biotiques. Nous savions au début du projet de thèse que cette PME accroît la susceptibilité d'*A. thaliana* au nématode *Heterodera schachtii*, en se liant spécifiquement à un effecteur (*Cellulose Binding Protein*) présent dans les excrétions orales du nématode (Hewezi *et al.* 2008). De plus, les transcrits codant cette protéine étaient surexprimés notamment suite à une infestation par le champignon nécrotrophe *Alternaria alternata* (Narusaka *et al.* 2005), le *Turnip mosaic virus* (TuMV, Yang *et al.* 2007). L'étude de la séquence promotrice du gène *PME3* au laboratoire avait permis de localiser le promoteur du gène principalement dans les feuilles jeunes et matures, les tiges et racines, avec une activité promotrice au niveau du phloème, prisé par les phloémophages (Guénin *et al.* 2011). Cette PME3 pourrait donc intervenir directement dans les interactions plante-puceron. Par la suite, en 2011, il a été démontré que le mutant *knock-out* (KO) *pme3*, présente aussi un DM des HG 40 % plus élevé, montre une résistance au champignon nécrotrophe *B. cinerea* et à la bactérie nécrotrophe *Pectobacterium carotovorum* plus élevée que la plante sauvage Col-0 (Raiola *et al.* 2011). De même, la PME17, non caractérisée, semblait aussi impliquée dans les interactions plante-insectes phloémophages, le gène codant cette protéine étant surexprimé suite à une infestation par l'aleurode *Bemisia tabaci* (Kempema *et al.* 2007), les pucerons *B. brassicae* (Kuśnierczyk *et al.* 2008) et *M. persicae* (Couldridge *et al.* 2007). D'ailleurs, il a été montré récemment que ce gène est aussi surexprimé suite à de nombreux autres stress biotiques (Lionetti *et al.* 2012). Ce gène *PME17* est exprimé dans les feuilles plutôt sénescentes, la partie basale de la tige, la paroi des carpelles et jeunes siliques et dans les cellules épidermiques racinaires (www.bar.utoronto.ca).
Afin d'envisager leur régulation, parmi les 69 gènes codant des PMEI/CIF (inhibiteurs d'invertase) chez *A. thaliana* et les 6 caractérisés (**Tableau 5**), seul *PMEI4* était disponible au laboratoire alors que seuls *PMEI1* et *PMEI2* étaient définis pour avoir un rôle dans la réponse de la plante aux stress biotiques.

4.2. Les pucerons

Les pucerons sont des arthropodes appartenant à la classe des Insectes, ordre des Hémiptères, sous-ordre des Sternorrhynques et famille des Aphididae, dont la base de diversification date du Crétacé (80-150 Ma) (Dohlen & Moran 2000), de façon concomitante avec la radiation des Angiospermes (Friis *et al.* 2006). Parmi les plusieurs millions d'espèces d'insectes, la famille des Aphididae constitue un petit groupe d'environ 4500 espèces dans le monde, dont environ 600 espèces sont en France (Blackman & Eastop 2000 ; Bonnemain 2010). Au sein de la famille des Aphididae, sous-famille Aphidinae, on distingue deux tribus : les Aphidini et les Macrosiphini, auxquelles appartiennent les trois espèces étudiées. Il s'agit du puceron noir de la fève *Aphis fabae* (Scopoli) appartenant à la première tribu, du puceron du pêcher *Myzus persicae* (Sulzer) et du puceron cendré du chou *Brevicoryne brassicae* (L.) appartenant à la seconde. Outre la différence de tribus, ces pucerons peuvent se distinguer au niveau de leur cycle de vie.

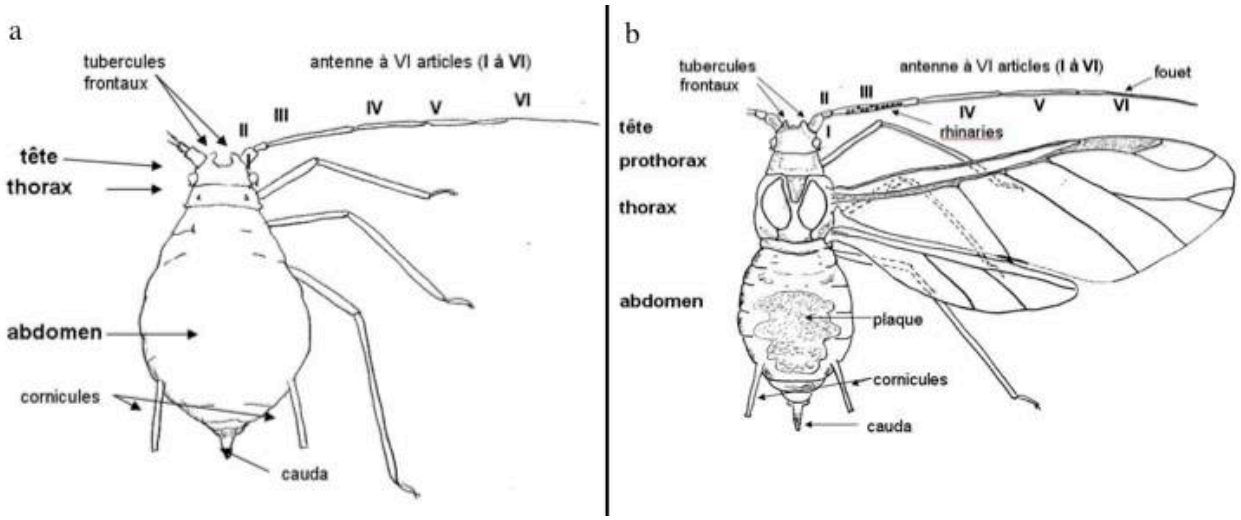


Figure 35 Représentation schématique de la morphologie d'un puceron (a) aptère ou (b) ailé
Source : http://www7.inra.fr/encyclopedie_pucerons/les_pucerons/morphologie

4.2.1. Cycle de vie

Le cycle de vie des pucerons témoigne de l'étonnante plasticité adaptative de ce groupe d'insectes, caractère qui contribue de manière considérable à leur succès en tant que ravageurs de plantes. L'une des caractéristiques originales des pucerons est leur capacité à produire, dans une même colonie, des individus ailés et des individus non ailés (aptères) qui ont strictement le même génome et accomplissent des fonctions écologiques différentes (dispersion à grande distance pour les premiers, exploitation *in situ* des hôtes disponibles pour les seconds). On parle de polyphénisme de dispersion, la forme aptère étant la forme dominante. Ce caractère est sous la dépendance de divers facteurs comme l'effet de groupe, l'état physiologique de la plante, la température ou les caractéristiques génétiques de la lignée parthénogénétique (clone) considérée (Sutherland 1969 ; Simon *et al.* 2007). Tous les embryons présentent des ébauches d'aile, qu'ils se développent en adultes ailés ou aptères (Johnson & Birks 1960). Les deux formes de puceron ont une taille généralement comprise entre 1 et 3,5 mm de long (Blackman & Eastop 2000). *M. persicae* est un puceron de petite taille (aptères et ailés : 1,2 à 2,1 mm), *B. brassicae* est de taille moyenne (aptères : 1,6 à 2,6 mm ; ailés : 1,6 à 2,8 mm), tout comme *A. fabae* (aptères : 1,5 à 3,1 cm ; ailés : 1,3 à 2,6 cm). En annexe 2 sont présentées des photographies des deux formes, aptère et ailée, de toutes les espèces étudiées.

En dehors de la présence d'ailes, les deux formes possèdent des critères morphologiques communs (**Figure 35**). La tête comporte une paire d'antennes découpées en 5 ou 6 articles pouvant percevoir des odeurs comme les composés organiques volatiles (VOC), des yeux composés et un rostre, l'organe nourricier. Le thorax porte trois paires de pattes fines et chez les formes ailées deux paires d'ailes repliées au repos au dessus du thorax. L'abdomen, de pigmentation claire à foncée et de forme allongée à ronde, se caractérise par la présence ou non d'une paire de cornicules et d'une cauda. Les cornicules émettent une phéromone d'alarme, l'(E)-β-farnésène (Pickett & Griffiths 1980) et la cauda permet l'écoulement du miellat résultant des éléments de la sève élaborée non assimilés lors de l'ingestion.

Le succès d'un puceron peut être attribué à son cycle de vie particulier. Les pucerons peuvent être classés en deux groupes selon leur cycle de vie : i) les espèces monoeciques, accomplissant tout leur cycle de développement sur une même espèce de plantes ou des espèces très proches ; et ii) les espèces dioeciques (ou hétéroeciques), spécialisées sur une plante pendant une saison et investissant d'autres n'ayant rien en commun avec la première lors des générations suivantes (Van Emden & Harrington 2007). La plupart des espèces de pucerons sont monoeciques, comme *B. brassicae* qui reste durant tout son cycle sur des plantes de la famille des Brassicaceae. Même si seulement environ 10 % des espèces sont dioeciques, ce cycle concerne la majorité des espèces de pucerons des climats tempérés, comme les espèces *M. persicae* et *A. fabae* qui se retrouvent en abondance dans la nature (Blackman & Eastop 2000). *M. persicae* exploite des espèces du genre *Prunus* et notamment *Prunus persica* (L.) Batsch comme hôte primaire d'hiver et des centaines de plantes appartenant à 40 familles différentes comme hôtes secondaires. *A. fabae* exploite le Fusain d'Europe (*Euonymus europaeus*, Celastraceae) comme hôte primaire et a une large gamme d'hôtes secondaires (200 plantes).

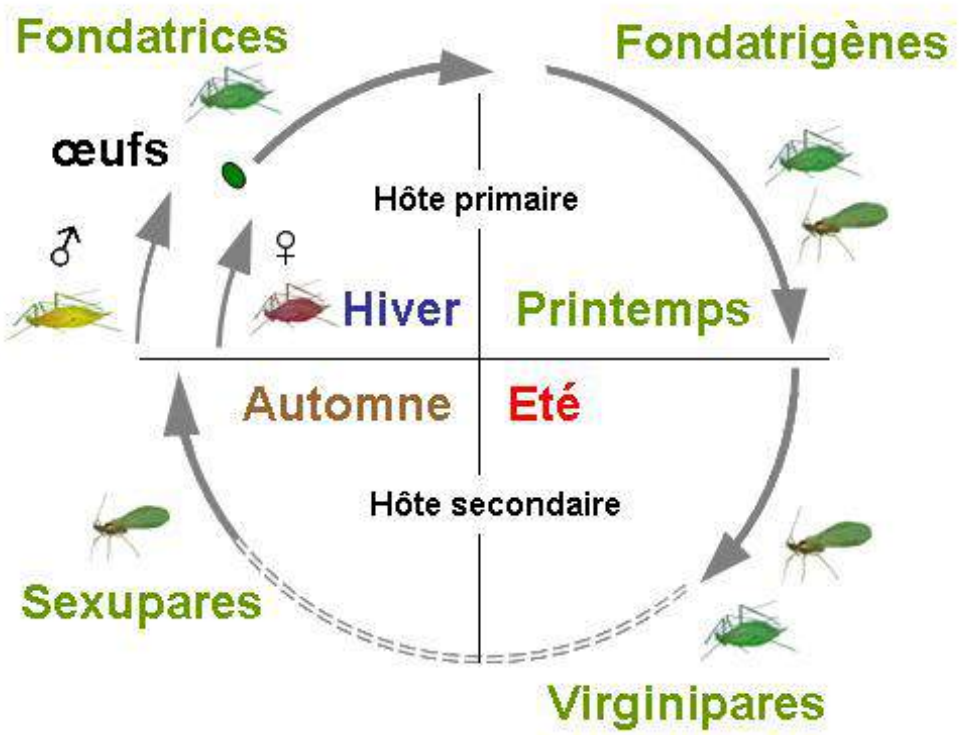


Figure 36 Représentation schématique du cycle de vie d'un puceron hétéroécique holocyclique
Source : http://www7.inra.fr/encyclopedie_pucerons/les_pucerons/cycles_biologiques

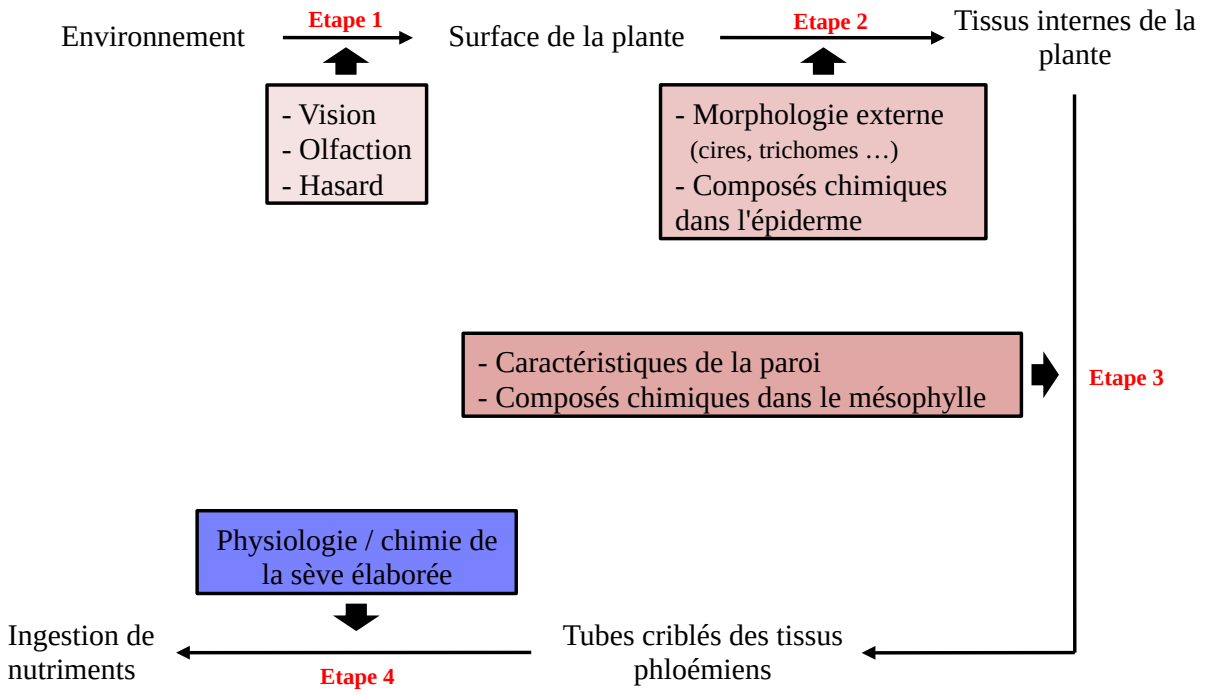


Figure 37 Etapes de l'acceptation d'une plante-hôte par les pucerons
A chaque étape, la plante peut soit être acceptée (le puceron passe alors à la prochaine étape), soit rejetée (le puceron quitte la plante). L'acceptation dépend d'une série de caractéristiques de la plante, la cible finale étant les éléments de tubes criblés pour l'ingestion de sève élaborée. D'après Caillaud & Via (2000).

La plupart des pucerons s'adaptent aux variations saisonnières et climatiques en présentant la particularité de pratiquer successivement deux modes de reproduction au cours de l'année, la reproduction sexuée et la reproduction asexuée parthénogénétique. On parle alors de polyphénisme de reproduction. Un puceron présentant cette alternance de modes de reproduction est appelé holocyclique. Les trois espèces étudiées sont holocycliques (**Figure 36**). Des individus sexués (sexupares) sont formés au cours de l'automne sous l'effet de la baisse de la durée du jour et de la température et les femelles fécondées pondent des œufs qui résistent au froid et sont en diapause au cours de l'hiver. En fin d'hiver, ces derniers éclosent et donnent naissance à des individus femelles (les fondatrices) se reproduisant sans fécondation par parthénogénèse. Les premiers individus formés (fondatrigènes) marquent le début de la phase asexuée et permettent la colonisation des premières plantes-hôtes. Entre douze et vingt générations parthénogénétiques (sauf exception) vont ensuite se succéder au cours de l'été (avec les femelles virginipares), puis une génération de sexués sera formée à l'automne suivant et le cycle recommencera (**Figure 36**). Certains pucerons présentent aussi une perte de la phase sexuée et se reproduisent toute l'année par parthénogénèse. On parle alors de pucerons anholocycliques.
La parthénogénèse cyclique présente de nombreux avantages : d'une part la formation d'œufs résistants au froid (jusqu'à -30 °C) qui constitue une assurance « hiver » pour les pucerons au niveau spécifique, d'autre part la parthénogénèse et la viviparité qui lui est associée leur permettent d'avoir un très important taux d'accroissement au cours de l'été.

4.2.2. Régime alimentaire

La décision d'acceptation ou de rejet de l'hôte par l'insecte est déterminée en grande partie par des stimuli visuels, olfactifs, mécaniques et chimiques (**Figure 37**, Bernays & Chapman 1994). Un puceron ailé s'installe sur une plante-hôte en trois étapes : (1) atterrissage ; (2) test de la surface de la plante et du tissu externe (cuticule, trichome, etc.) et (3) pénétration et évaluation des tissus aboutissant à l'alimentation (Klingauf 1987). Les pucerons peuvent localiser leur plante-hôte en distinguant des composés volatiles provenant de la plante avec des sensilles olfactives (rhinaries) situées sur leurs antennes (Pickett *et al.* 1992), comme *B. brassicae* attiré par des extraits de *Brassica* spp. (Petterson 1973). Cependant, ceci n'est pas valable pour certains pucerons polyphages comme *M. persicae*. Les formes ailées de ce puceron se posent sur des plantes hôtes ou non-hôtes avec une même fréquence (Kennedy *et al.* 1959). De plus, des stimuli visuels sont aussi impliqués dans le processus de choix, des longueurs d'ondes étant stimulantes comme celles du vert, du jaune et de l'orange, (Nottingham *et al.* 1991) avec une forte préférence pour les longueurs d'ondes du jaune pour les individus ailés *M. persicae* par exemple (Heathcote 1957). Après avoir atterri sur une plante hôte potentielle, le puceron peut aussi analyser avec ses pièces buccales (extrémité du labium) les caractéristiques physico-chimiques de la surface de la plante telles que les VOC, la texture, la topologie, les exsudats de trichomes et les cires épicuticulaires (Powell *et al.* 2006). Il peut aussi de cette façon détecter le contour des veines, leur site d'alimentation préféré (Tjallingii 1978). Avant de s'alimenter de sève élaborée, les stylets du puceron doivent faire face aux caractéristiques particulières de la paroi végétale et aux composés présents dans le mésophylle (**Figure 37**).

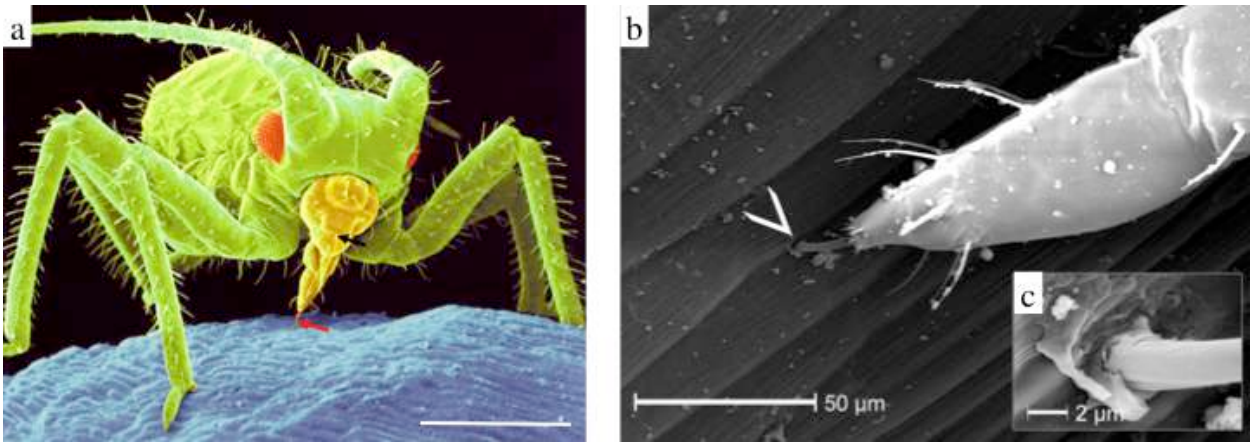


Figure 38 Microphotographies d'un puceron

Montrant **(a)** ses pièces buccales constituées d'un rostre (flèche noire) et d'un faisceau de stylets (flèche rouge), Barre = 1 mm **(b)** le point d'entrée des stylets de *Macrosiphum euphorbiae* (pointe de flèche) qui semble toujours localisé entre les cellules épidermiques au niveau de l'affaissement des bords de cellules et des jonctions pariétales anticlines ; **(c)** détail du point d'insertion de b montrant le matériel salivaire recouvrant partiellement la surface de la feuille autour des stylets. Sources : Photos de Gilles Bourdonnais et Will *et al.* (2012).

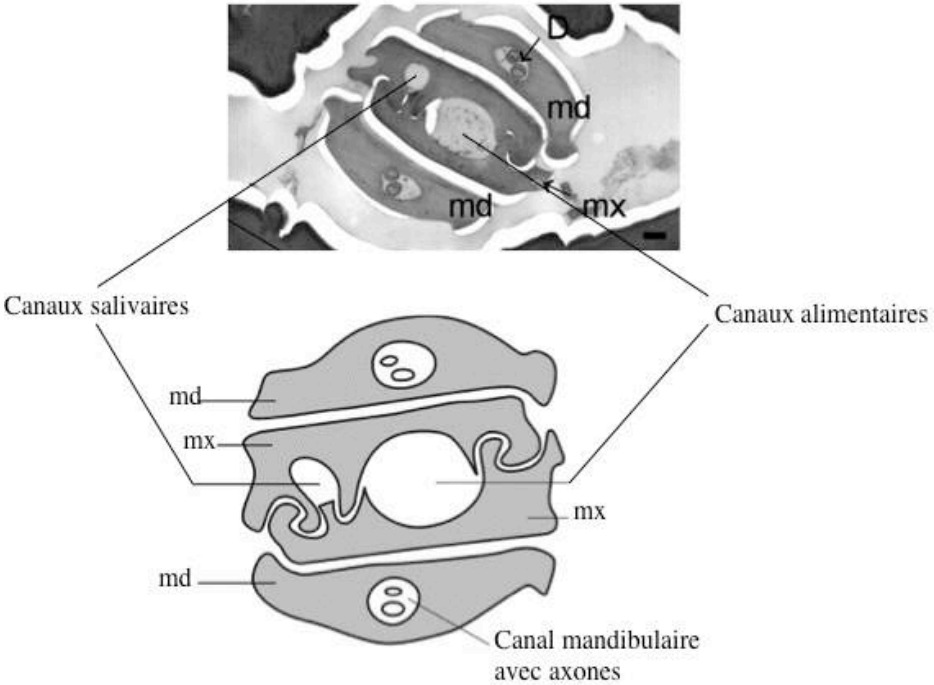


Figure 39 Représentations schématique et micrographique de l'anatomie des stylets du puceron *B. brassicae*, en section transversale

Le canal salivaire et le canal alimentaire sont entourés de deux stylets maxillaires (mx) et de deux stylets mandibulaires (md). Barre = 200 nm. D'après Uzest *et al.* (2007) et Douglas (2003).

Le régime alimentaire des insectes phytophages dépend du type de relation avec leurs plantes hôtes. Certains sont généralistes (polyphages), d'autres sont spécialistes (monophages ou oligophages) (Bernays & Chapman 1994). Chez les pucerons, les généralistes représentent seulement 5 % des espèces, 95 % étant spécialistes (Blackman & Eastop 1984). Les insectes polyphages ont la capacité de se développer aux dépens de diverses espèces végétales appartenant à plusieurs familles, non apparentées sur le plan taxonomique. *M. persicae* est par exemple un insecte généraliste très polyphage (Pollard 1973), puisqu'il est capable de s'alimenter sur 400 espèces de plantes hôtes (Quaglia *et al.* 1993) appartenant à plus de 40 familles (Blackman & Eastop 2000). Les insectes oligophages se nourrissent d'un petit nombre de plantes appartenant à différents genres d'une même famille, comme le puceron du chou *B. brassicae* spécialiste de la famille des Brassicaceae (Blackman & Eastop 1984) qui compte 350 genres et environ 3000 espèces (Hegi 1986). Les insectes monophages se développent aux dépens d'une seule espèce de plante, ou éventuellement de 2 ou 3 espèces appartenant à un même genre botanique, comme le puceron de l'hellébore *Macrosiphum hellebori*.

Quelque soit leur régime alimentaire, les pucerons répondent à leurs besoins nutritionnels par deux sources : leurs aliments (sève phloémienne) et leurs micro-organismes symbiotiques primaires (Douglas 2003). Les bactéries symbiotiques sont transmises verticalement de la mère à la descendance (Hinde 1971). L'association est obligatoire à la fois pour le puceron et le symbiote primaire, le plus étudié étant la bactérie *Buchnera aphidicola*, connue seulement chez les pucerons et appartenant à la subdivision des γ-protéobactéries (Munson *et al.* 1991). Ces symbiotes sont hébergés dans une structure spécialisée (bactériome) située à proximité des ovaires dans la cavité abdominale du puceron et dans des cellules spécialisées (bactériocytes). Le métabolisme de *Buchnera* apporte une complémentation nutritionnelle, notamment les acides aminés dits essentiels (histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine) et les vitamines que le puceron ne peut ni synthétiser ni trouver dans la sève élaborée (Douglas 1998). Il existe aussi des endosymbiotes secondaires tel que *Hamiltonella defensa*, qui interviennent dans la résistance du puceron à différents stress biotiques (parasitoïdes) (Degnan *et al*. 2009).

4.2.3. Mode d'alimentation

La nature du régime alimentaire impose aux pucerons un équipement spécifique pour se nourrir, le rostre (**Figure 38**). Le rostre est constitué de deux paires de stylets, une de stylets mandibulaires externes et une de stylets maxillaires internes. Placés entre les deux stylets externes, les stylets maxillaires forment deux canaux, un canal alimentaire antérieur et un canal salivaire postérieur (**Figure 39**, Forbes 1969). Afin d'atteindre les tubes criblés, les stylets progressent au sein des tissus végétaux exclusivement de façon intercellulaire, entre les fibres de cellulose et les hémicelluloses de la paroi primaire ou secondaire et non pas dans la lamelle moyenne (Tjallingii & Esch 1993). La taille des stylets peut varier en longueur et en largeur d'une espèce de puceron à l'autre. Chez *M. persicae*, le diamètre moyen du faisceau de stylets est de 3 µm, celui du canal alimentaire étant de 0,5 µm près de la tête et de 0,35 µm près de l'extrémité des stylets, tandis que chez le Grand puceron du saule *Tuberolachnus saligans*, le diamètre du canal alimentaire est de 3,6 µm près de la tête et de 1,2 µm près de l'extrémité. La

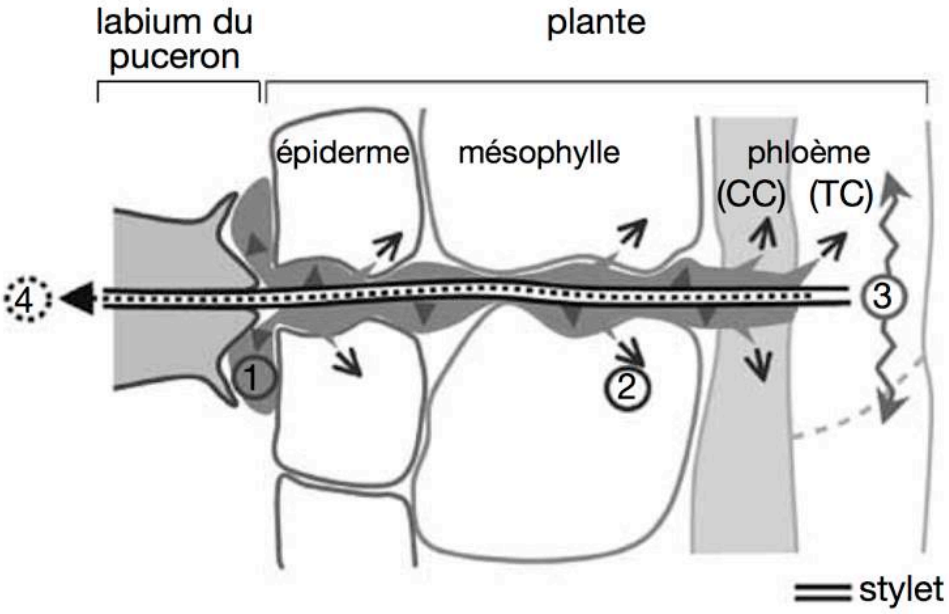


Figure 40 Les différentes phases de salivation du puceron dans la plante

Les quatre types de salives sont excrétés par le canal salivaire du puceron. La salive gélifiante (1) enveloppe les stylets à la manière d'une gaine lors de leur progression intercellulaire. Les trois autres salivations sont liquides. La salivation (2) est intracellulaire le long des stylets. Les salivations (3) et (4) interviennent quand les extrémités des stylets se trouvent dans les tubes criblés du phloème (TC). La salivation (3) est une salivation primaire qui a lieu dans les TC du phloème. La salivation (4) (en pointillés le long du stylet) est une salivation secondaire. Cette salive n'atteint pas la plante mais est directement mélangée au phloème et est refoulée dans le canal alimentaire (fermé lors des autres phases) en raison de la haute pression hydrostatique exercée dans les TC. CC, cellules compagnes ; TC, tubes criblés (Harmel *et al.*, 2010).

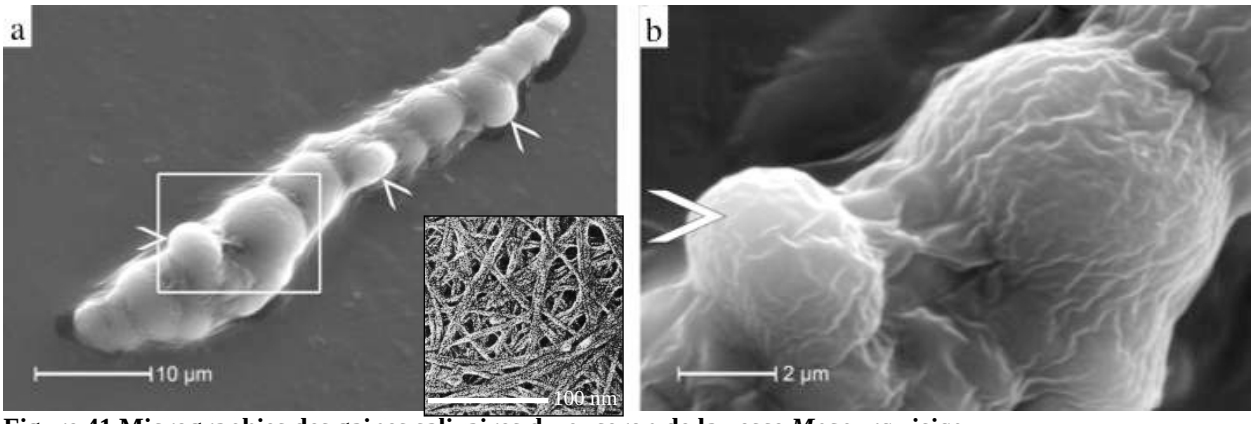


Figure 41 Micrographies des gaines salivaires du puceron de la vesce *Megoura viciae*

La gaine (vue du dessous) est entièrement attachée à une membrane de Parafilm® qui couvrait le milieu nutritif artificiel. La pénétration initiale du stylet sur la figure 43a est située dans le coin en bas à gauche. **(a)** Gaine de salive solide formée montrant la structuration typique en collier de perles. Les parties sphériques individualisées de la salive gélifiante résultent d'une formation par pulses de salive solide. La figure montre une nette délimitation entre elles. La gaine salivaire, d'une longueur totale d'environ 52 µm finit en pointe et montre trois petits embranchements (têtes de flèches) séparés par un intervalle régulier d'environ 14 µm. L'image à l'intérieur du cadre blanc est zoomée **(b)** et montre que la surface de la gaine salivaire a un aspect rugueux. La figure 3b représentant le réseau fibrillaire de la paroi a été replacée en (a) afin de comparer les proportions entre la taille d'une gaine salivaire et celle des mailles du réseau (Will *et al.*, 2012).

longueur totale des stylets de *M. persicae* est de 300 µm alors que chez le puceron lanigère du sapin *Adelges piceae*, la longueur peut atteindre 1,5 mm (Auclair 1963). Ces stylets sont essentiels à leur mode d'alimentation en tant qu'insecte piqueur-suçeur.

Le puceron, en insérant ses stylets dans la plante, endommage assez peu les tissus du végétal. A l'inverse, les chenilles, insectes broyeurs, causent de grosses perturbations tissulaires qui vont être perçues spécifiquement par la plante (Walling 2000). Les profils transcriptionnels induits par les broyeurs montrent donc de grandes similitudes avec les profils observés suite à blessure (Reymond *et al.* 2000). Le mode d'alimentation des insectes piqueurs-suceurs minimise cette blessure et limite localement l'induction de gènes de défense (Thompson & Goggin 2006) et l'induction d'inhibiteurs de protéases induits normalement suite à une blessure (De Ilarduya *et al.* 2003 ; Zhu & Park 2005). Cependant, le puceron ne supprime pas totalement la blessure puisqu'il peut engendrer la surexpression de gènes liés à la signalisation de blessure comme *LOX2* (Moran & Thompson 2001 ; Voelckel *et al.* 2004).

4.2.4. Les salives et leur contenu

Le puceron doit faire face aux propriétés du phloème et aux réactions de défense qui s'y déroulent avec notamment des protéines qui coagulent dans les éléments de vaisseau et dans le stylet du puceron (Tjallingii 2006). Il semble que la salive aqueuse, principalement constituée d'enzymes (Miles 1999), joue un rôle important pour empêcher cette obstruction. Cette salivation, qui intervient avant toute ingestion de phloème, se ferait en quatre périodes (**Figure 40**). Durant la première, la salivation gélifiante (1) forme un manchon de salive autour des stylets du puceron entre les cellules des tissus végétaux pour limiter le contact direct du stylet avec l'apoplasme de la plante. Les trois autres périodes font intervenir une salivation aqueuse tout d'abord pendant les piqûres brèves intracellulaires (2), ensuite dans les vaisseaux du phloème (3) et enfin à partir de la sève déjà ingérée (4) (Tjallingii 2006).

Les protéines de la salive des pucerons sont de deux types : structurelles et enzymatiques. Les protéines structurelles interviennent dans la phase de salivation gélifiante solide. La gaine formée par la salive solide des pucerons (**Figure 41**), composée principalement de phospholipides et de protéines structurelles, permet (1) de garantir un bon frottement entre les différents stylets, facilitant ainsi leur avancement ou rétractation, (2) de sceller le site de ponction pour prévenir la perte de pression de turgescence dans les tubes criblés, (3) de fournir une barrière relativement inerte pour minimiser les réponses de la plante à la blessure engendrée (Miles 1999).
Les enzymes de la salive liquide sont soit des hydrolases (pectinases, amylases, cellulases et oligosaccharases), soit des enzymes d'oxydation et de réduction (phénol oxydase, glucose oxydase et peroxydase) (**Tableau 12**) (Harmel *et al.* 2010). Les pectinases aphidiennes pourraient être impliquées dans l'induction des défenses de la plante par la production d'OG mais aussi pour faciliter l'insertion des stylets (Miles 1999). Des pectinases ont été tout d'abord détectées dans la salive de pucerons de *M. persicae* et *S. graminum*. Elles pourraient être impliquées dans la facilitation de la progression de pièces buccales d'insectes phloémophages dans la plante-hôte (Adams & McAllan 1956 ; McAllan & Adams 1961 ; Ma *et al.* 1990), même si les stylets semblent aller plus vite que ce que permet l'activité des pectinases (Cherqui &

Tableau 12 Liste des activités enzymatiques détectées dans la salive gélifiante des pucerons
D'après Harmel *et al*. (2010).

Enzyme	Activité détectée (D) ou non détectée (ND)	Espèce de puceron	Référence
α-amylase (EC 3.2.1)	ND	*AP, TT*	(Madhusudhan & Miles, 1998)
Invertase (EC 3.2.1.26)	ND	*ME, MP, NR, AF*	(Miles & Harrewijn, 1991)
Catalase (EC 1.11.1.6)	ND	*AP, TT*	(Madhusudhan & Miles, 1998)
Catéchol oxydase	D	*AP, TT*	(Madhusudhan & Miles, 1998)
(EC 1.10.3.1)	D	*ME, MP, NR, AF*	(Miles & Harrewijn, 1991)
	D	*MR*	(Peng & Miles, 1991)
	D	*SA*	(Urbanska *et al.*, 1998)
	D	*SA*	(Guo *et al.*, 2006)
	D	*SG, AP, MP*	(Cherqui & Tjallingii, 2000)
Peroxydase (EC 1.11.1.7)	D	*SA*	(Urbanska *et al.*, 1998)
	D	*SG, AP, MP*	(Cherqui & Tjallingii, 2000)
	D	*MR*	(Peng & Miles, 1991)
	D	*AG, MR, MP*	(Miles & Peng, 1989)
	ND	*DN*	(Ni *et al.*, 2000)
Polygalacturonase	D	*AP, TT*	(Madhusudhan & Miles, 1998)
(EC 3.1.1.15)	D	*SA*	(Guo *et al.*, 2006)
	D	*SG*	(Ma *et al.*, 1990)
	D	*SG, AP, MP*	(Cherqui & Tjallingii, 2000)
Pectine méthylestérase	D	*AP, TT*	(Madhusudhan & Miles, 1998)
(EC 3.1.1.11)	D	*SG*	(Ma *et al.*, 1990)
	D	*SG, AP, MP*	(Cherqui & Tjallingii, 2000)
Cellulase (EC 3.2.1.4)	D	*SA*	(Guo *et al.*, 2006)
	D	*DN*	(Ni *et al.*, 2000)
	ND	*Rpa*	(Ni *et al.*, 2000)
	ND	*SG, AP, MP*	(Cherqui & Tjallingii, 2000)
Phosphatase alkaline (EC 3.1.3.1)	ND	*Rpo, AG*	(Funk, 2001)
Protéinase	ND	*SG, AP, MP*	(Cherqui & Tjallingii, 2000)
Glucose oxydase (EC 1.1.3.4)	D	*MP*	(Harmel *et al.*, 2008)

AP, *Acyrthosiphon pisum* ; TT, *Therioaphis trifolii* ; ME, *Macrosiphum euphorbiae* ; MP, *Myzus persicae* ; NR, *Nasonovia ribisnigri* ; AF, *Aphis fabae* ; MR, *Macrosiphum rosae* ; SA, *Sitobion avenae* ; SG, *Schizaphis graminum* ; DN, *Diuraphis noxia* ; RPa, *Rhopalosiphum padi* ; RPo, *Rhodobium porosum* ; AG, *Aphis gossypii*.

Tjallingii 2000 ; Harmel *et al.* 2010). La qualité et la quantité de pectines dans la plante-hôte pourraient affecter les capacités de l'insecte à attaquer la plante. Les pectinases salivaires pourraient être impliquées dans le développement de résistance de la plante à des biotypes de puceron, par leur activité enzymatique (Dreyer & Campbell 1984, 1987).
Parmi les pectinases, des PME et des PG ont été détectées dans la salive de *S. graminum* (Ma *et al.* 1990 ; Cherqui and Tjallingii 2000), d'*A. pisum* et *T. trifolii maculata* (Madhusudhan and Miles 1998). Une activité PG a aussi été détectée chez *S. avenae* (**Tableau 12**, Guo *et al.* 2006).

4.2.5. Dégâts causés par les pucerons

Ils sont de deux ordres, soit directement liés à la prise d'alimentation, soit indirectement, liés à la présence du puceron qui est alors un vecteur de pathogènes.

4.2.5.1. Dégâts directs

La perforation des feuilles et l'injection de salive liquide dans les tissus végétaux lors de l'insertion des stylets peuvent avoir des effets toxiques pour la plante-hôte ou provoquer un arrêt de croissance (Comeau 1992). Les pucerons affectent la croissance de la plante et la production agricole en capturant une partie des photoassimilats, en provoquant des changements systémiques dans l'allocation des nutriments, des décolorations, des nécroses et des déformations des feuilles et/ou des fruits (Bonnemain 2010). Certains pucerons peuvent aussi perturber les processus de multiplication cellulaire et entraîner la formation de galles, servant de source de nutriments (Dedryver *et al.* 2010).

4.2.5.2. Dégâts indirects

Le miellat excrété par les pucerons, bien que non toxique, constitue un milieu favorable au développement de microorganismes notamment des champignons saprophytes (*Alternaria* spp., *Verticillum* spp.) responsables des fumagines. Les fumagines vont contribuer à l'occlusion des stomates et à la réduction de la photosynthèse (Rossing 1991). Cependant, les dégâts les plus sévères résultent de la transmission de virus phytopathogènes. En effet, les pucerons sont capables de transmettre 28 % des phytovirus transmis par les insectes (197 sur 697) (Hogenhout *et al.* 2008). *Myzus persicae* représente l'espèce de puceron vecteur la plus efficace avec pas moins de 100 phytovirus transmis qu'ils soient persistants ou non. *Brevicoryne brassicae* et *A. fabae* transmettent respectivement une vingtaine et une trentaine de phytovirus (Blackman & Eastop 2000). Les dégâts indirects par ces virus ont une importance économique majeure, puisque les pertes de rendements occasionnées peuvent aller jusqu'à 50 % par exemple chez la betterave infectée par le *Beet Yellows Virus* (BYV) et le *Beet Mild Yellowing Virus* (BMYV) (Smith & Hallsworth 1990). Les virus, situés dans le phloème ou le parenchyme, peuvent provoquer des perturbations physiologiques, se traduisant par exemple par un affaiblissement du végétal voire sa mort mais aussi par une déformation de fruits les rendant non commercialisables (Dedryver *et al.* 2010).
La transmission virale par vecteur comprend 2 modes de dispersion : les virus non circulants et les virus circulants. Chez les virus circulants, les particules virales sont internalisées dans les cellules de l'intestin moyen (« *midgut* ») et/ou de l'intestin postérieur (« *hindgut* ») et vont

rejoindre l'hémolymphe sans se multiplier (non-propagatifs) ou se multiplier dans les glandes salivaires du vecteur (propagatifs). Les virus non-circulants n'effectuent pas de cycle dans leur vecteur, les particules virales étant retenues pendant quelques minutes (mode non-persistant) ou quelques heures (mode semi-persistant) à l'extrémité des stylets du puceron au niveau de la zone appelée l'acrostyle (Brault *et al.* 2010 ; Uzest *et al.* 2010). Des récepteurs très spécifiques situés sur la surface de la cuticule tapissent le canal alimentaire sur lesquels peut se fixer la protéine P2 du *Cauliflower Mosaic Virus* CaMV (Caulimoviridae). La protéine P2 fusionnée à la protéine fluorescente GFP a mis en évidence l'existence d'un acrostyle chez plusieurs espèces de pucerons dont *M. persicae* et *B. brassicae* (Uzest *et al.* 2007 ; 2010). Pour l'instant, seule la fixation du CaMV au niveau de l'acrostyle a été mise en évidence. D'autres virus non-persistants, notamment ceux de la famille des Potyviridae, adoptent la même stratégie de fixation avec un facteur d'aide (*helper component*) où une protéine non-structurale codée par le virus qui joue le rôle de « passerelle » entre le récepteur du stylet et la protéine capsidiale (*coat protein*, Brault *et al.* 2010).

4.2.6. Lutte contre les pucerons

La protection des cultures contre les pucerons a eu recours à divers moyens de lutte dont l'efficacité s'est accrue suite à l'apparition des produits chimiques de synthèse. A la fin du XIXe siècle, les techniques de lutte ont intégré des approches physique et chimique (utilisation de toxiques végétaux ou minéraux, badigeons d'huile, goudrons, bouillies sulfo-calciques, etc.) et de lutte biologique (Pesson 1990). Les premières générations d'insecticides étaient basées sur l'utilisation de produits facilement disponibles à base d'arsenic ou de nicotine qui tuent les insectes avec leurs principes actifs après pulvérisation (Schepers 1989). Après la seconde guerre mondiale, les pesticides de synthèse ont connu un grand succès grâce à l'utilisation du DTT (dichlorodiphényltrichloro-éthane) et des composés organochlorés et organophosphorés. Malgré que le traitement chimique reste la technique la plus utilisée actuellement, il présente de nombreux inconvénients : des effets négatifs sur l'environnement (pollution de l'eau, présence de résidus toxiques dans nos aliments, etc.), la réduction du potentiel biologique (destruction d'insectes bénéfiques) et le développement de résistances aux composés chimiques par certains ravageurs. Aujourd'hui, la plupart des organochlorés sont interdits en Europe et en Amérique du Nord. La lutte intégrée est apparue comme une solution possible de protection des cultures, impliquant un emploi judicieux de plusieurs moyens de lutte. Dans la lutte intégrée, toutes les techniques et mesures capables d'interrompre le cycle de vie des insectes à une de ses phases sont incluses (Harrewijn & Minks 1989). Le concept consiste non plus à éliminer entièrement les insectes ravageurs mais à baisser les effectifs afin que les dégâts soient supportables.

Dans les deux dernières décennies, les progrès considérables accomplis dans la caractérisation des signaux produits et échangés lors des interactions plantes-pathogènes ont permis l'arrivée d'une nouvelle méthode de protection des plantes : les éliciteurs de réponses des plantes appelés stimulateurs des Défenses Naturelles (SDN) des plantes par des éliciteurs. Ces molécules (ou des substances qui les miment) d'origine végétale ou issues d'autres organismes déclenchent tout ou partie des réactions de défenses naturelles de la plante de manière préventive. La méthode SDN est une alternative intéressante et émergente qui s'inscrit dans le respect de l'environnement. Son

emploi limite les phénomènes de résistance des insectes aux pesticides car elle déclenche une multitude de réponses de défense de la plante rendant plus difficile l'apparition d'espèces insensibles aux mécanismes de défense mis en place. Les éliciteurs doivent agir sur un large spectre d'espèces végétales et doivent être efficaces contre un spectre aussi large de pathogènes (immunité induite). Cependant le niveau d'efficacité de la résistance induite par un éliciteur peut être cultivar dépendant et fonction du stade physiologique des plantes traitées (Klarzynski & Fritig 2001).

Chapitre 2. Matériels et méthodes expérimentales

1. Les matériels biologiques

1.1. Les plantes

Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* d'écotypes sauvages Columbia (Col-0, appelé Col) ou Wassilewskija (WS-0, appelé WS) sont utilisées pour les expérimentations. Le gène *PME3* est étudié par utilisation d'un mutant knock-out (KO) appelé *pme3* (FLAG585E02). Cette lignée mutante, avec un fond génétique WS, résulte de l'insertion d'un ADN de transfert (ADN-T). Une plante transgénique qui amplifie le promoteur du gène appelée PME3::GUS (*promAtPME3::GUS*, fond génétique Col) tous deux déjà caractérisés (Guénin *et al.* 2011). Le gène *PME17* est étudié par utilisation d'un mutant KO *pme17* caractérisé, résultant de l'insertion d'un ADN T dans le premier exon (FLAG208G03, fond génétique WS, Sénéchal *et al*. 2014). Enfin, le gène *PMEI4* est étudié par utilisation d'un mutant KO *pmei4* (SM_3_34502, insertion dans l'unique exon, fond génétique Col) et d'une plante transgénique où le gène, fusionné à la GFP (*Green Fluorescent Protein*), est surexprimé grâce au promoteur 35S du *Caulimoflower Mosaic Virus* (CaMV) : 35S:PMEI4::GFP (fond génétique Col), tous deux déjà caractérisés (Pelletier *et al.* 2010).

Les plants d'*A. thaliana* sont cultivées en godets (L: 4,0 x l: 4,0 x h: 5,5 cm) contenant du terreau universel dont les caractéristiques sont présentées en **Annexe 1**. La veille de chaque semis, le terreau est autoclavé afin d'éliminer tout organisme uni- ou pluricellulaire pouvant perturber le développement des plantes (Autoclave Systec VE-95, 121 °C pendant 30 min). Deux graines sont déposées par godet sur du terreau préalablement humidifié. Recouverts d'un film plastique afin de maintenir une atmosphère saturée en eau, les godets sont placés en chambre froide à 4 °C durant 6 jours afin de réaliser la vernalisation des graines, pour une meilleure synchronisation de la floraison. Les godets sont ensuite placés dans un phytotron (Intellus environmental controller, Percival) dont les conditions contrôlées sont : 23 ± 0,5 °C, 70 ± 5 % d'humidité relative, en conditions de jours longs (16 h lumière /8 h obscurité) et avec une densité de flux de photons utiles à la photosynthèse de 100 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.
Les plantes sont arrosées régulièrement (un jour sur deux) et après une quinzaine de jours, des plantules sont retirées à l'aide d'une pince de façon à ne laisser qu'une plante par godet. Les plantes sont alors conservées dans le phytotron jusqu'à leur utilisation (3 semaines après).

1.2. Les pucerons

Les pucerons sont élevés en phytotron dans une cage en Plexiglas® (*M. persicae* : 20 x 75 x 50 cm ; *B. brassicae* ou *A. fabae* : 36 x 24 x 11 cm, photos des individus en **Annexe 2**) placée dans des conditions contrôlées : température 20 ± 1 °C ; 60 ± 5 % d'humidité relative, en conditions de jours longs (16 h lumière /8 h obscurité) avec 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Le clone de *M. persicae*, prélevé en 1999 sur culture de pommes de terre du nord de la France (Loos-en-Gohelle), est

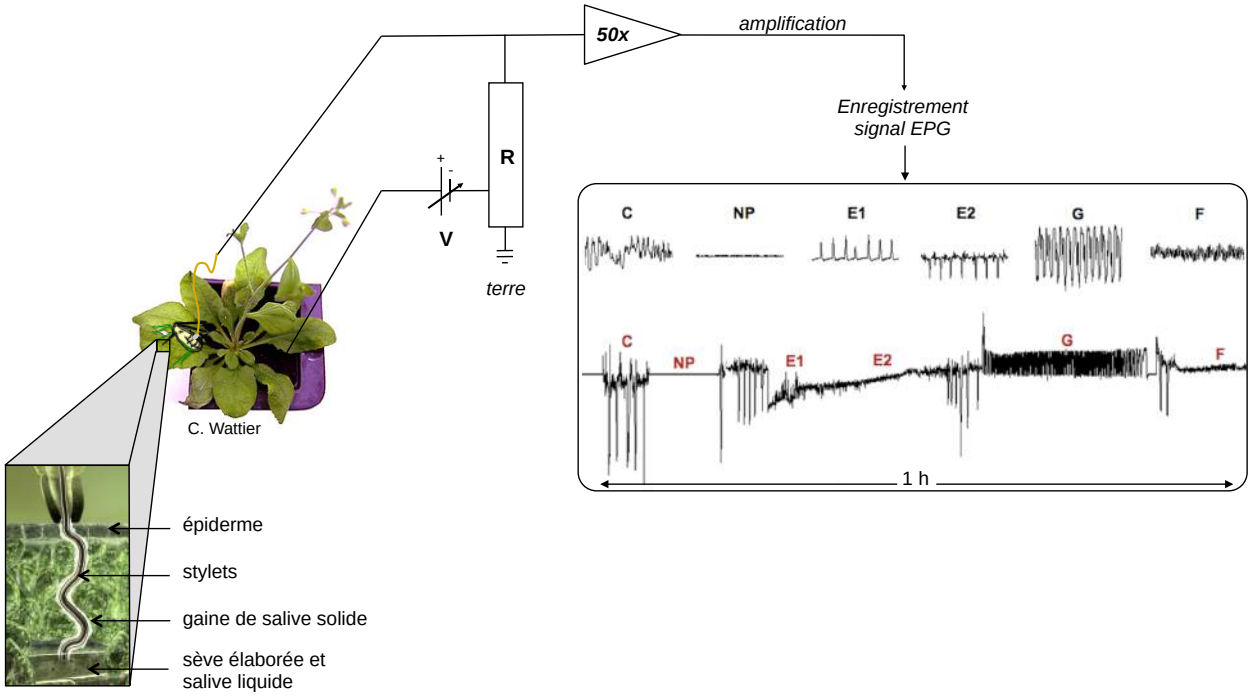


Figure 42 Schéma du dispositif d'électropénétrographie (EPG)

Le puceron est intégré dans un circuit électrique, comprenant une source de tension (V), une résistance (R) et un système d'amplification. L'ensemble est connecté à un ordinateur. Le cadre représente un enregistrement (électropénétrogramme) d'une durée d'une heure dans lequel sont représentés différents signaux présentant des amplitudes et de fréquences spécifiques caractéristiques des différents items du comportement trophique du puceron : C, phase de recherche lors du déplacement des stylets au sein des tissus de la plante (apoplasme) ; NP, phase de non piqûre ; E1, salivation dans un tube criblé ; E2, ingestion passive de sève élaborée dans un tube criblé ; G, ingestion active de sève brute dans un vaisseau du xylème ; F, progression asynchrone des stylets.

maintenu sur pomme de terre (*Solanum tuberosum* var. Désirée). Le clone de *B. brassicae*, fourni en 2008 par le laboratoire de « Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite » de l'INRA-CIRAD de Montpellier, est maintenu sur chou brocoli (*Brassicae oleracea* L. var. Marathon). Enfin, *A. fabae*, collecté en 2008 sur aubergine, est maintenu sur féverole (*Vicia faba* var. Maya). Les trois espèces de pucerons étudiées ne subissent donc pas d'habituation alimentaire à *A. thaliana* avant les expériences réalisées. Pour le maintien de la population, les plantes hôtes, renouvelées tous les mois environ, sont cultivées individuellement en pots (7,0 x 7,0 x 9,5 cm) dans du terreau autoclavé. Pour nos expériences, seuls les individus aptères sont utilisés.

2. Les méthodes expérimentales

2.1. Les infestations et les traitements des feuilles

2.1.1. Méthodes éthologiques

2.1.1.1. Etude du comportement trophique

Pour l'étude du comportement trophique des pucerons, des jeunes adultes sont prélevés de l'élevage à l'aide d'un pinceau et déposés sur des feuilles excisées leur plante hôte placées dans des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé (1,5 g d'agar pour 100 mL d'eau). Ces boîtes sont placées la veille de l'expérimentation dans la salle d'expérimentation afin d'acclimater les pucerons. Un jeune adulte sera placé sur une feuille d'un plant d'*A. thaliana* âgé de 4 à 5 semaines.

Les activités alimentaires des pucerons dès la pénétration des stylets dans les tissus végétaux sont enregistrées *in situ* sous forme de signaux à l'aide de la technique d'électropénétrographie (EPG) en courant continu (Tjallingii 1978). Cette technique consiste à intégrer au moyen d'électrodes un puceron et une plante dans un circuit électrique comprenant une source de tension, une résistance électrique, un amplificateur, l'ensemble étant connecté à un ordinateur (**Figure 42**). Le puceron est relié au circuit par un mince fil d'or (20 µm de diamètre et 2 cm de longueur) collé sur la partie dorsale de l'abdomen grâce à une colle argentique conductrice (EPG Systems, Wageningen, Pays-Bas). Une électrode en cuivre est plantée dans le sol du godet contenant la plante, faisant ainsi office de «terre». L'ensemble du dispositif est placé à l'intérieur d'une cage de Faraday (pour réduire les nuisances électriques), dans une pièce climatisée (température 20 ± 1 °C ; 60 ± 5 % d'humidité relative, en conditions de jours longs 16 h lumière / 8 h obscurité avec 25 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$).

Dès l'insertion des stylets d'un puceron dans la plante, le circuit se ferme et des signaux électriques sont générés, constitués des potentiels électriques des tissus dans lesquels se trouve l'extrémité des stylets et des activités musculaires épipharyngiennes du puceron. Les signaux obtenus sont amplifiés et enregistrés sur un ordinateur. Un enregistrement en continu de 8 h est réalisé par couple plante/puceron. Pour chaque plante et chaque traitement (infestation aphidienne), une vingtaine d'électropenétrogrammes sont nécessaires afin d'obtenir des résultats analysables statistiquement. Notons que chaque lot d'une vingtaine de plantes est issu de deux

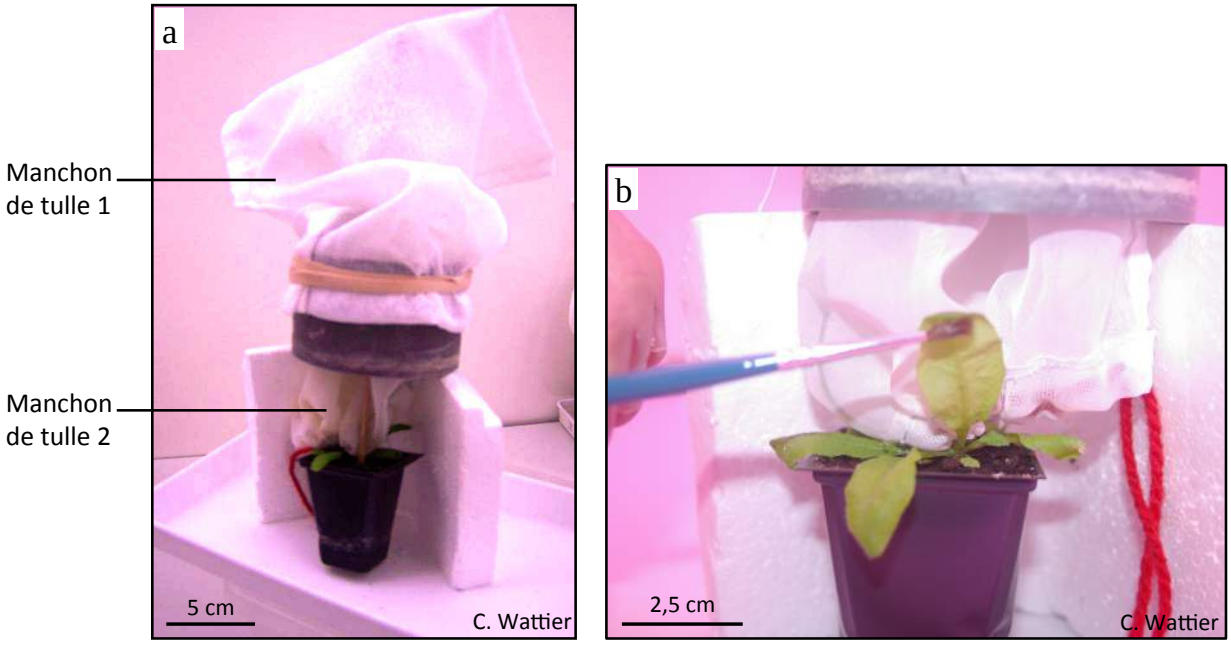


Figure 43 Dispositif mis en place pour effectuer les suivis physiologiques
(a) constitué de deux manchons de tulle isolant la plante infestée (manchon 1) et la hampe florale (manchon 2) et **(b)** permettant de dénombrer les larves formées sur la face inférieure des feuilles, après récupération à l'aide d'un pinceau fin.

semis différents (2 semaines d'enregistrement non consécutives, à raison de 8 à 16 couples plante-puceron randomisés entre les différents types de plantes testées, par jour). La séquence et la durée des événements sont interprétées par 98 paramètres différents (**Annexe 3**) tels que le temps mis pour atteindre le phloème, la durée de salivation, ou encore la durée d'ingestion de sève élaborée (Prado & Tjallingii 1997).

L'acquisition des enregistrements pour chaque couple plante/puceron a été réalisée avec le logiciel PROBE 3.5 (EPG Systems) et l'analyse des signaux a été effectuée avec le logiciel STYLET+ (EPG Systems). L'analyse permet de borner les différentes phases d'activité des stylets selon le type de signal. Les différentes phases sont les suivantes : phase de non recherche (np, *non probing*), phase de recherche des tubes criblés dans l'apoplasme (C), phase de salivation phloémienne (E1), phase d'ingestion passive de sève élaborée (E2), phase de déraillement des stylets (F), phase d'ingestion active de sève brute (G), piqûre intracellulaire (pd, *potential drop*) (**Figure 42**). Les fichiers ainsi analysés sont traités par le programme EPG-Calc 5.0 (Giordanengo 2014), permettant de calculer les 98 paramètres différents (**Annexe 3**).

2.1.1.2. Etude du développement physiologique

Des néonates âgés de 24 h sont engendrés par des pucerons adultes issus de l'élevage et placés dans des cages d'alimentation constituées d'un tube en PVC (diamètre/hauteur : 2,5/1 cm) recouvert de deux couches de Parafilm® entre lesquelles un milieu artificiel spécifique pour les pucerons a été introduit dans des conditions stériles (composition en **Annexe 4**).
Le premier jour de l'expérimentation, un puceron néonate est déposé à l'aide d'un pinceau sur une plante âgée de 3 semaines placée la veille dans la pièce expérimentale climatisée (température 20 ± 1 °C ; 60 ± 5 % d'humidité relative, en conditions de jours longs 16 h lumière /8 h obscurité avec 28 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$). Le couple plante/puceron est isolé à l'aide d'un manchon de tulle (**Figure 43a**). Au troisième jour, un autre manchon de tulle est utilisé afin d'isoler les hampes florales qui apparaissent au cours de l'expérimentation (**Figure 43a**) et d'obliger les pucerons à s'alimenter uniquement sur les feuilles. La survie larvaire et le développement des pucerons seront suivis tous les 3 jours pendant 21 jours. Pour déterminer les fécondités totale et journalière, les descendants des pucerons adultes sont comptés et retirés de la plante à l'aide d'un pinceau (**Figure 43b**). Pour chaque type de plante étudié (sauvage, mutant ou surexpresseur), 15 suivis physiologiques et 3 répétitions biologiques issues de 3 semis différents sont réalisés.

Les données obtenues sont analysées par le programme DEMP 1.5 (Giordanengo 2009) afin de déterminer pour chaque « population » de pucerons différents paramètres physiologiques : la période pré-reproductive (PRP, jours), fécondité journalière (DF, larves/femelle/jour), le temps de doublement des populations (DT, jours) ou le taux d'accroissement intrinsèque (r_m, femelles/femelle/jour) évalué par la méthode du Jackknife (Meyer *et al.* 1986).

Tableau 13 Plan d'expérimentation établi pour étudier l'impact d'une infestation sur les feuilles d'*A. thaliana*

Plantes témoins / infestées	**Dosages enzymatiques** (PME, PG)	**Sucres pariétaux** (DIONEX)	**Liaisons chimiques foliaires** (FT-IR)	**Expression gènes** (qRT-PCR)	**Expression gènes** (puces à ADN)
WS / IWS	X	X	X	X	X
pme17-1 / I*pme17-1*	X	X	X	X	X
pme17-2	-	-	-	-	-
pme3 / I*pme3*	X	X	X	X	-
Col / Icol	X[2]	X[1]	X[1]	X[2]	à venir
pmei4 / I*pmei4*	X[2]	X[1]	X[1]	X[2]	-
PMEI4:35S / IPMEI4:35S	X[2]	X[1]	X[1]	X[2]	à venir
n de répétitions biologiques (RB)	3	2	2	3	3
n de plantes / RB / modalité	9	9	6	9	6
n total de plantes	**27**	**18**	**12**	**27**	**18**

X : expérience réalisée, avec l'aide de Corinne Pau (X[1]) et d'Amélie Turbant (X[2]); - : expérience non réalisée

2.1.2. Etude de l'effet de l'infestation sur la physiologie de la plante

L'impact d'une infestation aphidienne est évalué sur les feuilles de plants âgés de 3 semaines (WS, *pme17*, *pme3*, Col, *pmei4*, 35S:PMEI4::GFP) au niveau biochimique (activités enzymatiques, sucres pariétaux, composés métaboliques et liaisons chimiques) et au niveau moléculaire (expressions de gènes par qRT-PCR). Pour cela, 10 pucerons adultes sont prélevés à l'aide d'un pinceau directement sur des feuilles de l'élevage sont déposés sur chaque plant d'*A. thaliana* pendant 24 h à raison de 2 pucerons par feuille mature (**Tableau 13**).
Sur WS et *pme17*, l'effet d'une infestation par 60 pucerons est aussi testé (10 pucerons sur chacune des feuilles les plus matures) pendant 24 h (qRT-PCR et puces à ADN, **Tableau 13**).

2.1.3. Echantillonnage des feuilles

Pour chaque plante témoin (WS, *pme3*, *pme17*, Col, *pmei4*, 35S:PMEI4::GFP) et chaque plante infestée (IWS, I*pme3*, I*pme17*, ICol, I*pmei4*, I35S:PMEI4::GFP), 3 prélèvements sont réalisés. Pour chacune de ces modalités, chaque prélèvement est constitué de 4 feuilles matures non sénescentes, excisées à la base des pétioles avec des ciseaux puis placées dans un tube Falcon de 15 mL (comportant donc 12 feuilles), plongé directement dans l'azote liquide. Deux voire trois répétitions biologiques (semis différents) sont effectuées dans les mêmes conditions que la première (**Tableau 13**).
Chaque prélèvement est ensuite broyé à froid à l'aide d'un broyeur à billes (Vibro-broyeur MM200, Retsch, Haan, Allemagne) pendant 20 s (25 mouvements par min). La poudre récupérée à l'aide d'une spatule est replacée dans son tube d'origine et stockée dans un congélateur à -80°C jusqu'à son utilisation.

2.2. Les méthodes de biochimie

2.2.1. Extractions des protéines pariétales

Deux protocoles d'extraction des enzymes pariétales sont utilisés au laboratoire, différant selon leur composition et notamment leur pH : pH 5 (d'après Baldwin *et al*. 2014) ou pH 7 (d'après Pilling *et al*. 2000). Afin d'extraire les protéines, 100 µL de tampon d'extraction pH 5 [acétate de sodium 50 mM + chlorure de lithium 1 M] ou 200 µL de tampon d'extraction pH 7 [phosphate disodique 50 mM, d'acide citrique 12,5 mM, de chlorure de sodium 1 M et de Tween20 0,01 %] sont ajoutés dans un microtube 1,5 mL contenant au préalable 50 mg de matériel végétal frais broyé. L'ensemble est maintenu sous agitation rotative (1 h, 250 rpm, 4 °C). Les tubes sont ensuite centrifugés (30 min, 14000 *g*, 4 °C). Les surnageants sont ensuite récupérés et placés dans de nouveaux microtubes à 4 °C. Les extraits protéiques obtenus après extraction à pH 7 sont directement utilisés pour doser l'activité PME.

Suite à l'extraction protéique à pH 5, les sels (chlorure de lithium) sont éliminés à l'aide d'un dispositif d'ultrafiltration Amicon Ultra 0,5 mL possédant un seuil de coupure de 10 000 Da (Millipore, Bellerica, MA, USA). Après avoir équilibré la colonne (500 µL de tampon phosphate

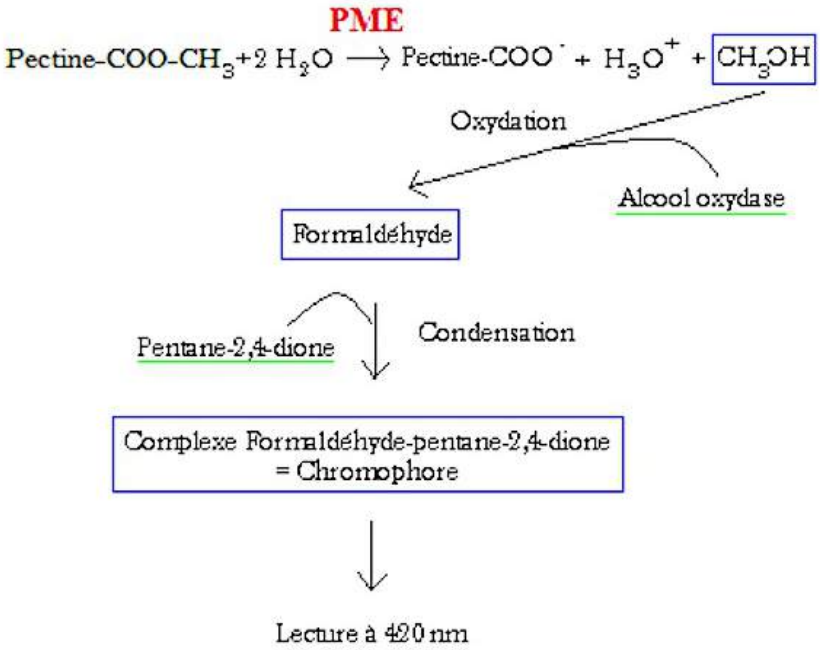


Figure 44 Schéma présentant le principe de dosage de l'activité PME : deux réactions couplées 1:1

50 mM pH 7), les tubes sont centrifugés (5 min, 13000 *g*, 4 °C) et le tampon se retrouvant au fond du tube est éliminé. Les 100 µL d'extrait protéique (extraction à pH 5) sont déposés sur la colonne, puis les tubes sont centrifugés (15 min, 13000 *g*, 4 °C). Les protéines retenues sur la membrane sont ensuite rincées deux fois par ajout de 200 µL puis 100 µL de tampon phosphate 50 mM pH 7,5, chaque ajout étant suivi d'une centrifugation (10 min, 13000 *g*, 4 °C). Chaque colonne est retournée dans un nouveau microtube 1,5 mL et le volume mort (environ 100 µL) retenu contenant les protéines est récupéré en centrifugeant (2 min, 1000 *g*, 4 °C). Les protéines contenues dans ce volume sont diluées avec 140 µL de tampon phosphate 50 mM pH 7,5 et conservées à 4 °C pour les mesures d'activité PME et PG.

2.2.2. Dosages protéiques

La quantité de protéines présentes dans les échantillons est mesurée par la méthode de Bradford (Klavons & Bennett 1986), avec un changement d'absorbance à 595 nm du réactif de Bradford, dû à la liaison du bleu de Coomassie aux résidus aromatiques des protéines. Le dosage des protéines des échantillons et de la gamme étalon est effectué en plaque 96 puits. Une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA) est réalisée à partir d'une solution mère de 0,1 $mg.mL^{-1}$. Cette gamme de concentration (6 points) est comprise entre 0 et 50 $\mu g.mL^{-1}$ pour le dosage des protéines extraites à pH 7 et 0 et 20 $\mu g.mL^{-1}$ pour celles extraites à pH 5. Les différents volumes de solution mère de BSA et de tampon phosphate pH 7,5 composant la gamme sont déposés en duplicat dans les puits. Ensuite, 2 µL d'extrait protéique (ou 2 µL de tampon d'extraction pour les blancs) sont déposés par puits en triplicat, ainsi que 158 µL de tampon phosphate 50 mM pH 7,5 et, après homogénéisation avec un agitateur de plaque Eppendorf MixMate, 40 µL de réactif de Bradford (*Biorad Protein Assay*). Après homogénéisation, la plaque est incubée (5 min, température ambiante) avant d'effectuer une lecture à 595 nm avec un lecteur de microplaques (Infinite® M1000, Tecan, Männedorf, Suisse). Les DOs obtenues pour la gamme permettent de déterminer la concentration en protéines :

$$[\text{Protéines}]\ (\text{en } \mu g.\mu L^{-1}) = [((\text{DO échantillon} - \text{DO blanc}) - b)/a] \times (Vf/Ve) \times (1/1000)$$

Avec [Protéines], la concentration en protéines ; a et b, les paramètres de l'équation de la gamme étalon de BSA ; Ve, le volume d'échantillon et Vf, le volume final du puits.

2.2.3. Mesures d'activité enzymatique

2.2.3.1. Pectine méthylestérases

Afin de doser l'activité PME, on dose la quantité de méthanol (CH_3OH), produit de l'action des PME sur les pectines méthylestérifiées **(Figure 44)**. Ce dernier est dosé directement suite à une seconde réaction enzymatique impliquant l'alcool oxydase dont le produit d'oxydation est le formaldéhyde (Nelson 1944 ; Green *et al.* 1989). C'est l'absorbance à 420 nm de ce dernier, sous la forme d'un complexe avec du 2,4-pentanedione (chromophore) qui est mesurée.

Le dosage est réalisé sur plaque 96 puits. Afin de déterminer l'activité PME, une gamme étalon utilisant le méthanol est réalisée à partir d'une solution mère à 15 mM. Cette gamme est comprise entre 0 et 150 nmol de méthanol (6 points). Les différents volumes de solution mère de

méthanol et de tampon phosphate 50 mM pH 7,5 [dihydrogénophosphate de sodium 50 mM + hydrogénophosphate de sodium 50 mM] composant la gamme sont déposés en duplicat dans les puits. Ensuite, 2 µL d'extrait protéique (ou 2 µL de tampon d'extraction pour les blancs) sont déposés par puits en triplicat. Dans chaque puits (gamme, échantillons, blancs), 5 µL de solution d'alcool oxydase (0,025 U, provenant de *Pichia pastoris*, Sigma) et 5 µL de solution de pectines (de citron, DM 90 %, Sigma) sont ajoutés. On complète alors avec du tampon phosphate 50 mM pH 7,5 pour obtenir un volume final de 100 µL.

Une fois les solutions ajoutées, la plaque est incubée (30 min, 28 °C), puis une lecture est effectuée à 420 nm (DO1). Dans chaque puits sont alors ajoutés 100 µl de solution de révélation [acétate d'amonium 2 M + 2,4-pentanedione 0,020 % + acide acétique pur 0,028 %]. La plaque est incubée (15 min, 68 °C), puis une deuxième lecture est effectuée à 420 nm (DO2). Afin de déterminer l'activité PME, les DO1 et DO2 des blancs sont respectivement soustraites aux DO1 et DO2 des échantillons et de la gamme. Ensuite, les DO1 sont soustraites des DO2 pour la gamme et les échantillons. Les DOs ainsi obtenues pour la gamme permettent de déterminer l'activité PME :

$$\text{Activité PME} = [((DO2-DO1)-b)/a] \times (1/Ve) \times (1/t) \times (1/[\text{Protéines}])$$

Avec [Protéines], la concentration en protéines ($\mu g.\mu L^{-1}$) ; a et b, les paramètres de l'équation de la gamme étalon ; Ve, le volume d'échantillon (2 µL) et t, la durée de la réaction (30 min).

2.2.3.2. Polygalacturonases

L'activité des polygalacturonases est calculée en dosant la quantité de monomères d'acide galacturonique issus de l'hydrolyse d'homogalacturonanes déméthylés (acide polygalacturonique, PGA) par les PG présentes dans l'échantillon. Le dosage est réalisé sur plaque 96 puits. Une gamme étalon utilisant l'acide galacturonique (GA) est réalisée à partir d'une solution mère à 5 mM. Cette gamme est comprise entre 0 à 25 nmol de GA (6 points). Les différents volumes de solution mère d'acide galacturonique et de tampon sodium acétate 50 mM pH 5 composant la gamme sont déposés en duplicat dans les puits. En plus de cette gamme, 50 µL sont déposés dans chaque puits (en triplicat) contenant les échantillons [12,5 µL d'extrait enzymatique + 12,5 µL de tampon sodium acétate 50 mM pH 5 + 25 µL de PGA 1 %] ou les blancs. Deux blancs différents sont effectués, un blanc sans enzyme permettant d'éliminer la DO liée au substrat PGA [25 µL de PGA 1 % + 25 µL de tampon sodium acétate 50 mM pH 5] et un sans PGA permettant d'éliminer la DO liée à l'extrait enzymatique [12,5 µL d'extrait enzymatique + 37,5 µL de tampon sodium acétate 50 mM pH 5].

Une fois les solutions ajoutées, la plaque est incubée (1 h, 37 °C), puis une lecture est effectuée à 620 nm (DO1). Dans chaque puits sont alors ajoutés 75 µL de réactif cuivrique composé de deux solutions à mélanger juste avant utilisation : solution A [carbonate de sodium 235,8 mM + tartrate de potassium et de sodium 88,5 mM + bicarbonate de sodium 238 mM + sulfate de sodium 1,4 M] et solution B [sulfate de cuivre pentahydraté 15 % (w/v) + une goutte d'acide sulfurique concentré]. La plaque est incubée (30 min, 80°C), puis 75 µL de réactif

arsenomolybdate [molybdate d'amonium tétrahydraté 40,4 mM + acide sulfurique concentré 4,2 %] sont ajoutés par puits. Une deuxième lecture est aussitôt effectuée à 620 nm (DO2).

Afin de déterminer l'activité PG, les DO1 et DO2 du blanc « sans enzyme » sont respectivement soustraites aux DO1 et DO2 des échantillons et de la gamme. Ensuite, les DO1 sont soustraites des DO2 pour la gamme et les échantillons. Les DOs ainsi obtenues pour la gamme permettent de déterminer l'activité PG dans les puits «Echantillon» et «Blanc Enzyme seule». La formule est présentée ci-dessous :

$$\text{Activité PG} = [((DO2-DO1)-b)/a] \times (1/Ve) \times (1/t) \times (1/[\text{protéines}])$$

Après avoir calculé l'activité PG dans ces puits, on effectue le calcul suivant afin de déterminer l'activité PG finale de chaque échantillon :

Activité PG finale = Activité PG «Enzyme + Substrat» - Activité PG «Blanc Enzyme Seule»

2.2.4. Etude des sucres pariétaux

2.2.4.1. Extraction des parois

La préparation des parois a été réalisée selon le protocole décrit par Carpita *et al.* (2001), permettant d'extraire les polysaccharides pariétaux non-cellulosiques (pectines, xyloglucanes) et éventuellement quelques protéines structurales comme les protéines à arabinogalactanes (AGPs). Les feuilles lyophilisées et congelées (120 mg) sont chauffées à 70 °C dans de l'éthanol 100 % (1,4 mL) pendant 15 min. Après centrifugation (5 min, 17 820 *g*, température ambiante), le surnageant est éliminé et un deuxième bain d'éthanol est réalisé dans les mêmes conditions. Après une seconde centrifugation (5 min, 17 820 *g*), le culot est suspendu dans 1,8 mL d'une solution de SDS 1 % - Tris-HCl 50 mM pH 7,2 puis chauffé à 70 °C pendant 30 min. Après refroidissement, les parois sont ensuite filtrées avec une membrane en nylon (pores de 41 µm ; Millipore, Billerica, MA, USA), rincées successivement grâce à un collecteur à filtration sous vide (Manifold modèle 1225 ; Millipore) avec de l'eau (3 fois), de l'éthanol 100 % (2 fois), de l'acétone 100 % (1 fois), de l'eau (3 fois) puis le résidu présent sur la membrane est mis en suspension dans 1 mL d'eau. Les parois sont alors décrochées de la membrane par une centrifugation (5 min, 17 820 *g*). Après élimination du surnageant puis congélation, les échantillons sont lyophilisés et conservés au sec.

2.2.4.2. Dégradation de l'amidon résiduel

Afin de ne quantifier que le glucose présent dans les extraits pariétaux, les grains d'amidon résiduels présents dans les échantillons sont hydrolysés selon le protocole décrit par Fleischer *et al*. (1999). Les parois lyophilisées (1 mg) sont homogénéisées dans un tampon phosphate monopotassique 100 mM pH 6,8 (100 µL). La digestion se déroule pendant 24 h à température ambiante avec une solution d'α-amylase (0,5 U/µL, 100 µg de *Bacillus subtilis* Type IIA ; Sigma, St. Louis, MO, USA). Après 18 h d'incubation, un deuxième ajout de solution d' α-amylase est réalisé dans les mêmes proportions que précédemment. Après la seconde digestion (6 h), les parois sont centrifugées (15 min, 13 500 *g*), le surnageant est éliminé et le culot rincé

avec de l'eau (3 fois), de l'acétone 100 % (2 fois) puis séché à température ambiante afin d'évaporer le reste d'acétone. Les parois sont ensuite congelées, lyophilisées puis conservées au sec.

2.2.4.3. Analyse des oses pariétaux par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance

L'identification et la quantification des monosaccharides des extraits pariétaux sont déterminées après une hydrolyse avec de l'acide trifluoroacétique (CF_3CO_2H) 4 M à 100 °C pendant 4 h (Banoub & Hodder 1985). L'hydrolysat obtenu subit ensuite une évaporation à l'azote avec un évaporateur multicanaux (Liebisch, Bielefeld, Germany), une suspension dans 1 mL d'eau ultrapure et une filtration avec des filtres à seringues Millex (pores de 0,22 µm ; Millipore) avant d'être injecté en chromatographie échangeuse d'anions à haute performance couplée à une détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD, Mopper *et al.* 1992 ; Panagiotopoulos *et al.* 2001). Les échantillons (25 µL) sont séparés par le système de chromatographie ionique Dionex ICS-3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) équipé d'une pré-colonne CarboPac PA1 (4 x 50 mm, Dionex) suivi par une colonne CarboPac PA1 (4 x 250 mm, Dionex) à 30 °C. Les solutions d'élution utilisées sont gazées avec de l'hélium. Pour l'étude des sucres neutres (arabinose : Ara, fucose : Fuc, galactose : Gal, glucose : Glc, rhamnose : Rha, xylose : Xyl), le gradient d'élution est réalisé en plusieurs étapes comme suit : 0-25 min, 90 % H_2O et 10 % NaOH 160 mM ; 25-35 min, 100 % NaOH 200 mM ; 35-50 min, 90 % H_2O et 10 % NaOH 160 mM, avec un débit constant de 1 $mL.min^{-1}$. Pour les sucres acides (acide galacturonique : GalA, acide glucuronique : GlcA), ceci est réalisé comme suit : 0-35 min 100 % NaOH 160 mM, 35-42 min, 100 % NaOH 160 mM, NaOAc 600 mM, avec un débit constant de 1 $mL.min^{-1}$. Les monosaccharides standards utilisés comme références sont le D-Ara, L-Fuc, D-Gal, D-Glc, L-Rha, D-Xyl, D-GalA et D-GlcA.

L'analyse des chromatogrammes (intégration des pics) est effectuée avec le logiciel Chromeleon version 6.8 (Dionex). Les quantités de chaque monosaccharide, exprimées en pourcentage molaires (% mol) sont calculées avec Excel (Microsoft Office 2011) pour les parois extraites de chaque plante. Deux répétitions biologiques sont effectuées, avec deux répétitions techniques chacune. Les 4 valeurs obtenues d'une modalité sont comparées aux 4 valeurs d'une autre (exemple : plants témoins *vs* infestés) par un test *t* de Student.

2.2.5. Etude des liaisons chimiques de parois de broyats foliaires

Les échantillons solides (20 mg de feuilles fraîches congelées) sont incubées dans de l'éthanol 90 % à 60 °C pendant 15 min. Après centrifugation (14000 *g* -10 min), le surnageant est jeté et deux autres incubations sont réalisées dans les mêmes conditions. Les échantillons sont ensuite séchés toute une nuit à 37 °C puis conservés à température ambiante avant d'être analysés par spectrométrie infra-rouge à transformée de Fourier (FT-IR). La FT-IR permet, via la détection des vibrations caractéristiques de liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse quantitative des fonctions chimiques présentes dans un échantillon, incluant les esters carboxyliques, esters phénoliques, les amides des protéines, les acides carboxyliques (Chen *et al.* 1998).

L'acquisition des spectres d'absorption FT-IR de 4000 à 700 cm^{-1} est réalisée par un spectromètre IR Prestige-21 (Shimadzu, Japon) en mode ATR (réflectance totale atténuée) avec

le logiciel IR Solution (Shimadzu). Pour un spectre, 100 interférogrammes sont collectés en mode transmission avec une résolution de 8 cm^{-1} Pour chaque type de plante (WT, mutant ou surexpresseur) infestée ou non, 5 à 6 spectres sont collectés et moyennés avec correction de la ligne de base. Les données sont analysées statistiquement avec un test *t* de Student (Excel, Microsoft), reflétant les différences significatives entre deux modalités (exemple : plants sauvage/mutant, infesté/non infesté). Un graphique représentant la valeur *t* du test (axe *y*) et les nombres d'onde (axe *x*) a été créé. Un seuil de significativité de ces différences à P = 0,95 a été défini selon la table des valeurs critiques du test *t* (seuil représenté par deux lignes rouges). Les variations se trouvant en dehors de ces deux lignes sont significativement différentes entre les deux modalités testées. Pour une comparaison (plantes modalité 1/ plantes modalité 2), les valeurs positives ou négatives indiquent respectivement un appauvrissement ou un enrichissement pour les plantes de la modalité 1.

2.3. Les méthodes de biologie moléculaire

2.3.1. Etudes génomiques

2.3.1.1. Analyse transcriptomique

2.3.1.1.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN est réalisée d'après une méthode adaptée de Verwoerd *et al*. (1989) et Gehrig *et al*. (2000). Les feuilles récoltées (200 mg) sont et broyées avec de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et homogénéisées (10 min, température ambiante) dans un tube 14 mL en polypropylène (Greiner bio-one, Frickenhausen, Allemagne) contenant 2 mL de tampon d'extraction [Tris-HCl pH 8 100 mM, LiCl 100 mM, EDTA pH 8 10 mM, SDS 5 %, PEG 8000 2 %]. Afin de précipiter les polysaccharides et les polyphénols, une centrifugation est effectuée (10 min, 12 000 *g*, température ambiante), le surnageant est transféré dans un nouveau tube en polypropylène et mélangé à 2 mL de phénol chaud (80 °C). Après une homogénéisation au vortex (30 s), 2 mL de chloroforme - alcool isoamylique (24:1) sont ajoutés. Après une deuxième homogénéisation au vortex (20 s) et une centrifugation (10 min, 12 000 *g*, 4 °C), un volume de surnageant est transféré dans un nouveau tube et mélangé à un volume de LiCl 4 M. Après une précipitation durant la nuit à 4 °C, les ARN sont collectés par centrifugation (30 min, 12 000 *g*, 4 °C). Le culot est dissous dans 125 µL d'eau ultrapure et transféré dans un tube Eppendorf 1,5 mL, avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et 2 volumes d'éthanol 100 %. Après congélation (1 h, -80 °C), une centrifugation est effectuée (20 min, 12 000 *g*, 4 °C). Le culot est ensuite lavé avec de l'éthanol 82 %, centrifugé (10 min, 12 000 *g*, 4 °C), séché et suspendu dans 22 µL d'eau ultrapure.

Les ARN purifiés sont quantifiés en déposant 1 µL d'échantillon sur un spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Le degré de pureté des ARN est estimé par la mesure de la densité optique à 260 nm (maximum d'absorption de l'ADN) rapportée à celle mesurée à 280 nm (maximum d'absorption des protéines). Ce rapport doit être proche de 2,0 pour les ARN. Si tel est le cas, la concentration de l'ARN peut être alors évaluée puisqu'une densité optique de 1 à 260 nm correspond à 40 µg d'ARN par mL. L'intégrité des ARN est

évaluée par migration électrophorétique sur puce à ARN (RNA Standard Sens Analysis kit) avec la station d'électrophorèse automatique Experion™ suivant les recommandations du fournisseur (Bio-Rad).

2.3.1.1.2. Production d'ADNc double-brin

Les ADNc double-brin sont synthétisés à partir des ARN totaux (20 µg) à l'aide du kit cDNA Synthesis System (version 22.0) suivant les recommandations du fournisseur (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne). La production comprend 5 étapes : (1) la synthèse du premier brin en utilisant 20 µg d'ARN totaux, 400 pmol d'amorces oligo-dT et 50 U de Reverse Transcriptase AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*), (2) la synthèse du second brin par les ADN polymérases I et T4, une ligase d'*E. coli* et une ribonucléase H, (3) une digestion des ARN résiduels avec 15 U de RNAse I, (4) une purification des ADNc au phénol, chloroforme, alcool isoamylique et (5) précipitation des ADNc double-brin avec 0,1 volume d'acétate d'ammonium et du glycogène à 5 $mg.mL^{-1}$. L'intégrité des ADNc est évaluée par migration électrophorétique sur une puce à ADN (kit DNA 12 K Analysis) avec l'Experion™ suivant les recommandations du fournisseur (Bio-Rad).

2.3.1.1.3. Acquisition et traitement des données de puces à ADN

Dans un premier temps, les ADNc produits (1 µg) sont marqués avec un fluorochrome, la cyanine Cy3 (fluorescent dans le vert à 532 nm). Cette réaction de marquage est réalisée grâce à des amorces aléatoires 9-mers marquées Cy3, 10 mM de chaque dNTP et le fragment de Klenow (ayant une activité polymérase 5' -> 3' et une activité exonucléase 3' -> 5') suivant les recommandations du fournisseur (Roche), « *NimbleGen arrays user's guide, gene expression analysis version 3.2*». Après purification, les ADNc marqués sont remis en suspension dans 25 µL d'eau ultrapure. Leur concentration est mesurée au Nanodrop 1000 afin de réaliser des aliquotes de 4 µg d'ADNc par tube, aliquotes qui sont ensuite déshydratées.
L'étape suivante consiste en l'hybridation des ADNc marqués sur les lames de microarray et leur lavage (cf. chapitre 4 du guide NimbleGen précédemment cité). Les ADNc double-brin marqués (4 µg) sont remis en suspension dans 3,3 µL d'une solution acqueuse contenant un « *Sample Tracking Control* (STC) », oligonucléotide spécifique Les échantillons sont alors déposés sur deux puces à ADN (25 mm x 76 mm) 12x135K *NimbleGen Gene Expression* (Roche) comprenant chacune douze sections. Douze STC différents permettent l'identification de chaque échantillon dans chacune des sections de la puce. Les échantillons sont déposés sur les lames de microarray selon le plan expérimental choisi. Sur chaque puce, chacune des 12 sections (d'une surface d'environ 1 cm^2) contient 135 000 oligonucléotides (60-mers) représentant 39 042 gènes d'*A. thaliana* (TAIR10). L'hybridation d'effectue à 42 °C dans une chambre d'hybridation (*Hybridation System*, Roche), durant 16 à 20 h d'incubation, puis les lames sont finalement lavées dans trois bains différents sous agitation constante et séchées par centrifugation.
La lecture des lames est réalisée à l'aide d'un scanner GenePix 4000 (Axon/Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) et du logiciel GenePix Pro version 7.0 (Axon). Les lames sont scannées à une résolution de 2,5 µm par pixel. Les images scannées (format TIFF) sont ensuite importées dans le logiciel NimbleScan (Roche) et pour chaque image une vérification est effectuée de l'alignement correct entre les repères contrôles (STC) et la grille patron. Pour chaque fichier

Tableau 14 Liste des gènes étudiés par RT-PCR quantitative

Gène	Abréviation	Nom	Remarque
AT2G45220	*PME 17*	Pectin Methylesterase 17	
AT3G14310	*PME 3*	Pectin Methylesterase 3	
AT4G25250	*PMEI 4*	Pectin Methylesterase Inhibitor 4	
AT1G32940	*SBT3.5*	Subtilase 3.5	
AT3G52430	*PAD4*	Phytoalexine Deficient 4	voie salicylate (SA, début)
AT3G48090	*EDS1*	Enhanced Disease Susceptibility 1	voie SA (début)
AT1G74710	*SID2*	Salicylic acid Induction Deficient 2	voie SA (milieu)
AT2G14610	*PR1*	Pathogenesis Related protein 1	voie SA (fin)
AT1G17170	*GSTU24*	Glutathione S-Transférase	Potentiel redox, SA-dépendent
AT3G45140	*LOX2*	Lipoxygenase 2	voie jasmonate (JA, début)
AT1G76680	*OPR1*	Oxophytodienoate Reductase 1	voie JA (milieu)
AT5G44420	*PDF1.2a*	Plant Defensine 1.2	voie JA / éthylène (fin)
AT5G60390	***EF1α***	**Elongation Factor 1**	**gène de référence**
AT1G27450	***GAPC2***	**glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2**	**gène de référence**

image, un fichier « .pair » est créé, contenant les intensités brutes de toutes les sondes associées à chaque gène de la puce. La qualité globale de l'expérience de microarray est dans un premier temps évaluée en suivant le « *NimbleScan v2.5 User's Guide* » (Roche). Avant d'effectuer l'analyse statistique des données, une normalisation est nécessaire. Cette normalisation permet de retrancher le bruit de fond et également de calibrer les distributions des niveaux de fluorescence du Cy3 (532 nm) de chaque expérience (les différentes sections des deux lames). La méthode choisie par NimbleGen pour normaliser les données est la méthode RMA (Robust Multiarray Average, Irizarry *et al.* 2003). Cette méthode, basée sur l'ajustement moyen des quantiles des distributions de fluorescences (toutes les réactions sont ramenées à une même moyenne et une même variance : réduction des variations intra-puces) est très efficace d'une part pour détecter les faibles valeurs d'intensité de signal (grâce à l'élimination du bruit de fond) et d'autre part pour éliminer les variations d'hybridation entre les sections de chaque lame (réduction des variations inter-puces). Après normalisation, les valeurs d'intensité d'expression associées à chaque gène sur la puce sont disponibles pour les tests statistiques (valeurs linéaires).

Afin de révéler les différences d'expression des gènes entre les différents niveaux de comparaison, une ANOVA à un facteur est réalisée sur les données normalisées. Par exemple, pour le premier niveau de comparaison, la variance intergroupe (entre WS et *pme17* non infestés) est comparée à une variance intragroupe (entre les 3 réplicats). Les ANOVA, ainsi que le traitement *post-hoc* des données sont effectués avec le logiciel libre ANAIS (*Analysis NimbleGen Arrays Interface Suite*) (Simon & Biot 2010). Pour effectuer correctement les comparaisons multiples et identifier la proportion de faux-positifs parmi les gènes identifiés comme étant différemment exprimés suite aux ANOVA réalisées, une des méthodes spécialement adaptées aux études du génome entier est utilisée : le taux de fausses découvertes ou FDR (False Discovery Rate, Benjamini & Hochberg 1995), déjà utilisé pour des puces à ADN étudiant un stress aphidien. Un seuil de 5 % de faux positifs dans l'ensemble des analyses est fixé. Les p-valeurs issues de l'ANOVA sont alors transformées en q-valeurs après application du FDR. Au final, les transcrits avec une q-valeur < 0,05 et présentant un facteur de variation de niveau d'expression de plus de 2 sont considérés comme exprimés de façon différentielle et significative.

2.3.1.2. Analyse de l'expression des gènes de défense

Nous avons choisi d'étudier l'expression de plusieurs gènes d'intérêt (**Tableau 14)**, 4 codant des protéines pariétales (*PME17*, *PME3*, *PMEI4*, *SBT3.5)*, 8 codant des protéines impliquées dans les mécanismes de défense (*EDS1*, *PAD4*, *SID2*, *GSTU24*, *LOX2*, *OPR1*, *PDF1.2a*, *PR1*) et 2 codant des protéines de référence (EF1α, GAPC2). Les 2 gènes de référence sont choisi avec le logiciel GeNorm Plus (Vandesompele *et al.* 2002), parmi 10 gènes habituellement utilisés chez *A. thaliana*. Le logiciel indique que c'est l'expression de ces 2 gènes qui varie le moins en fonction des différents plants sauvages et transgéniques utilisés et les différentes modalités (plants témoins/infestés).

2.3.1.2.1. Extraction des ARN totaux

Pour quantifier les ARN correspondants par RT-PCR quantitative (*Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*), les ARN totaux des échantillons foliaires (ARNr, ARNm) sont extraits à l'aide du kit TRIzol Reagent (Invitrogen). Dans chaque tube contenant 100 mg de matériel végétal frais broyé, est ajouté 1 mL de TRIzol. Après mélange et incubation (5 min, température ambiante), 0,2 mL de chloroforme est ajouté. L'ensemble est vigoureusement agité manuellement (15 s) et incubé (2 min, température ambiante). Une centrifugation (15 min, 12 000 *g*, 4 °C) permet de récupérer les ARN dans la phase aqueuse. Cette phase est alors transférée dans de nouveaux tubes et 0,5 mL d'alcool isopropyle est ajouté. L'ensemble est incubé (10 min, température ambiante), puis centrifugé (10 min, 12 000 *g*, 4 °C) afin de précipiter les ARN. Le surnageant est éliminé et les ARN précipités sont mélangés à 1 mL d'éthanol 75 % afin de les purifier. Le tout est mélangé au vortex et centrifugé (5 min, 7500 *g*, 4 °C). Le surnageant est éliminé et les ARN précipités et lavés sont séchés (5-10 min, température ambiante). Les ARN sont dissouts dans 50 µL d'eau RNAse-free, puis incubés (10 min, 55-60 °C). Les ARN sont alors conservés temporairement dans de la glace si leur utilisation est poursuivie ou à -80 °C.

La présence d'ARN dans les extraits est ensuite vérifiée par électrophorèse, en déposant 2 µL d'ARN et 2 µL de bleu de charge (6X) sur un gel d'agarose (0,8 g d'agarose, 7,5 µL de bromure d'éthidium, 100 mL de tampon TRIS-Acétate-EDTA à 0,5X) et en faisant migrer dans le tampon de charge (15 min, 100 mV). La révélation du gel se fait grâce à l'appareil Gel Doc 2000 (Biorad). Par ailleurs, la concentration en ARN de chaque échantillon (1 µL) est déterminée grâce au rapport 260nm/280nm sur le Nanodrop 1000.

Les éventuelles traces d'ADN présentes dans les solutions d'ARN extraits sont éliminées à l'aide du kit TURBO DNA-free™ (Applied Biosystems). Dans chaque tube contenant un volume V d'ARN extraits, 0.1 V de tampon 10X TURBO DNAse et 1 µL de TURBO DNAse (enzyme) sont ajoutés. Après mélange à la pipette et par retournement manuel, les tubes sont incubés (25 min, 37 °C). 0,1 V de Réactif d'inactivation de la DNAse est alors ajouté. Pendant l'incubation (5 min, température ambiante), les séquences d'ADN éventuellement présentes vont se fixer sur les petites billes du réactif. Après centrifugation (2 min, 10 000 *g*), les ARN présents dans le surnageant sont transférés dans de nouveaux tubes et les billes du réactif sont éliminés. Les ARN présents dans le surnageant sont alors purifiés de tout contaminant nucléique et sont transférés dans de nouveaux tubes et stockés à -80 °C jusqu'à utilisation.

2.3.1.2.2. Production de l'ADNc simple-brin

L'ADNc des ARN extraits est produit grâce à une ADN Polymérase thermostable, la *Taq* polymérase (***T****hermus* ***aq****uaticus* polymerase) et au kit SuperScript™ III First-Stand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Paisley, Royaume-Uni). Dans des tubes posés sur de la glace, sont ajoutés n µL de solution contenant 3 µg d'ARN extraits, 1 µL de primer et 1 µL d'*annealing buffer* (tampon). Si le volume total (n + 1 + 1) est inférieur à 8 µL, le mélange est complété avec de l'eau RNAse-free jusqu'à ce que le volume atteigne 8 µL. Les tubes sont ensuite incubés (5 min,

Tableau 15 Amorces spécifiques gauche et droite de chaque gène étudié par PCR et/ouRT-PCR quantitative

Gène	Abréviation	Amorce gauche	Amorce droite
At1g32940	*SBT3.5*	5'-TCTACAAGGTCGTGGTCGAG-3'	3'-GCGTTCTCACAGACACAGGA-5'
At2g45220	*PME 17*	5'-GAGAGGTGATGGTATAGGGA-3'	3'-GAGCTGTGATTGTGTTGGTC-5'
At3g14310	*PME 3*	5'-ACGGTAGCACCACTTTCCAC-3'	3'-GTCACAGTCTTGGAGCACGA-5'
At4g25250	*PMEI 4*	5'-TTGCGTTTCGTGGTACTCTC-3'	3'-GTAGTTTTCCCTCCGCCTCT-5'
At1g32940	*SBT3.5*	5'-TCTACAAGGTCGTGGTCGAG-3'	3'-GCGTTCTCACAGACACAGGA-5'
At3g52430	*PAD4*	5'-ATAGTGTGTGGGAGGCGAAT-3'	3'-TGCATAAACATGATGAACAACAA-5'
At3g48090	*EDS1*	5'-GTGGATTACGCTTCCCAAAA-3'	3'-TCATGAAGTGGAAACCAGATTG-5'
At1g74710	*SID2*	5'-TGAAGCAACAACATCTCTACAGG-3'	3'-GGCCTGCCCTAGTTACAACC-5'
At2g14610	*PR1*	5'-TCAGTGAGACTCGGATGTGC-3'	3'-CATCCTGCATATGATGCTCCT-5'
At1g17170	*GSTU24*	5'-GCCAAAAGGTGTTTGGAGAG-3'	3'-CCTCAAAGAAAATAGAACAAAGCA-5'
At3g45140	*LOX2*	5'-TGGAGGGCATAACTTGGTCGAG-3'	3'-TGCGTAGTCTTCTACCGTAATCCG-5'
At1g76680	*OPR1*	5'-TGATCCAGTCGTCGGTTACA-3'	3'-TGTCCGTGGAAATTTTTGTG-5'
At5g44420	*PDF1.2a*	5'-ATGGCTAAGTTTGCTTCC-3'	3'-TTAACATGGGACGTAACAGATAC-5'
At5g60390	***EF1α***	**5'-TGGTGACGCTGGTATGGTTA-3'**	**3'-TCCTTCTTGTCCACGCTCTT-5'**
At1g13440	***GAPC2***	**5'-CGCATGGAATCAGTGAAAAA-3'**	**3'-TCGTGTCGTTGACCTTATCG-5'**

Gras : gènes de références utilisés

65 °C), puis placés immédiatement dans la glace pendant au moins 1 min. Après une brève centrifugation, sont ajoutés dans les tubes posés sur la glace, 10 µL du mélange 2X *First-Stand-reaction* et 2 µL du mélange enzymatique Superscript III/RNAseOUT. Les échantillons sont alors vortexés puis centrifugés brièvement. Après deux incubations (50 min, 50 °C, puis 5 min, 85 °C), les échantillons sont conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour la PCR.

Les séquences d'ADNc présentes dans les tubes sont amplifiées par PCR. Pour cela, dans chaque tube PCR sont déposés 2 µL de solution d'ADNc diluée au 1/20ème et 18 µL du mélange réactionnel [2 µL de tampon de réaction Diamond Taq 10X, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de chaque dNTP (Invitrogen), 0,25 µM de chaque amorce EF1α (amorces gauche et droite, **Tableau 15**), 0,05 U de Diamond Taq polymerase (Eurogentec)]. Les tubes PCR ainsi qu'un tube témoin de même composition mais contenant un ADNc connu sont placés dans le thermocycleur (Thermal Cycler, Bio-Rad) qui effectue 40 cycles d'amplification des séquences d'ADNc. Après une dénaturation des deux brins (5 min, 94 °C), chaque cycle est constitué des étapes de dénaturation (30 s, 94 °C), d'hybridation des amorces nucléotidiques avec une séquence d'ADNc cible (20 s, 60 °C) et d'élongation par la *Taq* polymérase à partir des amorces présentes dans le mix (1 min, 72 °C). Une migration par électrophorèse sur gel d'agarose permet ensuite de vérifier que l'ADNc est bien présent et peut-être amplifié (même protocole que pour la vérification de la présence des ARN).

2.3.1.2.3. Amplification de l'ADNc par qRT-PCR

Enfin, l'ADNc produit est quantifié par RT-PCR quantitative à l'aide du LightCycler 480 Instrument (Roche), de plaques 384 puits Lightcycler 480, de feuilles de scellage et du mix PCR Lightcycler 480 SYBR Green I Master (Roche), en quatre étapes :

- 1 cycle de pré-incubation qui permet l'activation de la Taq Polymérase et la dénaturation de l'ADN, (5 min, 95 °C)
- 45 cycles d'amplification de l'ADNc, avec pour chaque cycle : dénaturation 10 s à 95 °C, hybridation 20 s à 60 °C et élongation 15 s à 72 °C
- 1 cycle de « *melting curve* » qui permet d'estimer la taille et le nombre de produits PCR, 5 s à 95 °C, 1 min à 65 °C et 97°C en fin de cycle
- 1 cycle de refroidissement de la plaque, 10 s à 40 °C

Pour vérifier l'efficacité des amorces de chaque gène étudié, une gamme de dilution de l'ADNc pour chaque couple d'amorces est réalisée (1/20ème, 1/60ème, 1/180ème, 1/540ème, 1/1620ème) et testée en triplicat avec un des échantillons traités dans les étapes précédentes (ADNc). Dans chaque puits sont ajoutés 5 µL de Master Mix, 0,5 µL de chaque amorce d'un gène (10 µM), 1,5 µL d'eau ultrapure et 2,5 µL d'ADNc. Une fois remplie, la plaque est protégée par une feuille de scellage, puis centrifugée (*short run*) avec une centrifugeuse à plaques Eppendorf 5430. La plaque est alors déposée dans le Lightcycler 480 qui est mis en fonctionnement.

Les efficacités de chaque gène sont calculées à l'aide du logiciel LightCycler 480 (version 1.5) et sont indispensables pour quantifier l'expression des gènes dans chaque échantillon. Pour les

calculer, les moyennes des cycles seuils (*cycle threshold*, CT) en fonction de la quantité d'ADN initiale de tous les dupliqués de gamme sont reportées dans un repère semi-logarithmique. La pente (a) de la régression linéaire est utilisée pour calculer l'efficacité (Efficacité $E = 10^{(-1/a)}-1$) avec $10^{(-1/a)}$ = Amplification exponentielle. Seules les amorces qui ont une efficacité supérieure à 80 % sont conservées pour quantifier l'expression des gènes cibles et des gènes de référence dans les échantillons. La quantification se fait, comme pour la détermination des efficacités, sur des plaques 384 puits. La composition de chaque puits est la même que pour celle utilisée pour tester l'efficacité, chaque échantillon étant testé en duplicat avec chaque couple d'amorces. A l'issue de la quantification, on obtient la valeur des CT pour chaque échantillon et pour un gène donné. On détermine alors l'expression des gènes grâce à la formule $Ec^{\Delta CT} / Er^{\Delta CT}$ avec Er = Efficacité du gène de référence, Ec = Efficacité du gène cible et ΔCT = différence entre les valeurs des cycles seuils (CT) des deux échantillons à comparer.

2.3.2. Etudes microscopiques

Coloration GUS

Les colorations des plants PME3::GUS sont basées sur le protocole de Sessions *et al*. (1999). Les feuilles de plants âgés de 4 semaines, infestés par 10 adultes *M. persicae* ou non infestés, sont récoltées et directement colorées. Les tissus sont dans un premier temps préfixés dans de l'acétone 80 % préalablement conservé à -20 °C, pendant 20 min à -20 °C, puis rincés 3 fois à l'eau distillée. Dans un deuxième temps, les tissus sont infiltrés sous-vide (pompe WP6122050, Millipore) pendant 10 min avec une solution de coloration [tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,0, Triton-X-100 0,1 %, ferrocyanure de potassium 0,5 mM, ferricyanure de potassium 0,5 mM, 1 mM de X-Gluc (dissous dans du diméthylsulfoxyde, DMSO)]. Après une incubation (une nuit, 37 °C), les feuilles sont rincées par un bain d'éthanol 70 % puis stockés à 4 °C avant les observations.

Fixation et inclusion en paraffine

Après coloration GUS, les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de concentrations décroissantes et fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4 % + saccharose 1 %+ Tween20 0,5 % (dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,4). La fixation débute par une infiltration sous vide de 2 x 30 min puis pendant une nuit à 4°C.

Après fixation, les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (20 à 100 %). Une imprégnation progressive est réalisée par passage dans différents mélanges Safesolv (substitut non toxique du xylène ; Labonord) / éthanol absolu de concentrations croissantes en Safesolv (33 à 67 %) puis dans un bain Safesolv / paraffine (Paraplast) pendant 1 h à 56 °C, les échantillons sont ensuite placés dans un bain de paraffine pure pendant une nuit à 56 °C avant d'être inclus définitivement dans des moules conservés à 4 °C.

Coupes et observations

Des coupes de 10 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome (de Minot). Les lames sont déparaffinées dans 2 bains de Safesolv, puis dans des bains successifs d'éthanol de concentrations décroissantes et de 2 bains d'eau ultra pure.

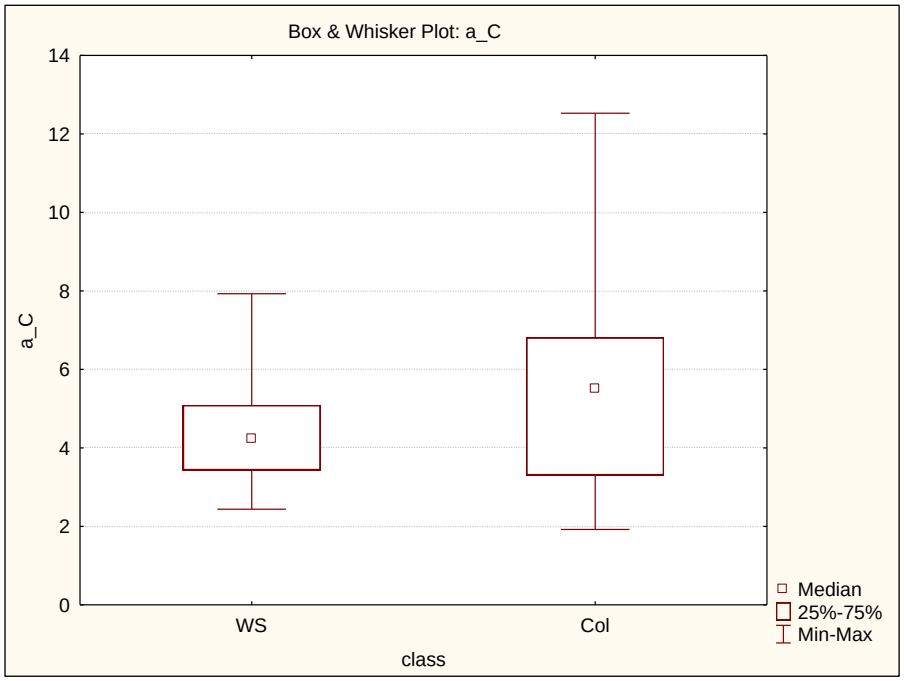


Figure 45 Diagramme en boîtes à moustaches représentant la dispersion des données d'une variable
La variable a_C est décrite, représentant la durée moyenne mise par le puceron *M. persicae* pour atteindre les tubes criblés des plants *A. thaliana* WS ou Col. Figure réalisée avec le logiciel STATISTICA (Statsoft Inc 2008).

Après séchage, les lames sont colorées au rouge de ruthénium à 0,02% pendant 2 min (ruthénium red, technicalgrade, SIGMA Aldricht), après montage, les coupes sont observées à l'aide d'un microscope Nikon-Eclipse-90i (Nikon).

2.4. Les analyses statistiques

Les analyses descriptives ont été effectuées avec le logiciel R version 2.14 (R Core Team 2011) et les analyses inférentielles avec le logiciel STATISTICA version 8.0 (StatSoft Inc 2008).

2.4.1. Analyses descriptives

2.4.1.1. Boîtes à moustaches

Le diagramme en boîte à moustaches (ou boîte de Tukey) est un moyen rapide de caractériser graphiquement la dispersion des données d'une variable dans deux groupes d'observations différents. Ce diagramme résume quelques paramètres de position de la variable étudiée : la médiane, les premier et troisième quartiles, les valeurs minimale et maximale (**Figure 45**). Sur un diagramme, 25 % des données sont inférieures ou égales à la valeur du premier quartile et 75 % inférieures ou égales au troisième quartile.

2.4.1.2. Analyses en composantes principales

L'analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode d'analyse multivariée permettant d'extraire des informations à partir d'un tableau (matrice) présentant un certain nombre de variables quantitatives (colonnes) observées sur un certain nombre d'observations (lignes). L'ACP construit de nouvelles variables par combinaison linéaire des variables initiales, appelées composantes principales, non corrélées et qui permettent de synthétiser l'essentiel de l'information présente dans le tableau, en ayant la plus grande variance possible. Les composantes avec des valeurs propres supérieures à 1 sont présentées dans toutes les analyses ACP réalisées (critère de Kaiser ainsi respecté). A l'issu d'une ACP, sont représentés graphiquement d'une part les variables (en fonction de leurs corrélations) et d'autre part les observations (sur un plan à deux dimensions à définir au préalable). Sur le graphique des corrélations entre variables, établie d'après la répartition des observations testées, il est possible d'identifier des variables positivement corrélées entre elles (vecteurs des variables dirigés dans la même direction et le même sens), négativement corrélées (vecteurs opposés à 180°) ou indépendantes (vecteurs perpendiculaires). Sur le graphique de corrélation des observations obtenu, comme pour les variables, la distance entre les points traduit l'intensité de l'association (plus les individus sont éloignés, moins ils ont tendance à être associés), permettant ainsi d'identifier des groupes homogènes d'observations ou au contraire des observations atypiques. Les packages « ade4 » et « FactoMineR » du logiciel R ont été utilisés pour générer ces graphiques (Lê *et al.* 2008). Pour le choix des gènes PME et PMEI étudiés, des ACP sont réalisées afin de distinguer l'impact de stress biotiques et plus particulièrement d'une infestation aphidienne sur leur expression (données publiques). Des analyses descriptives sont effectuées sur les données EPGs afin de mieux appréhender la répartition des données caractérisant le

comportement trophique des pucerons étudiés (boîtes à moustaches et analyses en composantes principales).

2.4.2. Analyses inférentielles

2.4.2.1. Tests paramétriques

Pour réaliser un test paramétrique, des conditions d'application doivent être respectées (normalité de la distribution des données d'un groupe et homoscédasticité). Parmi les différentes méthodes existantes pour tester la normalité de la distribution des données d'un groupe au sein d'une variable, le test de Shapiro-Wilk est réalisé (H_0 = distribution normale ; H_1 = distribution non normale), avec un risque d'erreur α de 5 % (probabilité de se tromper en adoptant l'hypothèse nulle). Si H_1 est acceptée ($P < 0,05$), l'hypothèse de normalité de la distribution des données doit être rejetée. Parmi les différentes méthodes existantes pour tester l'homogénéité des variances au sein d'une variable, le test de Levène est réalisé sur les écarts absolus des valeurs aux moyennes des groupes respectifs (H_0 = variances homogènes ; H_1 = variances hétérogènes), avec un risque α de 5 %. Si H_1 est acceptée ($P < 0,05$), l'hypothèse d'homogénéité des variances doit être rejetée.
Les conditions requises pour un test paramétrique peuvent parfois être atténuées selon la robustesse du test choisi, définie comme sa capacité à supporter des écarts aux hypothèses concernant la normalité de la distribution ou l'homogénéité des variances. L'ANOVA présente une grande robustesse au niveau de la normalité (des écarts peuvent être tolérés) mais une faible robustesse pour l'homoscédasticité (pas d'écarts possibles).
Pour appliquer un test paramétrique, il est aussi nécessaire de pouvoir estimer des paramètres statistiques pour chaque groupe au sein d'une variable comme la moyenne et son erreur standard (SE). L'erreur standard est considérée comme l'écart type de la distribution théorique de toutes les erreurs qui seraient commises en faisant varier les échantillons avec lesquels on opère.
Après vérification des conditions d'application, les moyennes des différents groupes d'une variable sont comparées par un test *t* de Student ou par une analyse de variance (ANOVA) à un facteur de décomposition suivie d'un test *post-hoc* (Test de Tukey) selon le nombre de groupes à comparer.
Les données issues des suivis physiologiques effectués sur les aphides sont testées statistiquement à l'aide d'un test *t* de Student ou d'une analyse de variance (ANOVA) pour chaque paramètre. Celles issues des analyses de l'expression des gènes en qRT-PCR sont traitées par un test *t* de Student.
Par exemple afin de tester l'effet d'un facteur (exemple : « type de plants d'*A. thaliana* ») contenant 2 groupes (exemple : « WS » et « Col») sur différents paramètres étudiés (exemple : « fécondité journalière d'un puceron »), un test *t* de Student est réalisé pour chaque paramètre, avec un risque α de 5 %. Ainsi, dans les résultats, un test est dit significatif (*) si la p-valeur associée est comprise entre 0,05 et 0,01, hautement significatif (**) pour une p-valeur comprise entre 0,01 et 0,001 et très hautement significatif (***) pour une p-valeur inférieure à 0,001.
S'il y a plus de 2 groupes à comparer (exemple : « WS », « *pme17* », « *pme3* »), une ANOVA à un facteur est réalisée pour chaque paramètre (H_0 = égalité des moyennes ; H_1 = au moins une moyenne est différente), avec un risque α de 5 %. Si H_1 est acceptée, les moyennes sont ensuite

comparées deux à deux à l'aide d'un test *post-hoc*, le test de Tukey HSD (*Honnestly Significant Differences*), avec un risque α de 5 %.

2.4.2.2. Tests non paramétriques

Si les conditions d'application ne sont pas respectées, leurs moyennes sont comparées par un test de Mann-Whitney (si 2 groupes) ou par un test de Kruskal-Wallis (si plus de 2 groupes) suivi d'un test *post-hoc* de comparaisons multiples des moyennes (Scherrer 1984).
Pour l'étude du comportement trophique des différents pucerons, chaque paramètre est comparé statistiquement entre les plantes mutantes ou surexpresseur (*pme3*, *pme17*, *pmei4* ou 35S:PMEI4::GFP) et leur écotype de référence (WS ou Col). Les données issues de l'EPG étant non paramétriques, les tests de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis sont utilisés. Enfin, les données issues des mesures d'activités PME et PG sont analysées avec un test de Mann-Whitney. Le nombre d'échantillons étudiés étant très important, les dosages sont effectués sur plusieurs plaques, avec à chaque fois un témoin commun entre elles. Pour faciliter les comparaisons, une présentation des activités PME et PG en valeur relative sur un même graphe est réalisée.

Chapitre 3. Résultats

Après avoir abordé l'importance de la paroi végétale dans les interactions plante-puceron et les différentes expérimentations effectuées pour étudier cette interaction, l'ensemble des résultats concernant l'implication de PME ou d'inhibiteur de PME (PMEI) dans les interactions *Arabidopsis thaliana-Myzus persicae*, va être présenté. L'approche multidisciplinaire consiste à étudier l'effet de modifications de l'expression de PME ou PMEI par génétique inverse, d'une part sur la biologie du puceron *M. persicae* et d'autre part sur la physiologie de la plante lors de l'infestation aphidienne. Les plantes transgéniques utilisées sous-expriment ou surexpriment des PME, PMEI.

Dans un premier temps, le comportement trophique du puceron sur les différentes plantes transgéniques (et sauvages) sera étudié avec la méthode de l'électropénétrographie **(Chapitre 3, 2)**. Ses paramètres démographiques seront aussi estimés par des suivis de cohortes de larves se développant sur ces plantes. Dans un deuxième temps, il s'agira d'analyser les modifications observées à différents niveaux chez les plantes transgéniques et sauvages **(Chapitre 3, 3)**. Les études réalisées révèleront les modifications engendrées au niveau de la structure et de la composition en monosaccharides de la paroi végétale et de la structure des feuilles. L'activité des enzymes modifiant les pectines, ainsi que le niveau d'expression de gènes codant les éléments de la paroi et/ou impliqués dans les mécanismes de défenses seront mesurés dans les plants transgéniques et sauvages. Afin de réaliser l'ensemble de ces analyses, il a fallu au préalable choisir des isoformes de PME et de PMEI, ces enzymes appartenant à des familles multigéniques chez *A. thaliana* composées de 66 et 69 isoformes respectivement (Pelloux *et al.* 2007 ; Wolf *et al.* 2009a) **(Chapitre 3, 1)**. Ce choix va s'appuyer sur l'analyse d'une base de données disponible révélant des modifications d'expression de différents PME et PMEI lors de stress.

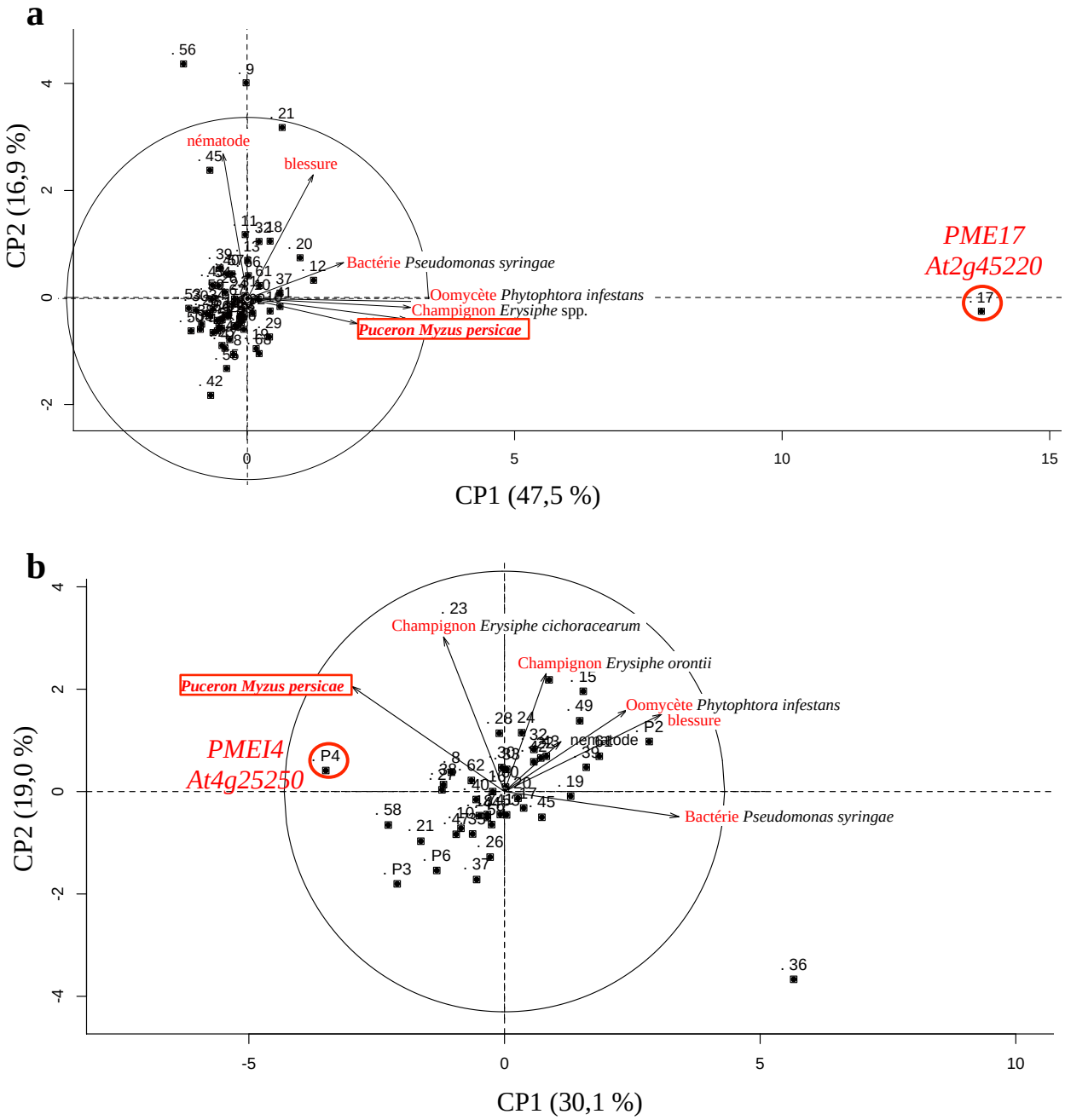


Figure 46 Représentations descriptives par Analyses en Composantes Principales (ACP) des valeurs d'expression de gènes PME et PMEI suite à des stress biotiques

Chaque PME ou PMEI est représenté par un point noir, **(a)** les 66 gènes de PME étant numérotées selon la classification de Markovic and Janecek (2004) et **(b)** les 69 gènes PMEI étant numérotés arbitrairement sauf ceux comportant un « P » devant leur numéro, signifiant qu'ils sont déjà caractérisés (**Tableau 5**). Les variables représentées par des flèches correspondent aux différents stress biotiques étudiés : nématode *Meloidogyne incognita*, oomycète *Phytophthora infestans*, bactéries *Pseudomonas syringae*, *Erysiphe cichoracearum* et *Erysiphe orontii*, puceron *M. persicae*. Une blessure appliquée avec une aiguille sur la rosette (blessure) est une autre variable. L'analyse en composantes principales a été réalisée avec les données publiques d'expression de gènes (www.genevestigator.com) et avec le logiciel R (package FactoMineR).

1. PME et PMEI impliqués dans les interactions plante-puceron

Une analyse des données publiques d'expression de gènes pour chaque isoforme de PME et PMEI définis chez *A. thaliana* va permettre de choisir une PME et un PMEI en relation avec le stress aphidien étudié. Une seconde isoforme de PME sera sélectionnée pour son importance éventuelle dans l'interaction *A. thaliana-M. persicae* en considérant la localisation de l'activité promotrice des gènes PME dans les tissus ciblés par les pucerons lors de l'interaction.

1.1. PME et PMEI dans les bases de données d'expression de gènes

Au début du projet de thèse, des données publiques d'expression de gènes (www.genevestigator.com) ont été récoltées pour chaque gène codant une isoforme de PME ou de PMEI chez l'écotype *A. thaliana* Columbia (Col-0). L'analyse consistait à répertorier les variations du niveau d'expression de chaque gène mesurées suite à l'application sur la plante de différents stress biotiques et abiotiques selon des cinétiques variables. Ceci a permis d'identifier une éventuelle spécificité d'isoforme par rapport à un ou des stress. Le seul stress aphidien disponible dans la base de données concernait des infestations de 24 h par *M. persicae*. Par ailleurs, des infections de 24 h par des pathogènes de type bactérien, tel que *Pseudomonas syringae* ou fongiques tels que *Erysiphe cichoracearum*, *Erysiphe orontii* et *Phytophtora infestans*, ont été prises en compte dans l'analyse. Des infections de plusieurs jours (28) par les nématodes *Meloidogyne incognita* ont aussi été considérées malgré le différentiel de cinétique car ces organismes microscopiques possèdent un stylet pour perforer la paroi des cellules et pénétrer dans les racines des plantes hôtes et s'y nourrir. Ce mode d'alimentation rappelle celui utilisé par le puceron. Sachant que les pucerons blessent les cellules végétales lors de la progression des stylets dans les tissus, l'expression de gènes mesurée 24 h après une blessure d'une feuille avec une aiguille a aussi été prise en compte. Cependant, ce stress abiotique (aiguille) provoque très certainement une blessure d'intensité supérieure comparée à celle obtenue avec un puceron.

A partir de ces données liées aux stress décrits, des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées (**Figure 46**). Sur les 66 gènes PME impliqués dans la réponse à ces différents stress, l'expression de 4 gènes est positivement corrélée à la réponse de la plante au nématode *M. incognita*. Ces derniers codent les isoformes PME 9, 21, 45 et 56 (**Figure 46a**). Seule la variation de l'expression du gène *PME17-At2g45220* est corrélée fortement et positivement au stress puceron (expression 3,7 fois induite par *M. persicae*). L'expression de *PME17* est d'ailleurs positivement corrélée à la réponse d'*A. thaliana* au stress bactérien *P. syringae* et aux stress fongiques par *P. infestans* et *Erysiphe* spp. En revanche, *PME17* n'apparaît pas spécifique du stress blessure par une aiguille. Ce gène *PME17* pourrait donc être un marqueur de stress biotiques appliqués durant 24 h avec une spécificité dans la réponse de la plante à *M. persicae* par rapport aux autres gènes PME.

Une démarche similaire d'analyse ACP faite sur les gènes PMEI montre également que certains semblent être corrélés de façon spécifique à des stress (**Figure 46b**). Le gène *PMEI4-At4g25250* (P4, **Figure 46b**) est le plus surexprimé suite au stress *M. persicae* (expression 1,7 fois). Cette surexpression semble assez spécifique, puisque ce gène *PMEI4* est plutôt sous-exprimé suite aux autres stress étudiés (blessure, *P. syringae* et *P. infestans*). D'autres PMEI

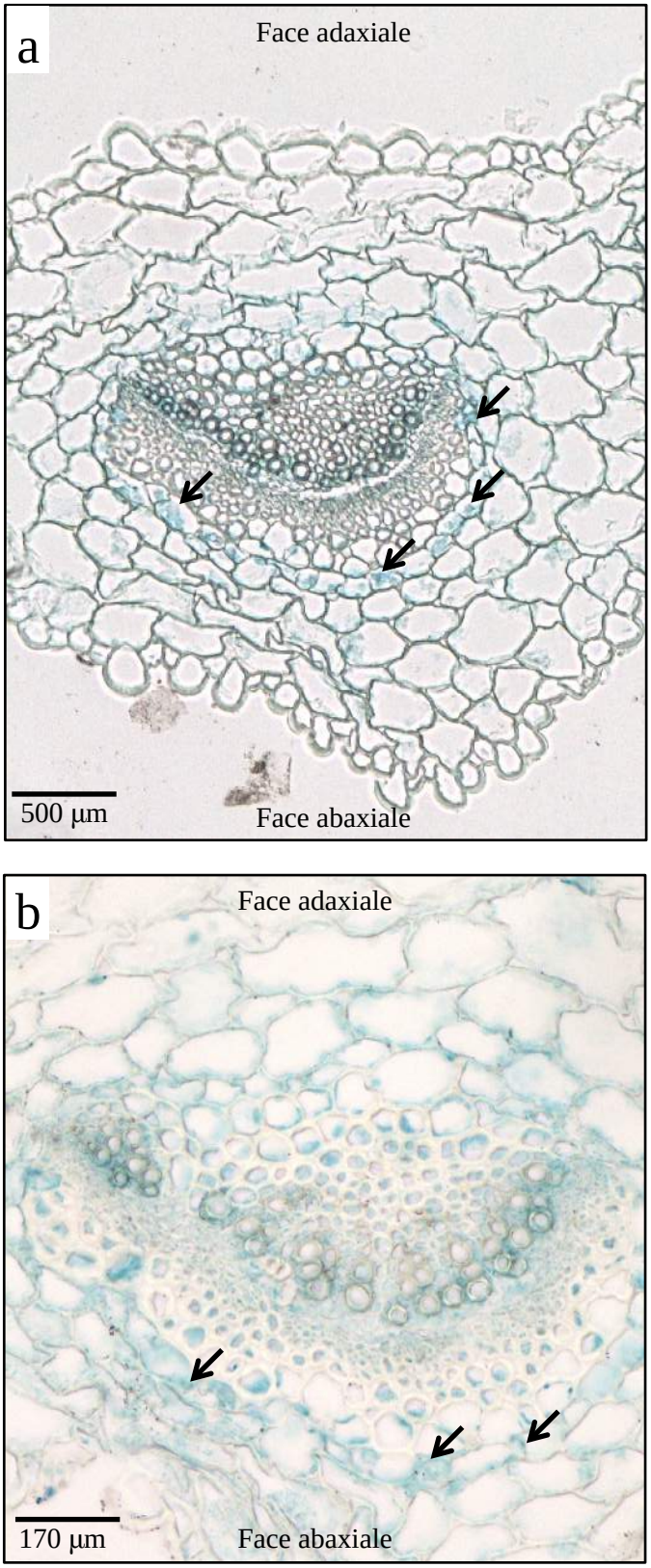


Figure 47 Mise en évidence de l'activité du promoteur du gène codant la *PME3* (*promPME3::GUS*) dans une feuille d'*A. thaliana*

Coupe transversale de la feuille (CT, 15 µm) *promAtPME3::GUS* non infestée âgée de 3 semaines est observée au microscope optique après coloration GUS **(a, b)** et zoom sur la nervure principale **(b)**. Les flèches pointent l'activité du promoteur *promPME3::GUS* révélée.

apparaissent spécifiques à d'autres stress : *PMEI2-At3g17220* à la blessure (P2, **Figure 46b**), *PMEI-At2g47340* à l'infection par *E. cichoracearum* (n°23, **Figure 46b**) et *PMEI-At3g62180* à l'infection par *P. syringae* (n°36, **Figure 46b**).

Les gènes *PME17* et *PMEI4*, ont donc été choisis pour poursuivre nos études. A ces candidats nous avons ajouté le gène *PME3* qui n'apparaît pas spécifique, selon notre analyse, à la réponse à un stress biotique ou abiotique comme d'ailleurs la majorité des isoformes de PME. Cependant, la base de données Arabidopsis eFP Browser (http//bar.utoronto.ca) montre que *PME3* est exprimée dans les feuilles matures et les travaux de Guenin *et al.* (2011) ont montré que ce gène est spécifique du phloème de cet organe. De plus le gène *PME3* apparaît spécifiquement exprimé dans des exsudats phloémiens, obtenus à partir de feuilles d'*A. thaliana* agées de 10 semaines (Deeken *et al*. 2008). Enfin la PME3 participerait à la susceptibilité d'*A. thaliana* à un nématode (*Heterodera schachtii*), une bactérie (*Pectobacterium carotovorum*) et un champignon (*B. cinerea*) (**Tableau 3**, p. 12). Nous allons donc étudier en parallèle de PME17 et PMEI4 le rôle de PME3. Profitant de constructions présentes au laboratoire sa localisation a été affinée au sein des feuilles matures utilisées pour les infestations aphidiennes expérimentales.

1.2. Localisation tissulaire de la PME3

La localisation tissulaire de la PME3 est obtenue par la révélation colorée de l'activité de son promoteur couplé à la glucuronidase (*promPME3::GUS*) et de fond génétique Col-0, (Guénin *et al.* 2011) sur des feuilles matures de plants transgéniques âgés de 3 semaines.
Après coloration GUS, l'activité du promoteur est observée au niveau des faisceaux conducteurs de feuilles en accord avec les résultats de Guénin *et al.* (2011). En coupes transversales, l'activité est localisée dans la première assise de cellules bordant le phloème et le séparant des cellules mésophylliennes chez des feuilles de niveau 4 à 7 par ordre d'apparition (**Figure 47a et b**). Dans nos conditions d'utilisation, cette PME3 est donc susceptible de pouvoir avoir un rôle dans l'interaction *A. thaliana-M. persicae*. En effet, la rencontre par les stylets du puceron de l'assise cellulaire l'exprimant apparaît incontournable pour atteindre la sève élaborée sachant que le puceron se positionne généralement sur la face abaxiale des feuilles (soit du côté du phloème).
Notre choix est donc conforté bien que des constructions pour localiser l'activité promotrice des gènes *PME17* et *PMEI4* n'ont pas pu être réalisées pour comparer les positions respectives de nos candidats. Notons cependant, la base de données Arabidopsis eFP Browser (http//bar.utoronto.ca) montre que le gène codant la PME17 est exprimé d'avantage dans les feuilles sénescentes par rapport aux feuilles matures. L'expression de *PMEI4* reste quant à elle très réduite. Nous n'avons pas choisi de réaliser initialement des constructions pour localiser l'activité promotrice des gènes *PME17* et *PMEI4* pour comparer les positions respectives de nos candidats.

Le rôle de la PME17, de la PME3 et du PMEI4 dans l'interaction *A. thaliana-M. persicae* va donc être étudié par génétique inverse en envisageant d'une part leur impact sur la biologie du puceron et d'autre part l'effet de l'infestation aphidienne sur la physiologie de la plante. Pour les deux PME, des mutants *knock-out* (KO) *pme17* (Sénéchal *et al.* 2014) et *pme3* (Guénin *et al.* 2011) issus d'un même fond génétique, WS, étaient disponibles. En revanche, pour le gène *PMEI4* le mutant KO *pmei4* et le surexpresseur de *PMEI4* (35S:PMEI4::GFP, Pelletier *et al.*

Tableau 16 Moyennes des paramètres de comportement alimentaire de *M. persicae* durant un accès de 8 h aux feuilles *d'A. thaliana* WS, *pme17* et *pme3*

Paramètres EPG	WS n=56	n	*pme17* n=24	n	*pme3* n=17	n	P1	P2
Phase de non-pénétration des stylets (NP)								
1. Durée totale des NP (s_NP)	127,73 ± 8,93	56	146,27 ± 11,99	24	138,93 ± 21,86	17	0,259	0,632
Phase de pénétration des stylets (Pr)								
2. Nombre de Pr	33,22 ± 1,91	56	32,62 ± 2,54	24	30,24 ± 4,40	17	0,686	0,503
3. Durée totale des Pr (s_Pr)	353,91 ± 8,99	56	333,47 ± 12,03	24	338,48 ± 23,06	17	0,209	0,602
4. Temps écoulé avant le 1er Pr	4,93 ± 0,60	55	6,65 ± 1,06	24	5,40 ± 0,63	17	0,297	0,078
Phase de recherche (C)								
5. Nombre de C	38,66 ± 1,88	53	38,84 ± 2,60	24	33,76 ± 4,70	17	0,882	0,261
6. Durée moyenne d'un C (a_C)	4,41 ± 0,18	52	5,42 ± 0,46	24	3,90 ± 0,38	17	0,156	0,056
7. Durée totale des C (s_C)	154,84 ± 7,27	56	**190,86 ± 9.08***	**24**	**120,91 ± 10.68***	**17**	**0,017**	**0,016**
Piqûres intracellulaires (pd)								
8. Nombre de pd	31,68 ± 2,19	56	32,05 ± 2,52	23	28,87 ± 2,85	15	0,919	0,695
9. Durée moyenne d'un pd	4,89 ± 0,07	55	5,03 ± 0,08	23	4,75 ± 0,08	15	0,206	0,286
10. Temps avant le 1er pd depuis le début de l'enregristrement	7,54 ± 0,95	55	9,42 ± 1,66	22	6,24 ± 0,96	15	0,397	0,842
11. Temps avant le 1er pd depuis le 1er Pr	1,99 ± 0,57	55	2,71 ± 1,16	22	0,43 ± 0,19	16	0,208	0,143
12. Nombre de pd par minute de C	0,21 ± 0,02	54	0,21 ± 0,03	22	**0,33 ± 0.05***	**16**	0,854	**0,045**
Phases phloémiennes								
Phase de salivation (E1)								
13. Nombre de salivation extracellulaire (E1e)	0,25 ± 0,09	56	0,52 ± 0,16	24	- ± -	17	0,112	0,102
14. Durée moyenne d'un E1e	9,22 ± 2,54	8	4,98 ± 0,77	3	- ± -	0	0,123	1,000
15. Durée totale des E1e	15,22 ± 4,03	8	11,24 ± 2,98	3	- ± -	0	0,217	1,000
16. Nombre de salivations simples (sgE1)	0,82 ± 0,13	56	1,55 ± 0,32	24	0,82 ± 0,32	17	0,169	0,605
17. Durée moyenne d'un sgE1	2,75 ± 0,43	25	2,84 ± 0,43	10	5,26 ± 2,60	5	0,781	0,254
18. Durée totale des sgE1 (s_sgE1)	4,70 ± 1,00	25	10,91 ± 4,07	10	9,31 ± 3,69	5	0,235	0,191
19. Durée moyenne d'une salivation fractionnée (a_frE1)	1,27 ± 0,15	47	**1,67 ± 0.14****	**19**	0,96 ± 0,07	15	**0,001**	0,605
20. Durée totale des frE1 (s_frE1)	5,88 ± 1,08	46	6,56 ± 0,74	19	3,00 ± 0,52	15	0,078	0,070
21. Nombre de salivations totales E1 (sgE1+frE1)	4,54 ± 0,48	56	4,75 ± 0,54	24	3,76 ± 0,43	17	0,807	0,708
22. Durée moyenne d'un E1 (a_E1)	1,34 ± 0,11	46	**2,10 ± 0.26****	**19**	1,59 ± 0,30	16	**0,002**	0,748
23. Durée totale des E1 (s_E1)	5,86 ± 0,72	43	**13,84 ± 3.05*****	**19**	6,51 ± 1,67	16	**0,0002**	0,682
Phase d'ingestion de sève élaborée (E2)								
24. Nombre de E2	3,48 ± 0,37	56	3,00 ± 0,36	24	2,82 ± 0,44	17	0,424	0,540
25. Durée moyenne d'un E2	68,29 ± 13,87	46	35,64 ± 6,62	18	85,42 ± 28,04	14	0,483	0,279
26. Durée totale des E2 (s_E2)	154,72 ± 15,85	44	**108,93 ± 14.58***	**18**	198,50 ± 36,69	14	**0,033**	0,414
27. Nombre de E2 soutenues (sE2 = E2 >10min)	2,07 ± 0,21	56	1,80 ± 0,25	24	1,82 ± 0,38	17	0,317	0,586
28. Durée moyenne d'un sE2	77,76 ± 13,86	41	57,79 ± 12,69	16	**130,83 ± 34.43***	**11**	0,725	**0,031**
29. Durée totale des sE2 (s_sE2)	150,35 ± 16,51	43	103,55 ± 14,16	16	**245,14 ± 32.41***	**11**	0,130	**0,019**
30. Temps avant la 1ère séquence E1-E2 depuis le début de l'enregistrement	202,32 ± 17,83	55	226,01 ± 22,33	22	172,52 ± 26,44	17	0,498	0,503
31. Temps avant la 1ère séquence E1-E2 depuis le 1er Pr	219,17 ± 18,11	55	237,94 ± 21,58	22	187,25 ± 35,60	17	0,550	0,230
Autres paramètres								
32. Nombre de déraillements des stylets (F)	1,04 ± 0,18	56	0,77 ± 0,19	24	**0,24 ± 0.11***	**17**	0,181	**0,015**
33. Durée moyenne d'un F	39,42 ± 6,88	28	42,65 ± 7,02	6	63,63 ± 29,17	4	0,526	0,531
34. Durée totale des F	58,49 ± 6,98	28	86,50 ± 19,29	6	63,63 ± 29,17	4	0,590	0,955
35. Nombre d'ingestion de sève xylémienne (G)	0,43 ± 0,09	56	0,36 ± 0,10	24	0,12 ± 0,08	17	0,527	0,057
36. Durée moyenne d'un G	35,32 ± 7,24	17	32,58 ± 7,86	6	23,70 ± 1,89	2	0,894	0,894
37. Durée totale des G	44,94 ± 10,14	17	39,32 ± 8,85	6	23,70 ± 1,89	2	0,894	0,690

Les données sont les valeurs moyennes ± erreur standard (SE) calculées sur le nombre de pucerons impliqués (n). Toutes les durées sont en minutes, sauf les piqûres intracellulaires en secondes. Les moyennes suivies au sein d'une ligne par un ou plusieurs astérisque(s) sont significativement différentes selon le test de Mann-Whitney entre les plants WS et *pme17* (P1) ou WS-*pme3* (P2). P < 0,05 (*, jaune), P < 0,01 (**, orange) et P < 0,001 (***, rouge).

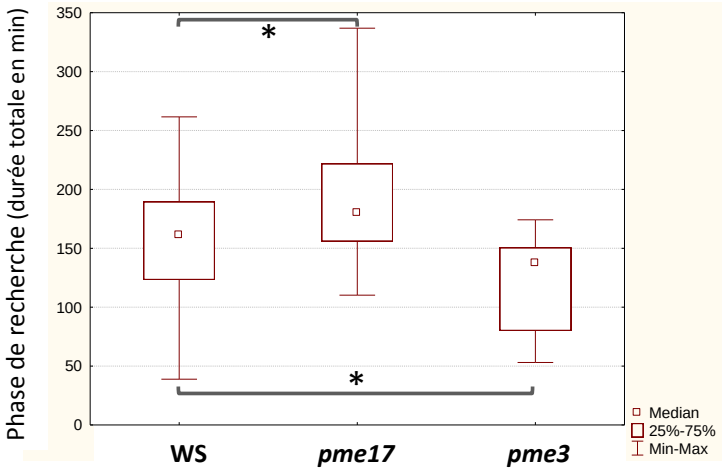


Figure 48 Diagramme en boîtes des trois séries de durée totale des phases de recherche des tubes criblés effectuées par *M. persicae* durant un accès de 8 h aux feuilles d'*A. thaliana* WS, *pme17* et *pme3*

Pour chaque plante, plusieurs paramètres décrivant la répartition des individus sont représentés : médiane, 1er quartile (25 %), 3ème quartile (75 %), valeurs minimale et maximale. Les astérisques indiquent une différence significative entre les plantes selon le test de Mann-Whitney. P < 0,05 (*) ou P < 0,01 (**).

2010) sont sur fond génétique Col. Toutes les expérimentations vont comparer les réponses au cours de l'interaction plantes transgéniques - *M. persicae* par rapport à celles entre *M. persicae* et les plants sauvages respectifs.

2. Impact de deux PME et d'un PMEI sur la biologie du puceron

L'effet de la PME17, de la PME3 et du PMEI4 dans les interactions *A. thaliana-M. persicae* a été évalué par l'impact de leur absence (mutants KO *pme17*, *pme3*, *pmei4*) ou surexpression (35S:PMEI4::GFP) sur la biologie du puceron *M. persicae*. L'étude concerne d'une part le comportement trophique du puceron pendant 8 heures d'alimentation sur les plants *d'A. thaliana*, grâce à la technique de l'électropénétrographie (EPG) et d'autre part, l'analyse des paramètres démographiques grâce à des suivis de cohortes de jeunes larves de pucerons durant 21 jours. Le comportement alimentaire des pucerons et leur développement sur les mutants et surexpresseurs sont comparés à celui sur leur écotype sauvage correspondant (WS ou Col). Les expérimentations sur deux écotypes différents ont permis d'analyser également un effet de la variation naturelle sur le puceron *M. persicae* qui va être analysé.

2.1. Effet sur son comportement trophique

La méthode de l'EPG permet d'identifier pendant 8 h les différents items du comportement trophique de *M. persicae* tels que les phases de recherche, de salivation, d'hydratation dans le xylème ou d'ingestion de sève élaborée. Après avoir analysé les électropénétrogrammes obtenus, les variations de 37 paramètres (parmi 98 calculés), reflétant les principales phases alimentaires de *M. persicae*, ont permis de caractériser l'acceptabilité de chaque plante par le puceron. Des modifications engendrées au niveau des pectines par les PME ou les PMEI pourraient avoir un impact direct au niveau de la phase de recherche des tubes criblés, puisque les stylets du puceron se déplacent particulièrement entre les cellules au sein des parois.

2.1.1. Effet différentiel des gènes *PME17* et *PME3*

En ce qui concerne l'acceptabilité des mutants *pme17* ou *pme3*, les paramètres sélectionnés indiquent que les principales phases du comportement trophique sont significativement modifiées chez les pucerons s'alimentant sur les mutants par rapport à ceux s'alimentant sur l'écotype sauvage WS : phase de recherche des tubes criblés, phases phloémiennes (salivation et/ou ingestion de sève élaborée) (**Tableau 16**).

Le paramètre 4 du **Tableau 16** indique tout d'abord que le temps écoulé avant la première insertion des stylets de *M. persicae* dans les feuilles *pme17* et *pme3* n'est pas significativement différent par rapport aux feuilles WS. Cependant, une fois les stylets insérés dans les tissus, des différences de comportement sont observées, variables en fonction du mutant étudié. En effet, les pucerons s'alimentant sur le mutant *pme17* montrent une augmentation significative (23 %) de la durée totale de la phase de recherche (**Tableau 16** paramètre 7, **Figure 48**), alors que ceux s'alimentant sur *pme3* montrent une diminution significative de cette phase (28 %). De plus, lorsque les stylets progressent dans les tissus foliaires, seulement 24 % des pucerons s'alimentant sur des feuilles *pme3* initient une phase de déraillements des stylets, contre 50 % pour ceux

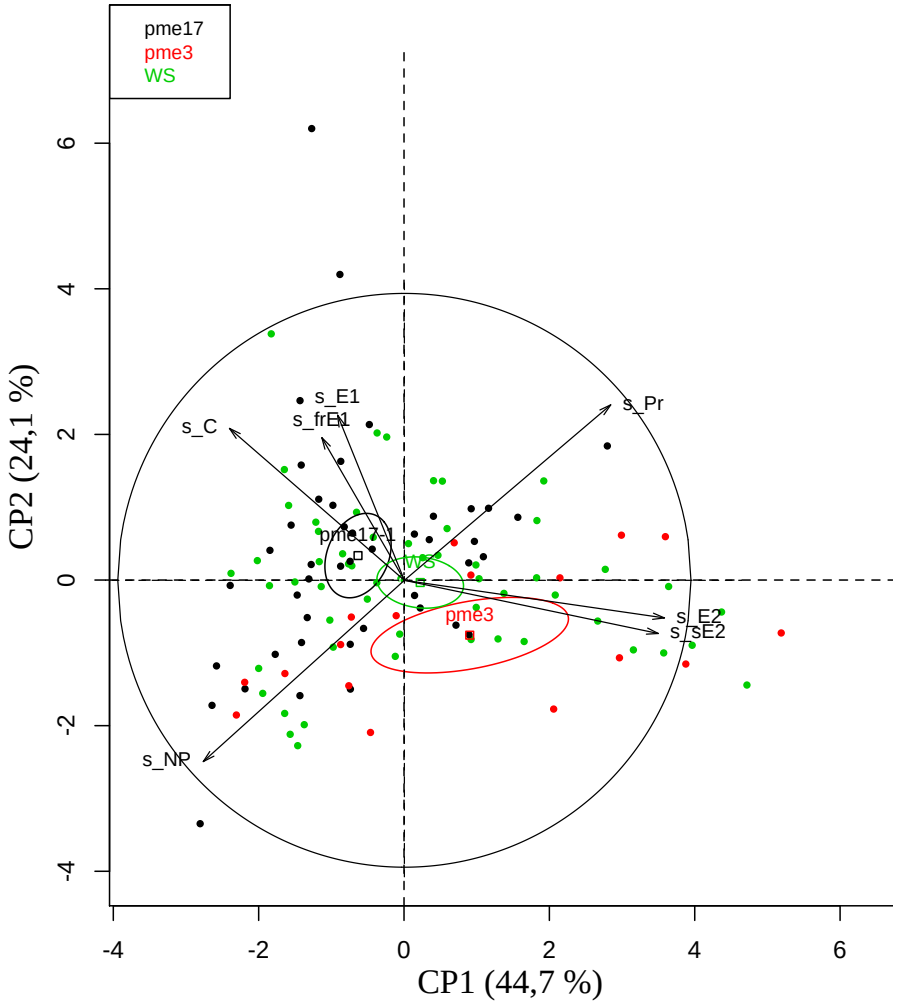


Figure 49 Distribution selon les composantes principales (CP) 1 et 2 des individus *M. persicae* s'alimentant sur *A. thaliana* WS, *pme17* et *pme3*

Chaque point illustre le comportement trophique d'un puceron étudié ayant accès pendant 8 h à un plant *pme17* (noir), *pme3* (rouge) et WS (vert). Les flèches représentent la contribution de chaque variable sélectionnée contribuant à la significativité des 2 composantes sélectionnées (s_NP, s_Pr, s_C, s_frE1, s_E1, s_E2, s_sE2 correspondant respectivement aux paramètres 1, 3, 7, 20, 23, 26 et 29 du **Tableau 16**). Le non-chevauchement des trois ellipses de confiance indique des différences significatives de comportement sur les plantes fournies, avec un niveau de confiance à 95 %.

s'alimentant sur WS (paramètre 32). Ceci suggère qu'au niveau des feuilles *pme3* le puceron éprouve moins de problèmes de synchronisation de ses stylets maxillaires et mandibulaires.
De façon surprenante, les phases phloémiennes sont aussi affectées, de façon opposée sur les deux mutants KO. Une fois les stylets du puceron à l'intérieur des tubes criblés, les durées totales et/ou la durée moyenne de salivation des individus s'alimentant sur *pme17* sont significativement plus importantes (respectivement paramètre 23, 240 % et paramètre 22, 60 %). Ceci est dû notamment à une salivation fractionnée plus importante, correspondant aux périodes de salivation suivies d'une ingestion de sève élaborée (paramètre 19, 30 %). Les individus s'alimentant sur les feuilles *pme3* ne présentent aucune variation au niveau des phases de salivation par rapport à ce qui est observé chez WS. Par ailleurs, la durée totale d'ingestion de sève élaborée est réduite sur *pme17* (paramètre 26, 50 %) alors qu'elle est augmentée (ingestion soutenue > 10min) sur *pme3* (paramètre 29, 60 %). Ces résultats suggèrent donc un effet opposé des deux mutations sur le comportement trophique de *M. persicae* : un effet d'appréciation négative des plants *pme17* et un effet d'appréciation positive des plants *pme3* chacun comparé à la plante sauvage.
Ces différences sont confirmées par une analyse en composantes principales (ACP), incluant les 7 principaux paramètres cités ci-dessus (**Figure 49**). On observe grâce aux trois ellipses de confiance (P = 0,95) qui ne se recoupent pas, que les pucerons ont des comportements trophiques significativement différents les uns des autres en fonction des plantes sur lesquelles ils se nourrissent (WS, *pme17* et *pme3*). Les deux premières composantes expliquent la variance avec 44,7 et 24,1 %, soit un pourcentage cumulé de 68,8 % (valeurs propres > 1). Les composantes CP1 et CP2 montrant le comportement trophique des différents pucerons s'alimentant sur les plants *pme17* sont associées à de longues phases de recherche (paramètre 7) et de salivation phloémienne (paramètres 19, 22 et 23) alors que ceux s'alimentant sur *pme3* sont associés à une phase d'ingestion de sève élaborée plus longue (paramètres 28 et 29). Le puceron *M. persicae* semble accepter et apprécier davantage le mutant *pme3* que la plante sauvage. C'est l'inverse avec le mutant *pme17*.

2.1.2. Faible effet du gène *PMEI4*

Contrairement à l'effet de mutations de PME, la mutation du gène *PMEI4* (*pmei4*) ou sa surexpression (35S:PMEI4::GFP) n'engendrent pas de variations des paramètres trophiques relatifs à la durée d'ingestion de sève élaborée (**Tableau 17**). De même, la mutation *PMEI4* n'engendre pas les mêmes modifications des paramètres trophiques que sa surexpression, par comparaison aux plants sauvages. Le temps écoulé avant la première insertion des stylets de *M. persicae* dans les feuilles des plants transgéniques n'est pas significativement différent par rapport aux feuilles Col.
Les différences significatives mises en évidence entre les pucerons s'alimentant sur les feuilles *pmei4* et Col concernent des phases avant que les stylets du puceron n'atteignent les tubes criblés : phases de pénétration et de recherche Les pucerons s'alimentant sur *pmei4* engagent davantage de phases de sondage (paramètre 2, 25 % de plus que chez Col) et de recherche (paramètre 5, 21 %). Par ailleurs, le temps précédant la première phase phloémienne depuis le début de l'enregistrement (paramètre 30) est augmenté en moyenne de 80 % par rapport aux plantes Col, sans modification de la durée de la phase de pénétration des stylets (paramètre 3). Le nombre de déraillements de stylets est également plus important pour les pucerons s'alimentant sur *pmei4* (paramètre 32). La mutation semble provoquer des difficultés pour les stylets du

Tableau 17 Moyennes des paramètres de comportement alimentaire de *M. persicae* étudié durant un accès de 8 h aux feuilles *d'A. thaliana* Col, *pmei4* et 35S:PMEI4::GFP

Paramètres EPG	Col n=39	n	*pmei4* n=20	n	35S:PMEI4::GFP n=19	n	P1	P2
Phase de non-pénétration des stylets (NP)								
1. Durée totale des NP (s_NP)	164,47 ± 12,26	39	194,84 ± 20,48	20	188,17 ± 25,01	19	0,265	0,410
Phase de pénétration des stylets (Pr)								
2. Nombre de Pr	30,19 ± 2,65	39	**37,85 ± 3.02***	**20**	40,37 ± 8,52	19	**0,023**	0,790
3. Durée totale des Pr (s_Pr)	312,01 ± 12,48	39	291,90 ± 20,76	20	291,83 ± 25,01	19	0,529	0,532
4. Temps écoulé avant le 1er Pr	10,76 ± 1,90	37	9,53 ± 2,08	20	12,17 ± 3,17	19	0,763	0,910
Phase de recherche (C)								
5. Nombre de C	34,74 ± 2,87	39	**42,05 ± 3.13***	**20**	45,11 ± 8,70	19	**0,037**	0,679
6. Durée moyenne d'un C (a_C)	5,46 ± 0,40	39	**3,89 ± 0.40***	**20**	4,71 ± 0,86	19	**0,014**	0,075
7. Durée totale des C (s_C)	162,13 ± 9,77	39	153,93 ± 15,95	20	151,36 ± 17,48	19	0,513	0,520
Piqûres intracellulaires (pd)								
8. Nombre de pd	30,97 ± 2,48	35	31,50 ± 4,23	20	24,74 ± 4,14	19	0,841	0,169
9. Durée moyenne d'un pd	5,23 ± 0,09	36	4,94 ± 0,20	20	5,05 ± 0,23	19	0,259	0,257
10. Temps avant le 1er pd depuis le début de l'enregristrement	13,21 ± 1,74	36	17,41 ± 4,25	20	16,53 ± 3,45	19	1,000	0,763
11. Temps avant le 1er pd depuis le 1er Pr	3,36 ± 0,87	34	7,88 ± 3,94	20	4,36 ± 2,13	19	0,307	0,128
12. Nombre de pd par minute de C	0,19 ± 0,02	36	0,22 ± 0,03	20	0,21 ± 0,05	19	0,720	0,490
Phases phloémiennes								
Phase de salivation (E1)								
13. Nombre de salivation extracellulaire (E1e)	0,23 ± 0,14	39	- ± -	20	- ± -	19	0,631	0,637
14. Durée moyenne d'un E1e	11,13 ± 0,00	2	- ± -	0	- ± -	0	1,000	1,000
15. Durée totale des E1e	44,51 ± 0,00	2	- ± -	0	- ± -	0	1,000	1,000
16. Nombre de salivations simples (sgE1)	0,77 ± 0,18	39	0,65 ± 0,23	20	0,37 ± 0,14	19	0,829	0,375
17. Durée moyenne d'un sgE1	3,18 ± 0,79	14	2,32 ± 0,56	8	**1,01 ± 0.28***	**6**	0,785	**0,048**
18. Durée totale des sgE1 (s_sgE1)	6,39 ± 1,59	14	5,14 ± 2,70	8	**1,11 ± 0.27***	**6**	0,495	**0,021**
19. Durée moyenne d'une salivation fractionnée (a_frE1)	2,22 ± 0,31	24	1,41 ± 0,22	10	**1,09 ± 0.19*****	**16**	0,186	**0,0008**
20. Durée totale des frE1 (s_frE1)	6,54 ± 1,10	25	4,56 ± 1,04	10	3,68 ± 0,55	16	0,465	0,173
21. Nombre de salivations totales E1 (sgE1+frE1)	3,31 ± 0,55	39	2,40 ± 0,67	20	3,47 ± 0,60	19	0,236	0,524
22. Durée moyenne d'un E1 (a_E1)	2,83 ± 0,39	29	1,66 ± 0,31	11	**1,11 ± 0.19****	**16**	0,119	**0,001**
23. Durée totale des E1 (s_E1)	10,46 ± 1,59	29	7,89 ± 2,95	11	**4,10 ± 0.57***	**16**	0,269	**0,029**
Phase d'ingestion de sève élaborée (E2)								
24. Nombre de E2	2,33 ± 0,44	39	1,65 ± 0,50	20	3,05 ± 0,56	19	0,273	0,174
25. Durée moyenne d'un E2	66,64 ± 19,22	25	46,04 ± 14,42	9	37,60 ± 12,93	16	0,891	0,200
26. Durée totale des E2 (s_E2)	123,38 ± 19,52	24	106,84 ± 21,00	9	159,24 ± 34,04	16	0,936	0,423
27. Nombre de E2 soutenues (sE2 = E2 >10min)	1,18 ± 0,27	39	0,80 ± 0,24	20	1,42 ± 0,41	19	0,527	0,649
28. Durée moyenne d'un sE2	79,78 ± 18,58	20	59,88 ± 14,81	9	61,86 ± 15,64	11	0,741	0,967
29. Durée totale des sE2 (s_sE2)	118,50 ± 19,28	19	98,22 ± 21,85	9	115,46 ± 42,58	11	0,451	0,836
30. Temps avant la 1ère phase phloémienne (E1 ou E1-E2) depuis le début de l'enregistrement	181,88 ± 21,37	30	**327,39 ± 37.04****	**20**	222,92 ± 34,02	19	**0,002**	0,424
31. Temps avant la 1ère séquence E1-E2 depuis le 1er Pr	275,61 ± 26,52	39	332,34 ± 35,92	20	221,64 ± 34,91	19	0,249	0,193
Autres paramètres								
32. Nombre de déraillements des stylets (F)	1,31 ± 0,39	39	**2,40 ± 0.54***	**20**	1,11 ± 0,40	19	**0,017**	0,747
33. Durée moyenne d'un F	30,90 ± 7,34	19	33,35 ± 7,06	15	15,67 ± 5,47	8	0,340	0,100
34. Durée totale des F	58,63 ± 10,54	19	91,52 ± 18,21	15	43,38 ± 20,35	8	0,115	0,203
35. Nombre d'ingestion de sève xylémienne (G)	0,95 ± 0,19	39	0,95 ± 0,30	20	1,37 ± 0,38	19	0,743	0,568
36. Durée moyenne d'un G	35,27 ± 5,70	21	17,93 ± 3,18	9	25,35 ± 7,01	12	0,118	0,278
37. Durée totale des G	49,24 ± 7,00	21	38,85 ± 11,78	9	34,08 ± 9,33	12	0,309	0,166

Les données sont les valeurs moyennes ± erreur standard (SE) calculées sur le nombre de pucerons impliqués (n). Toutes les durées sont en minutes, sauf les piqûres intracellulaires en secondes. Les moyennes suivies au sein d'une ligne par un ou plusieurs astérisque(s) sont significativement différentes selon le test de Mann-Whitney entre les plants Col et *pmei4* (P1) ou Col et 35S:PMEI4::GFP (P2). P < 0,05 (*, jaune), P < 0,01 (**, orange) et P < 0,001 (***, rouge).

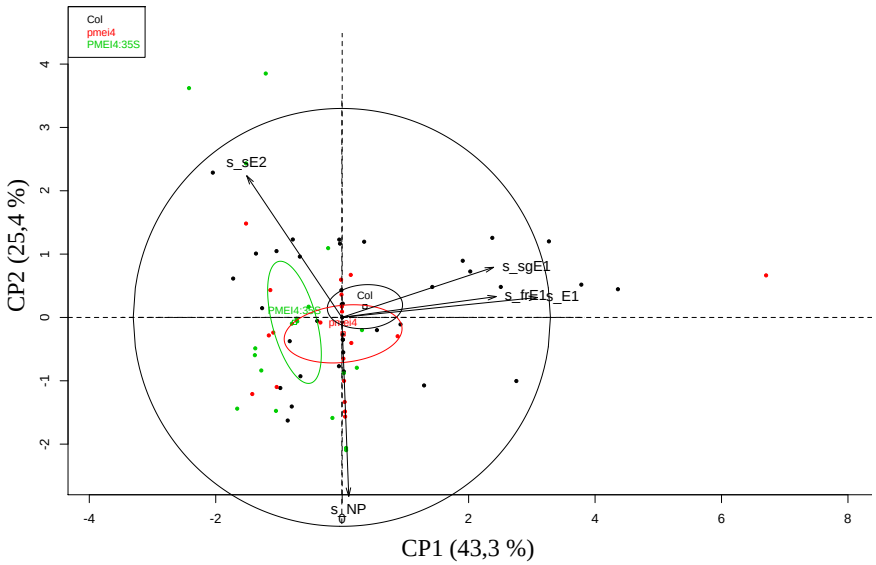


Figure 50 Distribution selon les composantes principales (CP) 1 et 2 des individus *M. persicae* s'alimentant sur *A. thaliana* Col, *pmei4* et 35S:PMEI4::GFP

Chaque point illustre le comportement trophique d'un puceron étudié ayant accès pendant 8 h à un plant Col (noir), *pmei4* (rouge) et 35S:PMEI4::GFP (vert). Les flèches représentent la contribution de chaque variable sélectionnée contribuant à la significativité des 2 composantes sélectionnées (s_NP, s_sgE1, s_frE1, s_E1, s_sE2 correspondant respectivement aux paramètres 1, 18, 20, 23 et 29 du **Tableau 17**). Le non-chevauchement des trois ellipses de confiance indique des différences significatives de comportement sur les plantes fournies, avec un niveau de confiance à 95 %.

puceron à atteindre les tubes criblés. En revanche, la surexpression de PMEI4 modifie uniquement des phases de salivation.

Une fois leur stylets insérés dans les tubes criblés des plants surexpresseurs, les pucerons effectuent des phases de salivation totale (paramètres 22) et moyenne (paramètres 23) beaucoup plus brèves que ceux s'alimentant sur Col (-61 %). Les durées totales des salivations isolées (paramètre 17) ou suivies d'ingestion (appelées aussi fractionnées, paramètre 19) sont significativement réduites (respectivement -68 et -51 %).
Parmi les pucerons testés, ils sont davantage à s'être alimentés (paramètre 25) sur les plants surexprimant *PMEI4* (80 %) et moins nombreux sur les plants *pmei4* (45 %) si l'on considère que globalement 60 % des pucerons engagent une phase d'ingestion de sève élaborée chez la plante sauvage Col. La surexpression de PMEI4 semble donc faciliter l'alimentation du puceron dans la plante, à l'inverse de sa mutation.

Une ACP réalisée sur les principaux paramètres associant le comportement du puceron à chaque type de plante montre que les ellipses de confiance se chevauchent (**Figure 50**). Les différences significatives abordées précédemment ne suffisent donc pas pour dissocier nettement les comportements trophiques sur les plantes sauvages ou transgéniques.

Donc même si les modifications d'expression des gènes affectent le comportement trophique du puceron, seules les plantes présentant les mutations PME sont clairement distinguées par les pucerons lors de l'alimentation par rapport à la plante sauvage. La différence observée apparaît à la fois liée à un rôle direct des PME dans les parois des cellules mésophylliennes, puisque ce sont les comportements de recherche des tubes criblés qui sont modifiés et à un rôle plutôt indirect en modifiant le temps d'ingestion de sève élaborée. Cependant, les plants transgéniques PME et PMEI utilisés dans cette étude ayant des fonds génétiques différents, il convient de considérer également le comportement trophique en fonction de l'effet écotype d'*A. thaliana*. Dans ce cas, l'impact minime sur le comportement trophique de *M. persicae* suite à des changements d'expression du gène *PMEI4* pourrait être justifié.

Tableau 18 Moyennes des paramètres de comportement alimentaire de *M. persicae* étudié durant un accès de 8 h aux feuilles *d'A. thaliana* WS et Col

Paramètres EPG	WS n=56	n	Col n=39	n	Valeur P
Phase de non-pénétration des stylets (NP)					
1. Durée totale des NP (s_NP)	127,73 ± 8,93	55	**164,47 ± 12.26***	**35**	**0,020**
Phase de pénétration des stylets (Pr)					
2. Nombre de Pr	33,22 ± 1,91	55	30,19 ± 2,65	36	0,145
3. Durée totale des Pr (s_Pr)	353,91 ± 8,99	56	**312,01 ± 12.48****	**35**	**0,009**
4. Temps écoulé avant le 1er Pr	4,93 ± 0,60	52	**10,76 ± 1,90**	**37**	**0,007**
Phase de recherche (C)					
5. Nombre de C	38,66 ± 1,88	53	**34,74 ± 2.87***	**39**	**0,049**
6. Durée moyenne d'un C (a_C)	4,41 ± 0,18	52	**5,46 ± 0.40***	**38**	**0,041**
7. Durée totale des C (s_C)	154,84 ± 7,27	49	162,13 ± 9,77	38	0,791
Piqûres intracellulaires (pd)					
8. Nombre de pd	31,68 ± 2,19	53	30,97 ± 2,48	35	0,912
9. Durée moyenne d'un pd	4,89 ± 0,07	55	**5,23 ± 0.09***	**36**	**0,011**
10. Temps avant le 1er pd depuis le début de l'enregistrement	7,54 ± 0,95	53	**13,21 ± 1.74****	**36**	**0,001**
11. Temps avant le 1er pd depuis le 1er Pr	1,99 ± 0,57	53	**3,36 ± 0.87***	**34**	**0,021**
12. Nombre de pd par minute de C	0,21 ± 0,02	54	0,19 ± 0,02	36	0,987
Phases phloémiennes					
Phase de salivation (E1)					
13. Nombre de salivation extracellulaire (E1e)	0,25 ± 0,09	56	0,23 ± 0,14	39	0,365
14. Durée moyenne d'un E1e	9,22 ± 2,54	8	11,13 ± 0,00	2	0,295
15. Durée totale des E1e	15,22 ± 4,03	8	**44,51 ± 0.00***	**2**	**0,036**
16. Nombre de salivations simples (sgE1)	0,82 ± 0,13	56	0,77 ± 0,18	39	0,576
17. Durée moyenne d'un sgE1	2,75 ± 0,43	25	3,18 ± 0,79	14	0,861
18. Durée totale des sgE1 (s_sgE1)	4,70 ± 1,00	25	6,39 ± 1,59	14	0,619
19. Durée moyenne d'une salivation fractionnée (a_frE1)	1,27 ± 0,15	47	**2,22 ± 0.31*****	**24**	**0,0004**
20. Durée totale des frE1 (s_frE1)	5,88 ± 1,08	46	6,54 ± 1,10	25	0,360
21. Nombre de salivations totales E1 (sgE1+frE1)	4,54 ± 0,48	56	3,31 ± 0,55	39	0,057
22. Durée moyenne d'un E1 (a_E1)	1,34 ± 0,11	46	**2,83 ± 0.39****	**29**	**0,001**
23. Durée totale des E1 (s_E1)	5,86 ± 0,72	43	**10,46 ± 1.59***	**29**	**0,035**
Phase d'ingestion de sève élaborée (E2)					
24. Nombre de E2	3,48 ± 0,37	56	**2,33 ± 0.44***	**39**	**0,021**
25. Durée moyenne d'un E2	68,29 ± 13,87	46	66,64 ± 19,22	25	0,656
26. Durée totale des E2 (s_E2)	154,72 ± 15,85	44	**118,50 ± 19.52***	**24**	**0,024**
27. Nombre de E2 soutenues (sE2 = E2 >10min)	2,07 ± 0,21	56	**1,18 ± 0.27****	**39**	**0,002**
28. Durée moyenne d'un sE2	77,76 ± 13,86	41	79,78 ± 18,58	20	0,349
29. Durée totale des sE2 (s_sE2)	150,35 ± 16,51	43	123,38 ± 19,28	19	0,432
30. Temps avant la 1ère séquence E1-E2 depuis le début de l'enregistrement	202,32 ± 17,83	55	181,88 ± 21,37	30	0,639
31. Temps avant la 1ère séquence E1-E2 depuis le 1er Pr	219,17 ± 18,11	55	275,61 ± 26,52	39	0,148
Autres paramètres					
32. Nombre de déraillements des stylets (F)	1,04 ± 0,18	56	1,31 ± 0,39	39	0,942
33. Durée moyenne d'un F	39,42 ± 6,88	28	30,90 ± 7,34	19	0,217
34. Durée totale des F	58,49 ± 6,98	28	58,63 ± 10,54	19	0,897
35. Nombre d'ingestion de sève xylémienne (G)	0,43 ± 0,09	56	**0,95 ± 0.19***	**39**	**0,011**
36. Durée moyenne d'un G	35,32 ± 7,24	17	35,27 ± 5,70	21	0,692
37. Durée totale des G	44,94 ± 10,14	17	49,24 ± 7,00	21	0,419

Les données sont les valeurs moyennes ± erreur standard (SE) calculées sur le nombre de pucerons impliqués (n). Toutes les durées sont en minutes, sauf les piqûres intracellulaires en secondes. Les moyennes suivies au sein d'une ligne par un ou plusieurs astérisque(s) sont significativement différentes selon le test de Mann-Whitney entre les plants WS et Col. P < 0,05 (*, jaune), P < 0,01 (**, orange) et P < 0,001 (***, rouge). Les pucerons utilisés sont les mêmes que dans les **Tableaux 16** et **17**.

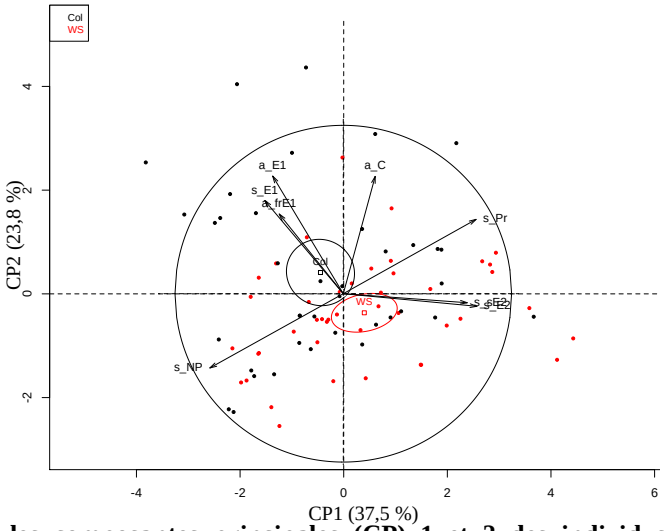


Figure 51 Distribution selon les composantes principales (CP) 1 et 2 des individus *M. persicae* s'alimentant sur *A. thaliana* Col et WS

Chaque point illustre le comportement trophique d'un puceron étudié ayant accès pendant 8 h à un plant Col (noir) et WS (rouge). Les flèches représentent la contribution de chaque variable sélectionnée contribuant à la significativité des 2 composantes sélectionnées (s_NP, s_Pr, a_C, a_frE1, a_E1, s_E1, s_E2, s_sE2 correspondant respectivement aux paramètres 1, 3, 6, 19, 22, 23, 26 et 29 du **Tableau 18**). Le non-chevauchement des trois ellipses de confiance indique des différences significatives de comportement sur les plantes fournies, avec un niveau de confiance à 95 %.

2.1.3. L'effet sous-jacent de la variation naturelle d'*A. thaliana*

2.1.3.1. Effet sur le comportement trophique de *M. persicae*

La comparaison des individus s'alimentant sur les deux écotypes d'*A. thaliana* WS et Col a permis d'estimer l'impact de la variation naturelle d'*A. thaliana* sur le comportement trophique de *M. persicae*. Les paramètres trophiques observés entre les deux écotypes sont présentés dans le **Tableau 18**. Parmi les 37 paramètres EPG présentés, 16 sont significativement différents ($P < 0,05$). Les principales phases du comportement trophique du puceron varient en fonction de l'écotype, parmi lesquelles la phase précédant la pénétration des stylets dans les tissus, la phase de progression dans l'apoplasme (phase de pénétration des stylets, phase de recherche) et les phases phloémiennes (salivation solubles et ingestion).

La durée totale des phases de non-pénétration des stylets (paramètre 1) est significativement plus longue sur les feuilles de l'écotype Col que sur celles de l'écotype WS. Cette phase est inversement corrélée à la durée totale des phases de pénétration (paramètre 3). Sur les feuilles Col, les stylets de *M. persicae* passent environ deux fois plus de temps en dehors de la plante avant de pénètrer pour la première fois au sein des tissus foliaires (paramètre 4). Même si la durée totale de la phase de recherche n'est pas significativement différente entre les deux écotypes (paramètre 7), la durée moyenne (paramètre 6) est plus longue (25 %) sur les feuilles Col. Le temps passé avant la première piqûre intracellulaire depuis le début de l'enregistrement (paramètre 10) ou depuis la première phase de pénétration engagée (paramètre 11) est deux fois plus important sur des feuilles Col. De plus la durée moyenne d'une piqûre intracellulaire établie pour se localiser au sein des tissus (paramètre 9) est significativement plus importante pour les individus s'alimentant sur l'écotype Col que sur WS.

Les phases phloémiennes sont aussi fortement modifiées par la variation naturelle, avec notamment les durées moyennes de salivation qui sont significativement plus longues pour les pucerons s'alimentant sur l'écotype Col que sur l'écotype WS (paramètres 22 et 23) ainsi que la durée moyenne des salivations fractionnées (paramètre 20). En outre, la durée totale d'ingestion de sève élaborée est significativement réduite sur Col (paramètre 26), même si la durée totale d'ingestion soutenue (supérieure à 10 min) ne varie pas de façon significative (paramètre 29). Enfin, un puceron engage significativement plus de phases d'ingestion de sève brute dans le xylème (paramètre 35) lorsqu'il s'alimente sur l'écotype Col. Une ACP réalisée sur les principaux paramètres cités ci-dessus montre un non-chevauchement des ellipses de confiance, chaque ellipse représentant chaque écotype (**Figure 51**). Les différences significatives entre les plants abordées précédemment permettent donc de différencier clairement le comportement trophique de *M. persicae* s'alimentant sur *A. thaliana* WS et Col.

Est-ce que cette différence de comportement trophique entre ces deux écotypes est aussi retrouvée chez d'autres espèces de pucerons ? Parmi les espèces de pucerons disponibles au laboratoire « Bio-écologie des Insectes Phytophages et Entomophages », des EPG ont été réalisées avec un autre puceron polyphage (*Aphis fabae*, non habitué à s'alimenter sur *A. thaliana*) et un puceron oligophage (*Brevicoryne brassicae*, s'alimentant sur des plantes de la famille des Brassicaceae).

Tableau 19 Moyennes des paramètres de comportement alimentaire de *M. persicae*, *B. brassicae* et *A. fabae* étudié durant un accès de 8 h aux feuilles *d'A. thaliana* WS

	WS						Col				
Paramètres EPG	*Myzus persicae* n=20	n	*Brevicoryne brassicae* n=15	n	*Aphis fabae* n=16	n	*Brevicoryne brassicae* n=13	n	P1 M/B/A	P2 M/B	P3 M/A	P4 B/A
Phase de non-pénétration des stylets (NP)												
1. Durée totale des NP	130.31 ± 18.73	20	136.67 ± 19.40	15	192.68 ± 24.21*	16	118.76 ± 28.83	13	0.027	1.000	0.022	0.225
Phase de pénétration des stylets (Pr)												
2. Nombre de Pr	32.45 ± 3.33	20	17.60 ± 1.84**	15	18.31 ± 3.21***	16	12.62 ± 2.38	13	0.000	1.1E-03	6.0E-04	1.000
3. Durée totale des Pr	349.69 ± 18.73	20	343.33 ± 19.40	15	287.32 ± 24.21*	16	360.92 ± 28.84	13	0.023	1.000	0.018	0.217
4. Temps écoulé avant le 1er Pr	4.10 ± 0.86	20	17.19 ± 6.66	15	17.44 ± 5.42	16	12.52 ± 3.16	13	0.012	0.052	0.064	1.000
Phase de recherche (C)												
5. Nombre de C	38.05 ± 3.42	20	22.93 ± 1.90***	15	21.00 ± 3.02***	16	**15.31 ± 2.68***	**13**	0.000	9.4E-04	4.8E-05	1.000
6. Durée moyenne d'un C	4.10 ± 0.29	20	13.71 ± 1.30***	15	7.80 ± 1.24**	14	25.38 ± 6.83	13	0.000	3.0E-09	0.006	0.060
7. Durée totale des C	138.36 ± 11.43	20	287.83 ± 14.50***	15	145.46 ± 14.63	14	257.83 ± 29.96	13	0.000	1.0E-06	1.000	0.000
Piqûres intracellulaires (pd)												
8. Nombre de pd	30.40 ± 3.63	20	30.86 ± 5.92	14	14.36 ± 2.78**	14	17.46 ± 3.15	13	0.002	1.000	0.001	0.045
9. Durée moyenne d'un pd	5.00 ± 0.15	20	7.73 ± 0.25***	14	7.42 ± 0.71***	14	8.12 ± 0.27	13	0.000	8.7E-09	7.0E-06	1.000
10. Temps avant le 1er pd depuis le début de l'enregristrement	5.36 ± 0.83	20	18.08 ± 6.00	14	14.66 ± 4.58	14	27.49 ± 10.73	13	0.061	0.110	0.383	1.000
11. Temps avant le 1er pd depuis le 1er Pr	0.51 ± 0.16	20	4.88 ± 1.95	14	1.48 ± 0.56	14	14.97 ± 9.66	13	0.112	0.187	0.563	1.000
12. Nombre de pd par minute de C	0.24 ± 0.04	20	0.11 ± 0.02**	14	0.10 ± 0.02**	14	0.08 ± 0.01	13	0.0003	0.009	0.003	1.000
Phases phloémiennes												
Phase de salivation (E1)												
13. Nombre de salivation extracellulaire (E1e)	0.10 ± 0.07	20	0.80 ± 0.37	15	0.69 ± 0.39	16	0.00 ± 0.00	13	0.098	0.427	1.000	1.000
14. Durée moyenne d'un E1e	13.82 ± 13.34	2	4.95 ± 0.71	6	14.78 ± 7.39	4	0.00 ± 0.00	0	0.413	1.000	1.000	0.600
15. Durée totale des E1e	13.82 ± 13.34	2	10.31 ± 4.54	6	62.11 ± 51.25	4	0.00 ± 0.00	0	0.216	0.6909	1.000	0.271
16. Nombre de salivations simples (sgE1)	0.95 ± 0.26	20	2.20 ± 0.91	15	0.44 ± 0.18	16	0.69 ± 0.27	13	0.029	0.211	0.646	0.044
17. Durée moyenne d'un sgE1	3.68 ± 0.91	10	2.71 ± 0.32	12	11.86 ± 6.29	5	5.10 ± 1.78	6	0.505	0.948	1.000	1.000
18. Durée totale des sgE1	7.36 ± 2.36	10	8.75 ± 4.20	12	17.07 ± 9.54	5	9.50 6.12	6	0.779	1.000	1.000	1.000
19. Durée moyenne d'une salivation fractionnée (frE1)	1.51 ± 0.29	18	2.34 ± 0.34**	10	6.06 ± -	1	3.40 ± 0.77	9	0.003	0.009	0.181	1.000
20. Durée totale des frE1	8.49 ± 2.66	18	4.09 ± 1.22	9	12.12 ± -	1	5.99 ± 0.98	9	0.261	1.000	0.542	0.340
21. Nombre de salivations totales E1 (sgE1+frE1)	5.35 ± 0.97	20	3.73 ± 1.11	15	0.56 ± 0.20***	16	2.15 ± 0.56	13	0.000	0.931	1.1E-05	0.014
22. Durée moyenne d'un E1	1.79 ± 0.28	19	2.35 ± 0.34*	11	10.90 ± 5.23*	6	4.12 ± 0.97	10	0.002	0.041	0.014	1.000
23. Durée totale des E1	11.92 ± 3.26	19	8.77 ± 1.98	12	16.25 ± 7.83	6	11.09 ± 3.98	10	0.413	0.797	1.000	1.000
Phase d'ingestion de sève élaborée (E2)												
24. Nombre de E2	4.05 ± 0.72	20	1.53 ± 0.38	15	0.06 ± 0.06***	16	1.46 ± 0.40	13	0.000	0.067	1.9E-07	0.047
25. Durée moyenne d'un E2	81.66 ± 28.25	19	7.94 ± 1.65***	11	12.84 ± -	1	67.82 ± 34.64	9	0.0003	1.7E-04	1.000	1.000
26. Durée totale des E2	178.66 ± 29.66	19	13.80 ± 2.25***	11	12.84 ± -	1	94.03 ± 33.76	9	0.000	1.0E-06	0.222	1.000
27. Nombre de E2 soutenues (sE2 = E2 >10min)	2.45 ± 0.42	20	0.27 ± 0.12***	15	0.06 ± 0.06***	16	**1.08 ± 0.30***	**13**	0.000	1.5E-04	2.0E-06	1.000
28. Durée moyenne d'un sE2	92.43 ± 27.48	18	14.88 ± 1.53*	4	12.84 ± -	1	**70.14 ± 34.13***	**9**	0.004	0.011	0.281	1.000
29. Durée totale des sE2	171.77 ± 30.32	18	14.88 ± 1.53**	4	12.84 ± -	1	**92.06 ± 34.28***	**9**	0.002	0.005	0.234	1.000
30. Temps avant le 1er E depuis le début de l'enregistrement	160.66 ± 29.47	19	217.54 ± 41.92	15	425.99 ± 24.73***	16	295.80 ± 42.64	13	0.000	1.000	1.4E-05	0.001
31. Temps avant la 1ère séquence E1-E2 depuis le 1er Pr	179.96 ± 31.52	19	290.90 ± 39.25	15	452.62 ± 10.46***	16	295.82 ± 44.31	13	0.000	0.515	1.0E-06	0.011
Autres paramètres												
32. Nombre de déraillements des stylets (F)	1.00 ± 0.30	20	0.27 ± 0.21	15	1.50 ± 0.35	16	0.38 ± 0.15	13	0.007	0.062	0.660	0.014
33. Durée moyenne d'un F	21.80 ± 5.84	11	41.83 ± 8.33	2	71.55 ± 8.52*	11	45.58 ± 19.09	5	0.016	1.000	0.012	1.000
34. Durée totale des F	40.63 ± 10.97	11	75.33 ± 25.16	2	139.34 ± 23.14***	11	45.58 ± 19.09	5	8.0E-04	1.000	4.9E-04	0.839
35. Nombre d'ingestion de sève xylémienne (G)	0.20 ± 0.09	20	0.67 ± 0.19	15	0.13 ± 0.09	16	0.54 ± 0.22	13	0.046	0.769	0.446	0.119
36. Durée moyenne d'un G	59.04 ± 47.49	4	33.67 ± 11.70	8	79.40 ± 48.48	2	21.60 ± 5.71	5	0.482	1.000	0.732	0.744
37. Durée totale des G	59.04 ± 47.49	4	37.17 ± 11.28	8	79.40 ± 48.48	2	31.84 ± 10.37	5	0.644	1.000	1.000	1.000
Nombre de paramètres significatifs			13		16							

n, nombre de pucerons; temps et durées sont exprimés en minutes (sauf "a-pd" en secondes)

M= *Myzus persicae*, B= *Brevicoryne brassicae*, A= *Aphis fabae*

P1 : valeurs P issues du test de Kruskal-Wallis comparant les 3 espèces (M/B/A)

P2, P3, P4 : valeurs P issues du test post-hoc de comparaison multiple des moyennes entre deux espèces deux à deux (M/B, M/A, B/A)

Différences entre pucerons sur WS	
p < 0,05	*
p < 0,01	**
p < 0,001	***

Différences *B. brassicae* sur WS et Col	
p < 0,05	*

2.1.3.2. Effet sur le comportement trophique de *Brevicoryne brassicae* et *Aphis fabae*

Nous avons comparé le comportement trophique des trois espèces de pucerons *B. brassicae*, *A. fabae* et *M. persicae* sur les deux écotypes sauvages d'*A. thaliana* WS et Col par des analyses EPG (**Tableau 19**).

Les analyses statistiques montrent dans un premier temps de nombreux paramètres significativement différents entre *M. persicae* et *A. fabae* (16 paramètres) et entre *M. persicae* et *B. brassicae* (13 paramètres). Un fort rejet d'*A. thaliana* WS a rapidement été observé concernant *A. fabae*. En effet, *A. fabae* a passé plus de temps que *M. persicae* en dehors des tissus foliaires d'*A. thaliana* WS (paramètre 1, 40 % des 8 h d'enregistrement, contre 27 % pour *M. persicae*), avec une phase de recherche en moyenne plus longue (paramètre 6 ; 1,77 fois). De plus, les quelques phases de salivation engagées ont duré beaucoup plus longtemps que chez *M. persicae* (paramètre 22 ; 2,8 fois). Enfin, un seul adulte *A. fabae* (sur 16 testés) s'est alimenté sur *A. thaliana* WS. Nous n'avons donc pas continué ces expérimentations sur Col pour ce puceron, les effectifs ne permettant pas de comparaison à terme.

Même si le temps passé par les stylets dans les tissus de la plante ne varie pas entre *M. persicae* et *B. brassicae*, le temps passé par ces derniers à l'intérieur des tissus à chercher le phloème est plus important pour *B. brassicae* (paramètres 6 et 7 ; respectivement 3,3 et 2 fois). Une phase de salivation dure en moyenne plus longtemps que *M. persicae* (paramètre 22) mais la différence la plus importante concerne l'ingestion de sève élaborée. En effet, seulement un tier des individus *B. brassicae* testés ingèrent de la sève élaborée sur WS (paramètre 29), de façon beaucoup plus limitée que *M. persicae* (11 fois moins), même lorsqu'il s'alimente sur Col (2 fois moins). *B. brassicae* n'accepte donc pas *A. thaliana* WS, dans une moindre mesure par rapport à *A. fabae* mais semble préférer l'écotype Col. En effet, *B. brassicae* ingère significativement plus de sève élaborée sur Col que sur WS (paramètre 29 ; 6,2 fois).

La variation naturelle d'*A. thaliana* entre deux écotypes sauvages modifie fortement le comportement trophique des pucerons mais de façon différente entre *M. persicae* et *B. brassicae*. L'ensemble des principales phases de leur alimentation est touché. La phase précédant la pénétration des stylets dans les tissus foliaires, la phase de recherche des tubes criblés pouvant faire intervenir la paroi végétale mais aussi les phases phloémiennes et xylémiennes. Les effets observés à court terme (8 h) sur le comportement trophique de *M. persicae* lorsqu'il s'alimente sur les plants transgéniques ou sauvages peuvent-ils aussi avoir un impact à plus long terme au niveau de ses paramètres démographiques ?

Tableau 20 Paramètres démographiques des individus *M. persicae* se développant durant 21 jours sur les différentes plantes d'*A . thaliana* étudiées
(a) WS, *pme17* et *pme3* ; **(b)** Col, *pmei4* et 35S:PMEI4::GFP et **(c)** WS et Col

	avril-mai 2010				décembre 2009-mars 2010			
Paramètres démographiques	**WS** n=38	***pme17*** n=39	t	P	**WS** n=26	***pme3*** n=30	t	P
Période pré-reproductive (jours)	8.13 ± 0.32	7.62 ± 0.246	-1.290	0.199	10.04 ± 0.29	9.70 ± 0.399	-0.840	0.399
Fécondité journalière (nymphes/femelle/jour)	2.69 ± 0.11	2.41 ± 0.13	-1.660	0.102	2.25 ± 0.18	2.21 ± 0.843	-0.200	0.943
Taux d'accroissement naturel r_m (femelles/femelle/jour)	0.267 ± 0.007	0.262 ± 0.004	-0.650	0.517	0.206 ± 0.007	0.211 ± 0.460	0.740	0.460
Temps de doublement (jours)	2.66 ± 0.07	2.67 ± 0.04	0.170	0.863	3.44 ± 0.09	3.34 ± 0.29	-1.060	0.294

	février-mai 2011				
Paramètres démographiques	**Col** n=38	***pmei4*** n=38	**35S:PMEI4::GFP** n=40	F	P
Période pré-reproductive (jours)	8.13 ± 0.28	7.74 ± 0.32	8.33 ± 0.3	1.039	0.357
Fécondité journalière (nymphes/femelle/jour)	2.25 ± 0.09	2.10 ± 0.12	2.15 ± 0.09	0.569	0.568
Taux d'accroissement naturel r_m (femelles/femelle/jour)	0.240 ± 0.005	0.240 ± 0.010	0.240 ± 0.004	0.429	0.653
Temps de doublement (jours)	2.93 ± 0.05	2.93 ± 0.07	2.98 ± 0.05	0.192	0.826

Paramètres démographiques	**WS** n=60	**Col** n=38	t	P
Période pré-reproductive (jours)	8,70 ± 0,25	8,13 ± 0,28	1,509	0,135
Fécondité journalière (nymphes/femelle/jour)	2,53 ± 0,10	**2,25 ± 0,09***	**2,043**	**0,044**
Taux d'accroissement naturel r_m (femelles/femelle/jour)	0,245 ± 0,006	0,240 ± 0,005	0,708	0,481
Temps de doublement (jours)	2,93 ± 0,07	2,93 ± 0,05	-0,050	0,960

n, nombre de pucerons par série expérimentale. Moyennes ± SE ; t, valeur issue du test *t* de Student ; F, valeur de Fisher issue de l'ANOVA réalisée ; P, valeur P. P < 0,05 (*, jaune)

2.2. Effet sur ses paramètres démographiques

Un suivi physiologique d'une seule génération de puceron a été effectué tous les 3 jours durant 21 jours, à partir d'une larve néonate (âgée de 24 h) par plant d'*A. thaliana*, qui est déposée le premier jour sur la rosette. A partir de la période reproductive (autour de 10 jours) les larves formées ont été dénombrées puis retirées des rosettes lors de chaque relevé. Les données recueillies en mesurant 4 paramètres démographiques doivent permettre de mettre en évidence des traits d'histoire de vie du puceron. Ainsi la période pré-reproductive (PRP), correspondant à la période écoulée avant de devenir adulte reproducteur constitue le premier paramètre. Durant la période reproductive, la fécondité journalière constitue le second paramètre. La combinaison de ces deux premiers paramètres a permis de calculer deux paramètres supplémentaires : le taux d'accroissement naturel intrinsèque (r_m) et le temps de doublement de population.
En premier lieu, il est important de préciser que toutes les larves néonates déposées sur les plantes sauvages ou transgéniques sont restées vivantes après les 21 jours de suivi physiologique. Les taux de survie (larvaires, adultes) n'ont pas été affectés par la modification des gènes *PME17*, *PME3* ou *PMEI4*.

Durant un suivi de 21 jours, ces modifications de gène n'altèrent pas significativement les paramètres démographiques de *M. persicae*, comparés aux plants sauvages respectives (**Tableau 20a et 20b**). Les différentes expérimentations de comparaison de l'effet des mutations sur la biologie du puceron par rapport aux plantes sauvages (WS et Col) ont été effectuées sur des périodes différentes de l'année. Les valeurs mesurées pour deux expérimentations comprenant chacune trois réplicats biologiques sur les plantes WS semblent varier au cours de l'année, une expérience effectuée en hiver (WS-*pme3*) et l'autre au printemps (WS-*pme17*) (**Tableau 20a**). Ceci suggère un impact des conditions expérimentales / environnementales. Pour une expérimentation, celles-ci doivent cependant s'appliquer indifféremment sur les plantes sauvages ou transgéniques, d'où un non regroupement des deux lots WS. Toutefois pour comparer WS et Col, afin de prendre en compte un maximum de variabilité, les deux lots de pucerons s'alimentant sur WS ont été fusionnés. L'effet lié à la variabilité naturelle des plantes est présenté dans le **Tableau 20c** en tenant compte des diverses expérimentations.

La variation naturelle d'*A. thaliana* engendre donc un effet sur le comportement trophique et la physiologie de *M. persicae*. La modification des gènes *PME* ou *PMEI* peut influencer son comportement trophique à court terme, sans que cela n'ait de répercussion sur ses paramètres démographiques à moyen terme (21 jours). Nous allons maintenant analyser les conséquences de ces modifications au niveau de la physiologie de la plante.

3. Impact de deux PME et d'un PMEI sur la physiologie de la plante et sa réponse à une infestation aphidienne

Avant d'étudier le rôle de la PME17, de la PME3 et du PMEI4 chez les plantes au cours de l'infestation aphidienne, il est important de réaliser au préalable une étude des plants n'ayant pas été infestés. Ceci permettra d'appréhender les modifications engendrées suite à la mutation ou surexpression des gènes étudiés et les différences que l'on peut observer de façon constitutive entre les deux écotypes sauvages *A. thaliana* WS et Col. Ensuite, il s'agira d'observer les modifications engendrées par une infestation (10 pucerons *M. persicae* adultes / rosette) sur les écotypes sauvages et sur les différents plants transgéniques.
Des analyses spécifiques à la paroi des cellules foliaires ont été menées, au niveau de sa structure, de sa composition en monosaccharides et de l'activité d'enzymes dégradant les HG (PME et PG). Des analyses plus globales ont permis d'avoir une vue d'ensemble au niveau de la feuille entière de l'expression de l'ensemble des gènes (analyses transcriptomiques) affectés par les mutations/surexpressions des gènes étudiés, par la variation naturelle entre écotypes et enfin par l'infestation aphidienne (sur plants sauvages et transgéniques).

3.1. Effets sur la paroi des cellules foliaires

Les études menées au niveau de la paroi végétale concernent sa structure, au niveau de l'abondance en liaisons chimiques et sa composition en monosaccharides (issus d'une hydrolyse des polysaccharides pariétaux non cellulosiques). En parallèle, des mesures d'activité PME et PG ont été réalisées.

3.1.1. Structure de la paroi

Les différentes comparaisons réalisées pour l'étude des métabolites ont aussi été effectuées lors des analyses pariétales, afin de mettre en évidence l'effet des différentes mutations ou surexpressions, de la variation naturelle d'*A. thaliana* et de l'infestation aphidienne sur les plants sauvages et transgéniques. La spectrométrie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FT-IR) a permis une analyse des parois des cellules foliaires des différents plants, au niveau des liaisons chimiques de chaque composant de la paroi absorbant à différents nombres d'onde. Les spectres obtenus pour deux modalités (exemple : plants sauvage/mutant, infesté/non infesté) ont été comparés en réalisant un test *t* de Student afin de déterminer les différences significatives entre les absorbances moyennes enregistrées pour chaque nombre d'onde (**Figures 52, 53**). Les valeurs de significativité (valeurs *t*) ont été reportées sur un graphique (axe *x*) ainsi que les nombres d'onde des spectres (axe *y*). Le test indique un seuil de significativité, les variations se trouvant en dehors des deux lignes rouges étant significativement différentes entre les deux modalités testées. Pour une comparaison (plante 1/ plante 2), les valeurs positives ou négatives indiquent respectivement un appauvrissement ou un enrichissement pour la plante 1. Les variations chez les plants non infestés ont dans un premier temps été estimées.

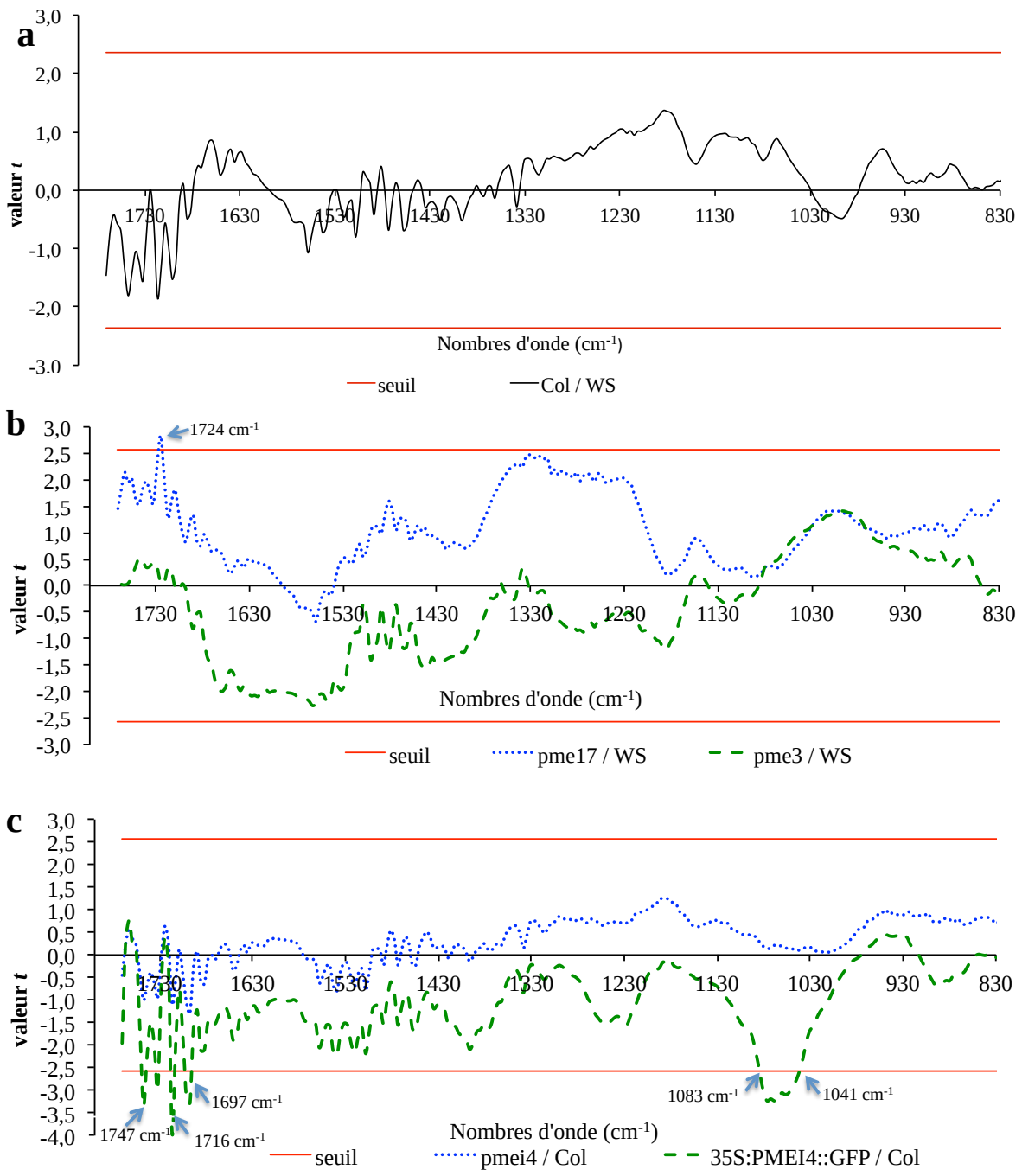


Figure 52 Comparaison par un test *t* de Student des spectres FT-IR d'échantillons collectés à partir de parois de cellules foliaires des différents plants transgéniques et sauvages non infestés

(a) les plants Col sont comparés aux plants WS ; **(b)** les plants *pme17* (pointillés bleus) et *pme3* (pointillés verts) sont comparés au plant sauvage WS ; **(c)** les plants *pmei4* (pointillés bleus) et 35S:PMEI4::GFP (pointillés verts) sont comparés au plant sauvage Col (2 répétitions biologiques, 6 plantes par modalité). La valeur *t* des différentes comparaisons effectuées (axe *y*) est tracée en fonction des nombres d'onde (axe *x*). Les lignes rouges horizontales font référence au seuil de significativité P = 0,95, défini selon la table des valeurs critiques du test *t* de Student. Les nombres d'onde se situant en dehors des deux lignes rouges indiquent des différences significatives. Les flèches pointent des nombres d'onde caractéristiques. Les valeurs *t* positives ou négatives indiquent respectivement un appauvrissement ou un enrichissement chez les plants transgéniques.

3.1.1.1. Au sein des feuilles des plants non infestés

La comparaison des spectres FT-IR des plants *A. thaliana* WS et Col n'indique aucun changement majeur au niveau des liaisons chimiques au sein des parois entre les deux écotypes (**Figure 52a**).

Au niveau du mutant *pme17*, une variation significative à 1724 cm^{-1} est détectée lorsque l'on compare par rapport aux spectres acquis sur les plants WS (**Figure 52b**). Ceci indique une diminution chez les plants *pme17* (par rapport aux plants WS) du nombre de liaisons C=O des esters carboxyliques ($COO-CH_3$, Mouille *et al.* (2003)), sans changement du nombre de liaisons C=O des acides carboxyliques (COOH, < 1700 cm^{-1}). Ceci suggère que le degré de méthylestérification (DM) des HG pourrait être réduit dans les feuilles du mutant *pme17*. Chez le mutant *pme3*, la structure de la paroi et des pectines ne semble pas significativement affectée par rapport à celle de la plante sauvage WS (**Figure 52b**).
Le mutant *pmei4* ne présente aucune variation significative de sa composition pariétale par rapport au sauvage Col. Au niveau du surexpresseur 35S:PMEI4::GFP, les analyses FT-IR indiquent des modifications importantes, notamment au niveau du nombre de liaisons C=O des esters carboxyliques par rapport aux plants sauvages Col (**Figure 52c**). En effet, les parois des cellules foliaires des surexpresseurs contiennent significativement plus de méthylesters (1747, 1716 et 1697 cm^{-1}). Ces variations suggérent ainsi un DM des HG plus élevé chez le surexpresseur que chez le sauvage, à l'inverse de ce qui a été observé chez le mutant *pme17*. De plus, le surexpresseur contient aussi davantage de liaisons glycosidiques (de 1083 à 1041 cm^{-1}), suggérant une teneur plus importante en polysaccharides dans les parois de ses cellules foliaires.
L'ensemble des modifications observées au niveau du nombre de liaisons chimiques au sein des parois de cellules foliaires des plants transgéniques et sauvages non infestés est résumé ci-dessous :

Nombre de liaisons chimiques	***pme3*** /WS	***pme17*** /WS	***pmei4*** /Col	**35S:PMEI4::35S** /Col	**Col** /WS
Liaisons C=O esters carboxyliques		↘		↗	
Liaisons glycosidiques				↗	

↗ ou ↘ : nombre de liaisons respectivement plus importante ou plus faible chez les plants écrits en gras par rapport aux plants comparés

3.1.1.2. Au sein des feuilles après une infestation par *M. persicae*

Les analyses FT-IR indiquent que les feuilles d'*A. thaliana* WS présentent une différence significative de composition pariétale après une infestation de 24 h par *M. persicae*, alors que celles de l'écotype Col n'en présentent aucune (**Figure 53a**). En effet, il y a une augmentation significative du contenu en liaisons amides (1558 cm^{-1}) au sein des parois des feuilles WS infestées par rapport aux feuilles non infestées. Ceci pourrait être corrélé à une augmentation du contenu relatif en protéines.

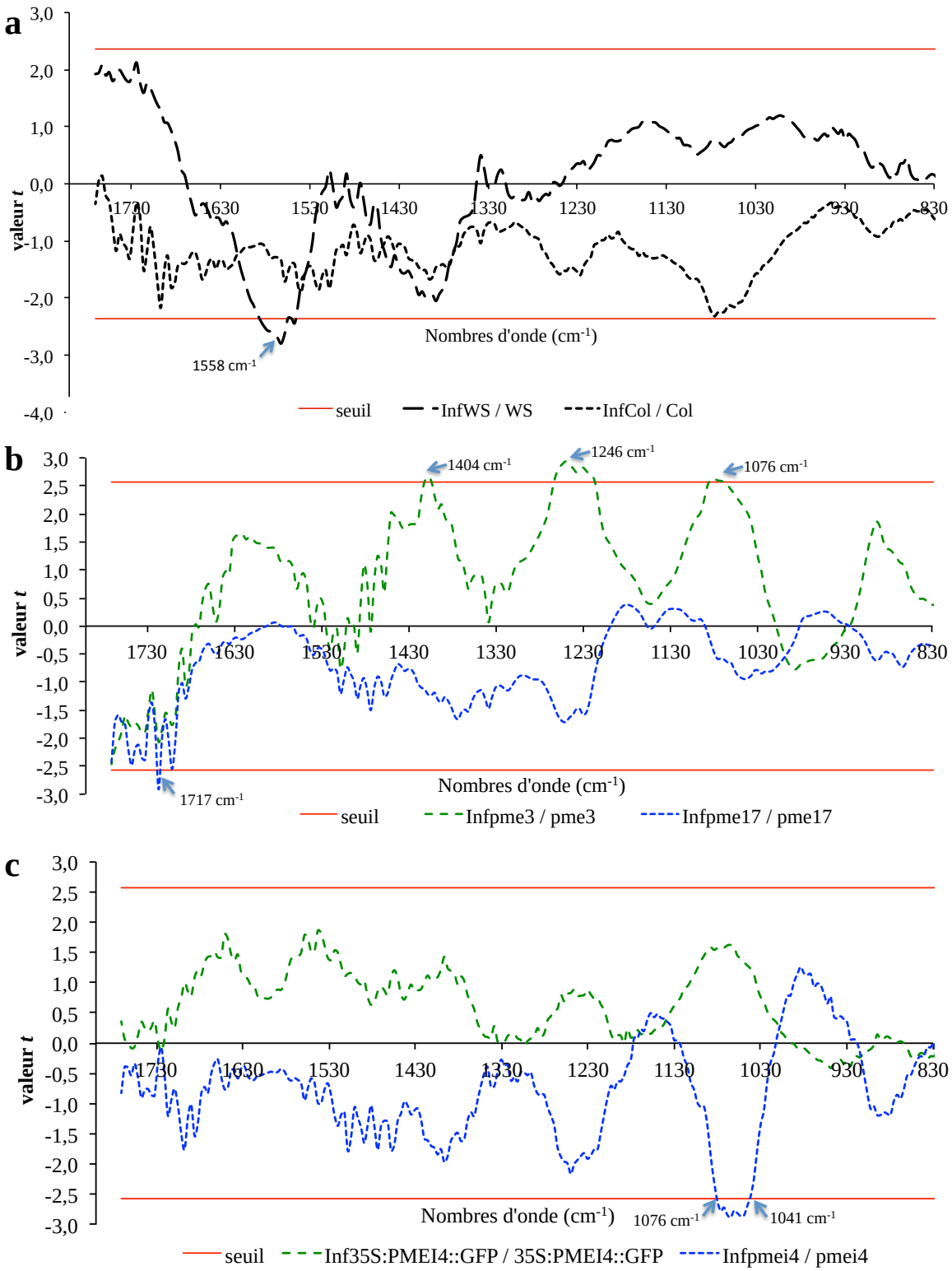


Figure 53 Comparaison par un test *t* de Student des spectres FT-IR d'échantillons collectés à partir de parois de cellules foliaires des plants transgéniques et sauvages infestés par *M. persicae* et des non infestés correspondants

Les différents plants d'*A. thaliana* sont infestés (Inf) par 10 adultes *M. persicae*. Ils sont comparés aux plants non infestés respectifs. **(a)** les plants WS et Col ; **(b)** les plants *pme17* et *pme3* et **(c)** les plants *pmei4*, 35S:PMEI4::GFP (2 répétitions biologiques, 6 plantes par modalité). La valeur *t* des différentes comparaisons effectuées (axe *y*) est tracée en fonction des nombres d'onde (axe *x*). Les lignes rouges horizontales font référence au seuil de significativité P = 0,95, défini selon la table des valeurs critiques du test *t* de Student. Les nombres d'onde se situant en dehors des deux lignes rouges indiquent des différences significatives. Les flèches pointent des nombres d'onde caractéristiques. Les valeurs *t* positives ou négatives indiquent respectivement un appauvrissement ou un enrichissement chez les plants infestés.

Après l'infestation aphidienne, la structure de la paroi est significativement altérée chez les deux mutants *pme17* et *pme3* mais de façon différente. Le contenu relatif en liaisons esters carboxyliques est significativement plus important chez les plants *pme17* infestés par rapport aux *pme17* non infestés (1717 cm^{-1}, **Figure 53b**). Ceci suggère que l'infestation provoque chez *pme17* une augmentation de contenu en méthylesters et donc probablement du DM des HG. Le nombre de liaisons carboxyliques esters n'est pas significativement modifié chez *pme3* suite à l'infestation (**Figure 53b**) mais il y a moins de liaisons C-H issues des CH_2 (1404 cm^{-1}), de liaisons C-O (1246 cm^{-1}) et de liaisons glycosidiques (1076 cm^{-1}) que chez les plants *pme3* non-infestés. Ces variations montrent d'éventuelles modifications pariétales au niveau des polysaccharides, au niveau des pectines ou de composés phénoliques comme la lignine ainsi que de composés d'autre nature (lipidiques).
Par ailleurs, on peut noter que l'augmentation du contenu relatif en protéines observée chez WS suite à l'infestation (1558 cm^{-1}) n'est plus retrouvée chez les deux mutants suite à l'infestation aphidienne.
Les parois des cellules foliaires des plants 35S:PMEI4::GFP infestés ne présentent pas de variations significatives de leur composition par rapport à celles des plants non infestés (**Figure 53c**). Enfin, il y a davantage de liaisons glycosidiques (de 1076 à 1041 cm^{-1}) chez les plants *pmei4* suite à l'infestation (**Figure 53c**).

L'ensemble des modifications observées au niveau du nombre de liaisons chimiques au sein des parois de cellules foliaires des plants infestés (Inf) par *M. persicae* par rapport aux plants non infestés est résumé ci-dessous :

Nombre de liaisons chimiques	**InfWS** /WS	**Inf*pme17*** */pme17*	**Inf*pme3*** */pme3*	**InfCol** /Col	**Inf*pmei4*** */pmei4*	**Inf35S:PMEI4::GFP** /35S:PMEI4::GFP
Liaisons C=O esters carboxyliques		↗				
Liaisins C-O			↘			
Liaisons glycosidiques			↘		↗	
Liaisons amides	↗					
Liaisons C-H des CH_2			↘			

↗ ou ↘ : nombre de liaisons respectivement plus importante ou plus faible chez les plants écrits en gras par rapport aux plants comparés.

Les liaisons esters carboxyliques pouvant être reliées aux pectines sont modifiées par la mutation *pme17* ou la surexpression 35S:PMEI4::GFP. et suite à l'infestation chez *pme17*. L'infestation a un impact mesurable uniquement chez *pme17*. Des études complémentaires ont permis d'estimer la teneur en pectines et leur composition, grâce à l'analyse des monosaccharides présents dans des extraits de parois.

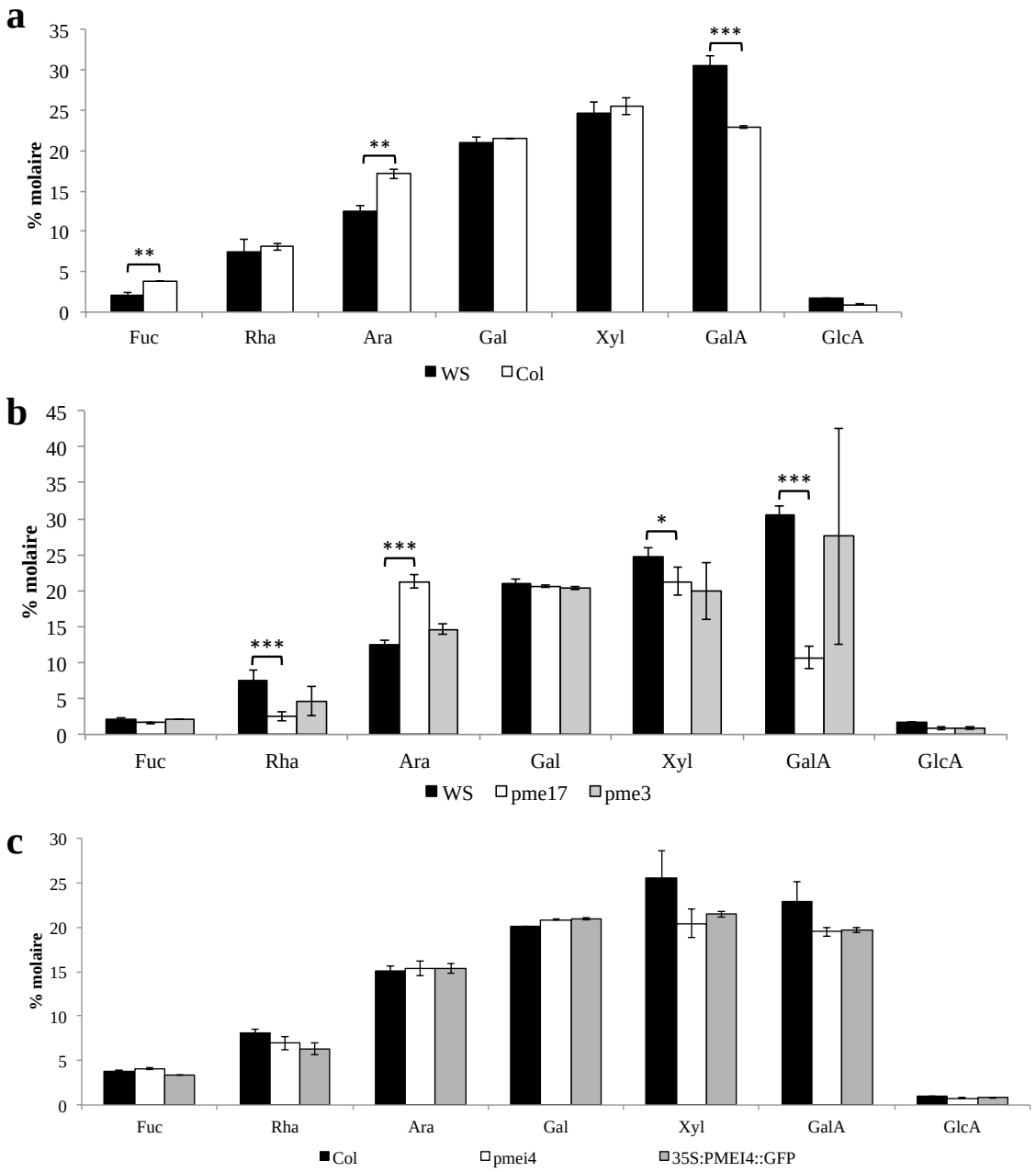


Figure 54 Contenu en monosaccharides pariétaux obtenus par hydrolyse acide d'extraits de parois de cellules foliaires des différents plants transgéniques et sauvages non infestés

Contenu en % molaire estimé chez **(a)** les plants WS et Col **(b)** les plants WS, *pme17* et *pme3* ; **(c)** les plants Col, *pmei4*, et 35S:PMEI4::GFP. Les données représentent la moyenne ± SE de 4 réplicats (2 biologiques composées de 9 plants chacune x 2 techniques). Les astérisques indiquent une différence significative entre deux modalités par un test *t* de Student. P < 0,05 (*), P < 0,01 (**) et P < 0,001 (***). Fuc, fucose ; Rha, rhamnose ; Ara, arabinose ; Gal, galactose ; Xyl, xylose ; GalA, acide galacturonique ; GlcA ; acide glucuronique.

3.1.2. Composition en monosaccharides de la paroi

Après avoir extrait de façon spécifique les parois des cellules foliaires provenant des plants transgéniques et sauvages, une hydrolyse totale avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) a dégradé les polysaccharides en monomères. Ces derniers sont issus de polymères non cellulosiques car la cellulose cristalline est résistante au TFA (Fry 1988). Les monosaccharides obtenus ont été identifiés et quantifiés par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance couplée à une détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD, **Figures 54 et 55**). Les chromatogrammes obtenus permettent d'analyser les compositions au niveau des différents plants non infestés.

3.1.2.1. Au sein des feuilles des plants non infestés

Par rapport à l'écotype Col, l'écotype WS présente une baisse significative du contenu en fucose et en arabinose au niveau des parois des feuilles (respectivement 1,9 et 1,2 fois) et une augmentation du contenu en acide galacturonique (1,3 fois, **Figure 54a**).

Par rapport aux feuilles sauvages WS, les feuilles *pme17* contiennent significativement moins de rhamnose, de xylose et d'acide galacturonique (respectivement 3,0 ; 1,2 et 2,9 fois) alors qu'elles ont plus d'arabinose (1,7 fois) (**Figure 54b**). Par ailleurs, les plants *pme3* ne présentent pas de variations significatives par rapport aux plants WS (**Figure 54b**).
Les modifications du gène *PMEI4* ne contribuent pas à des changements significatifs de la teneur en monosaccharides lorsque l'on compare les plants *pmei4* ou 35S:PMEI4:GFP à leur écotype sauvage Col (**Figure 54c**).

L'ensemble des modifications observées au niveau de la composition en monosaccharides au sein des parois de cellules foliaires des plants non infestés est résumé ci-dessous :

Teneur en monosaccharides	***pme3*** /WS	***pme17*** /WS	***pmei4*** /Col	**35S:PMEI4::35S** /Col	**Col** /WS
Fucose	ns				↗
Rhamnose		↘			
Arabinose		↗			↗
Galactose					
Acide galacturonique		↘			↘
Xylose		↘			

↗ ou ↘ : teneur en monosacharides respectivement plus importante ou plus faible chez les plants écrits en gras par rapport aux plants comparés. ns : variation non significative

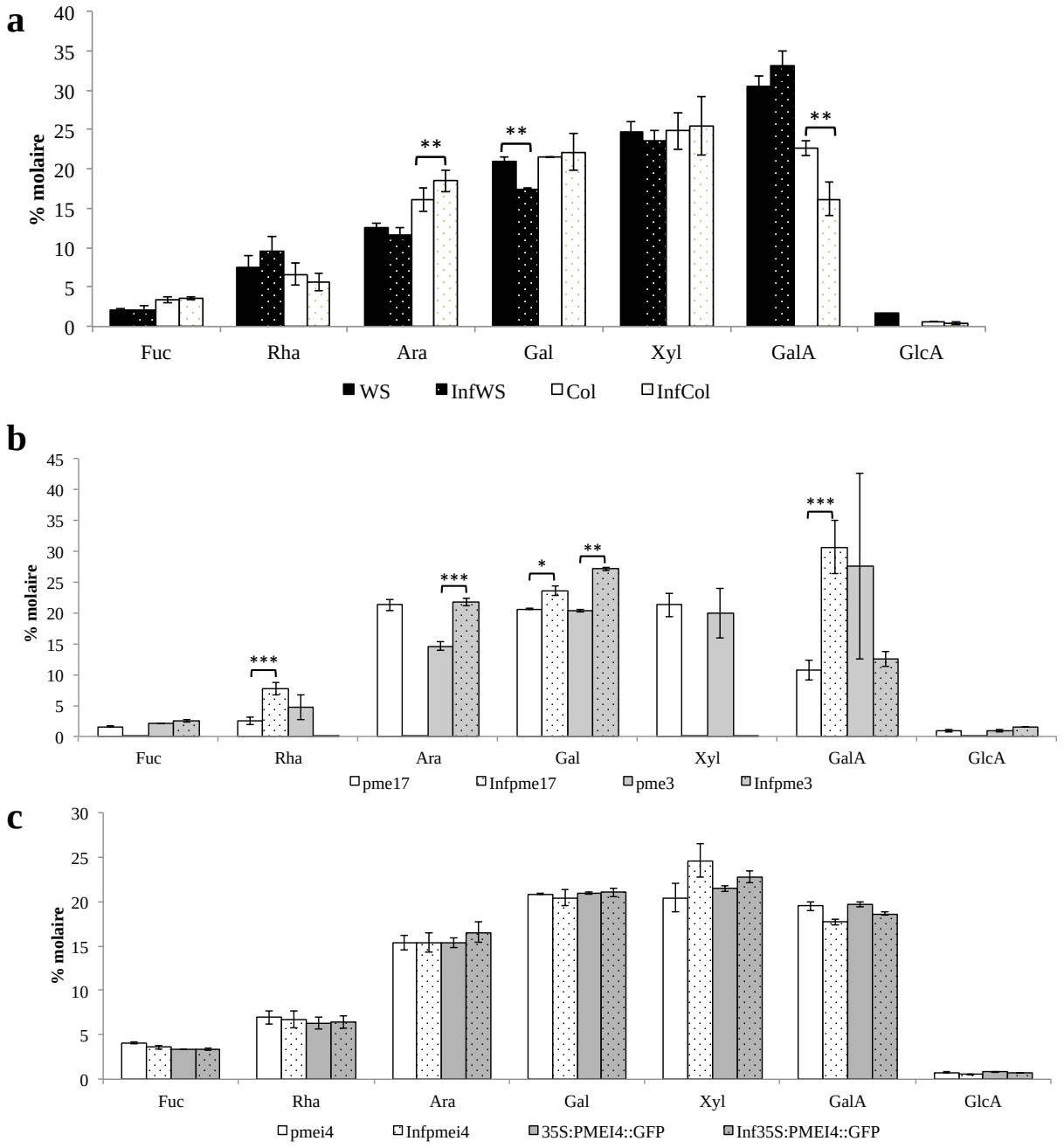


Figure 55 Contenu en monosaccharides pariétaux obtenus par hydrolyse acide d'extraits de parois de cellules foliaires des plants transgéniques et sauvages infestés (Inf) ou non par *M. persicae*

Contenu en % molaire estimé chez **(a)** les plants WS et Col **(b)** les plants WS, *pme17* et *pme3* ; **(c)** les plants Col, *pmei4*, et 35S:PMEI4::GFP. Les données représentent la moyenne ± SE de 4 réplicats (2 biologiques composées de 9 plants chacune x 2 techniques). Les astérisques indiquent une différence significative entre deux modalités par un test *t* de Student. P < 0,05 (*), P < 0,01 (**) et P < 0,001 (***). Fuc, fucose ; Rha, rhamnose ; Ara, arabinose ; Gal, galactose ; Xyl, xylose ; GalA, acide galacturonique ; GlcA ; acide glucuronique.

3.1.2.2. Au sein des feuilles de plants infestés par *M. persicae*

Une infestation modifie significativement le contenu de quelques monosaccharides de façon différentielle chez WS et Col. L'infestation accroît le différentiel du contenu en Ara et en GalA observé entre Col et WS. En effet il y a une augmentation chez Col du contenu en arabinose (1,2 fois) et une diminution de celui en GalA (1,4 fois) alors que chez WS il y a juste une diminution du Gal (1,2 fois) suite à l'infestation (**Figure 55a**).

L'infestation aphidienne engendre une augmentation significative du contenu relatif en rhamnose et en acide galacturonique dans les parois des feuilles *pme17* infestées par rapport aux plants non infestés (respectivement 3,1 et 2,9 fois) ainsi qu'une légère augmentation du contenu en galactose (1,1 fois, **Figure 55b**). Dans les parois des feuilles *pme3*, l'infestation provoque une augmentation significative du contenu en arabinose et en galactose (respectivement 1,5 et 1,3 fois, **Figure 55b**). L'infestation n'engendre pas de variation de teneur en monosaccharides chez les plantes transgéniques pmei4 et 35S:PMEI4::GFP comparées à Col (**Figure 55c**).

L'ensemble des modifications observées au niveau de la composition en monosaccharides au sein des parois de cellules foliaires des plants infestés est résumé ci-dessous :

Teneur en monosaccharides	**InfWS** /WS	**Inf*pme17*** */pme17*	**Inf*pme3*** */pme3*	**InfCol** /Col	**Inf*pmei4*** */pmei4*	**Inf35S:PMEI4::GFP** /35S:PMEI4::GFP
Fucose						
Rhamnose		↗				
Arabinose			↗	↗		
Galactose	↘	↗	↗			
Acide galacturonique		↗		↘		

↗ ou ↘ : teneur en monosacharides respectivement plus importante ou plus faible chez les plants écrits en gras par rapport aux plants comparés.

La composition en monosaccharides et plus particulièrement la teneur en acide galacturonique varie de façon importante chez le mutant *pme17* et entre les écotypes sauvages. Des mesures d'activité des enzymes modifiant les HG (HGME) ont permis d'évaluer l'importance particulière de la modification des HG dans l'interaction plante-puceron.

3.1.3. Activité d'enzymes modifiant les homogalacturonanes

Les activités des deux enzymes étudiées modifiant les HG, les PME et les PG, ont été mesurées dans des extraits de feuilles enrichis en protéines pariétales. Les mesures d'activités PME concernaient deux extractions différentes, une réalisée avec du NaCl (pH 7) et l'autre avec du LiCl (pH 5) afin de prendre potentiellement en compte le plus grand nombre d'isoformes PME. Les activités PG sont mesurées dans des extraits extraits obtenus avec du LiCl (pH 5) car ce sel et ce pH favorise l'activité de la plupart des isoformes PG (Green *et al*. 1989 ; Baldwin *et al*. 2014).

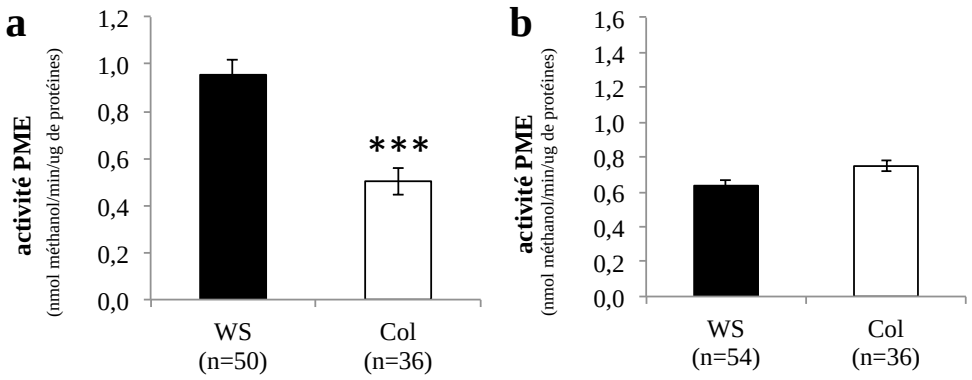


Figure 56 Activité PME totale des extraits de feuilles des plants sauvages *A. thaliana* WS et Col

Les extraits enrichis en protéines pariétales sont obtenus avec un tampon contenant notamment **(a)** 1 M NaCl à pH 7 et **(b)** 1 M LiCl à pH 5. Barres noires (WS) ; barres blanches (Col). Les données représentent la moyenne ± SE d'au moins 3 répétitions biologiques (contenant 9 plants par répétition x 3 techniques, n). Les astérisques indiquent des différences significatives d'après le test de Mann-Whitney. P < 0,001 (***).

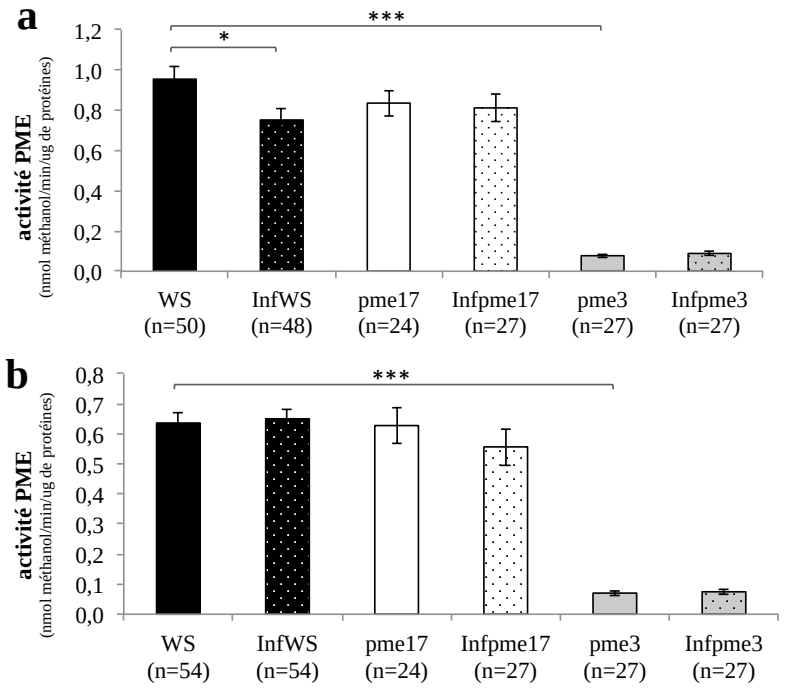


Figure 57 Activité PME totale des extraits de feuilles de plants transgéniques (*pme17* et *pme3*) ou sauvages (*A. thaliana* WS), infestés (Inf) ou non par *M. persicae*

Les extraits enrichis en protéines pariétales sont obtenus avec un tampon contenant notamment **(a)** 1 M NaCl à pH 7, **(b)** 1 M LiCl à pH 5. Les barres pleines correspondent aux plants non infestés et celles avec des pointillés aux plants infestés. Barres noires, sauvages WS (WS) ; barres blanches, *pme17* (pme17) ; barres grises, *pme3* (pme3). Les données représentent la moyenne ± SE d'au moins 3 répétions biologiques (contenant 9 plants par répétition x 3 techniques, n). Les astérisques indiquent des différences significatives d'après le test de Mann-Whitney. P < 0,05 (*), P < 0,001 (***).

3.1.3.1. Activité pectine méthylestérases

3.1.3.1.1. Au sein des feuilles des plants non infestés

Après une extraction avec du NaCl à pH 7, l'activité PME est statistiquement 2 fois plus faible dans les feuilles de l'écotype Col par rapport à celles de l'écotype WS (**Figure 56a**). Cependant, suite à l'extraction avec du LiCl à pH 5 l'activité PME ne varie pas significativement entre les deux écotypes (**Figure 56b**).

Les extractions au NaCl (pH 7) et au LiCl (pH 5) ne montrent aucune variation significative d'activité PME chez le mutant *pme17* Par rapport aux plants WS (**Figure 57a et b**). Chez le mutant *pme3*, il y a au contraire une très forte baisse significative de l'activité PME dans les deux extraits enrichis en protéines protéines (respectivement 13,0 et 9,0 fois, **Figure 57a et b**). Les modifications du gène *PMEI4* engendrent des variations de l'activité PME uniquement suite à une extraction avec du NaCl à pH 7 (**Figure 58a**). Chez le mutant *pmei4* l'activité PME augmente significativement de 17 % et de 18 % chez le surexpresseur 35S:PMEI4::GFP, par rapport au sauvage Col.

3.1.3.1.2. Au sein des feuilles après une infestation par M. persicae

Après l'infestation aphidienne, dans les deux fractions enrichies en protéines pariétales des plants Col infestés, l'activité PME augmente significativement (1,3 fois ; **Figure 58a et b**) que dans les plants Col non infestés. Cependant l'infestation chez les plants WS provoque une baisse significative de cette activité dans les extraits 1 M NaCl pH 7 (1,3 fois) alors qu'aucun effet n'est observé dans les extraits 1 M LiCl pH 5 (**Figure 57a**).

Chez les mutants *pme17* et *pme3*, aucune variation significative de l'activité PME n'a été détectée dans les deux extraits protéiques (**Figure 57a et b**) suite à l'infestation. Toutefois le mutant *pmei4* et le surexpresseur 35S:PMEI4::GFP, montrent une augmentation de l'activité PME dans les deux extraits (respectivement 1,3 et 1,4 fois ; **Figure 58a et b**).

3.1.3.2. Activité polygalacturonases

3.1.3.2.1. Au sein des feuilles des plants non infestés

Au niveau des feuilles des plants sauvages non infestés, l'activité PG totale est 2,4 fois plus faible chez Col par rapport à celles chez WS (**Figure 59a**).

L'activité PG ne montre pas de différences significatives entre le mutant *pme17* et le sauvage WS, alors qu'elle est significativement plus importante (1,54 fois) chez le mutant *pme3* (**Figure 59b**). Aucune variation de l'activité PG n'a été constatée chez les plants *pmei4* ou 35S:PMEI4::GFP (**Figure 59c**).

3.1.3.2.2. Au sein des feuilles après une infestation par M. persicae

L'infestation aphidienne augmente de façon significative l'activité PG chez les deux écotypes sauvages Col et WS, respectivement de 2,3 et 1,8 fois (**Figure 59b et c**).

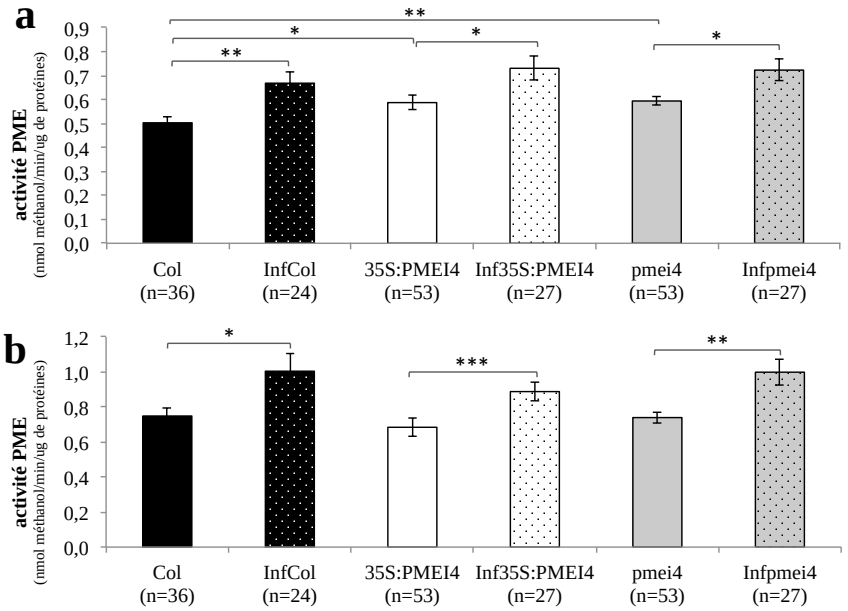


Figure 58 Activité PME totale des extraits de feuilles de plants transgéniques (*pmei4* et 35S:PMEI4::GFP) ou sauvages (*A. thaliana* Col), infestés (Inf) ou non par *M. persicae*

Les extraits enrichis en protéines pariétales sont obtenus avec un tampon contenant notamment **(a)** 1 M NaCl à pH 7, **(b)** 1 M LiCl à pH 5. Les barres pleines correspondent aux plants non infestés et celles avec des pointillés aux plants infestés. Barres noires, sauvages Col (Col) ; barres blanches, 35S:PMEI4::GFP (35S:PMEI4) ; barres grises, *pmei4* (pmei4). Les données représentent la moyenne ± SE d'au moins 3 répétitions biologiques (contenant 9 plants par répétition x 3 techniques, n). Les astérisques indiquent des différences significatives d'après le test de Mann-Whitney. P < 0,05 (*), P < 0,01 (**), P < 0,001 (***).

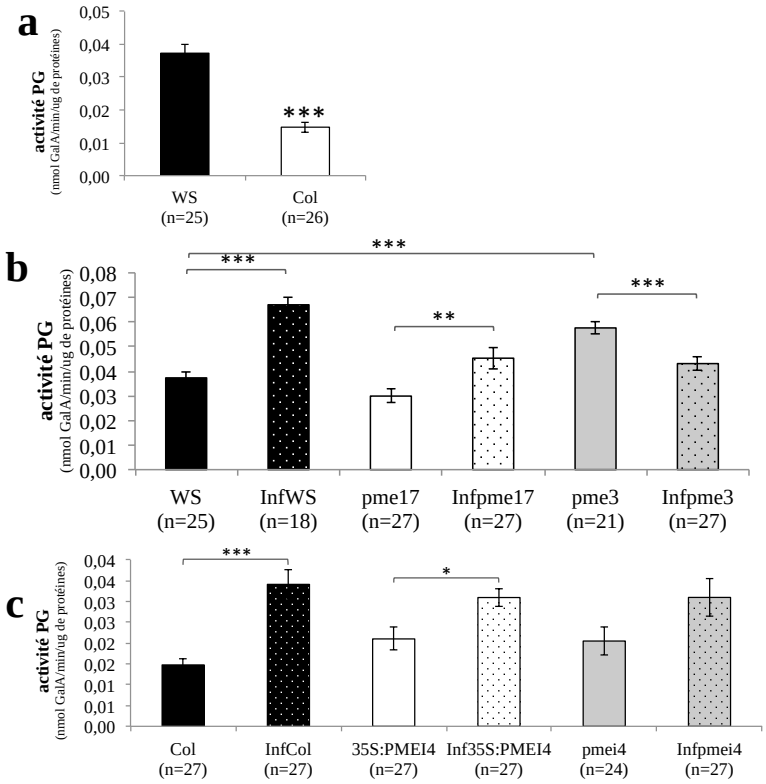


Figure 59 Activité PG totale des extraits de feuilles des plants d'*A. thaliana* transgéniques et sauvages (WS et Col), infestées (Inf) ou non par *M. persicae*

Les extraits enrichis en protéines pariétales sont obtenus avec un tampon contenant notamment 1 M LiCl à pH 5 chez les plants **(a)** WS-Col, **(b)** WS, *pme17*, *pme3* et **(c)** Col, *pmei4*, 35S:PMEI4::GFP. Chaque type de plant est représenté par une couleur, les barres pleines correspondent aux plants non infestés et celles avec des pointillés aux plants infestés. Les données représentent la moyenne ± SE d'au moins 3 répétitions biologiques (contenant 9 plants par répétition x 3 techniques, n). Les astérisques indiquent des différences significatives d'après le test de Mann-Whitney. P < 0,05 (*), P < 0,01 (**), P < 0,001 (***).

Cette activité PG augmente significativement (1,5 fois) chez les plants *pme17* infestés par rapport aux plants non infestés (**Figure 59b**). Cependant, les mutants *pme3* infestés montrent une baisse significative (1,3 fois) de l'activité PG par rapport aux plants *pme3* non infestés. Par ailleurs, l'activité PG augmente chez les plants *pmei4* et 35S:PMEI4::GFP (1,5 fois) mais de façon significative uniquement dans les plants surexpresseurs (**Figure 59c**).

L'ensemble des modifications observées au niveau des activités PME et PG au sein des extraits de parois de cellules foliaires des plants non infestés est résumé ci-dessous :

Activités enzymatiques	***pme3*** /WS	***pme17*** /WS	***pmei4*** /Col	**35S:PMEI4::35S** /Col	**Col** /WS
PME (NaCl, pH 7)	↘		↗	↗	↘
PME (LiCl, pH 5)	↘				
PG	↗	ns			↘

↗ ou ↘ : activité enzymatique respectivement plus importante ou plus faible chez les plants écrits en gras par rapport aux plants comparés. ns : variation non significative

L'ensemble des modifications observées au niveau des activités PME et PG au sein des extraits de parois de cellules foliaires des plants infestés est résumé ci-dessous :

Activités enzymatiques	**InfWS** /WS	**Inf*pme17*** */pme17*	**Inf*pme3*** */pme3*	**InfCol** /Col	**Inf*pmei4*** */pmei4*	**Inf35S:PMEI4::GFP** /35S:PMEI4::GFP
PME (NaCl, pH 7)	↘			↗	↗	↗
PME (LiCl, pH 5)				↗	↗	↗
PG	↗	↗	↘	↗	ns	↗

↗ ou ↘ : activité enzymatique respectivement plus importante ou plus faible chez les plants écrits en gras par rapport aux plants comparés. ns : variation non significative

La paroi et les HGME peuvent être impliqués dans la production d'éliciteurs endogènes de défense, notamment avec les OG produits par l'activité PG. L'expression de quelques gènes de défense d'*A. thaliana* a été étudié par qRT-PCR chez tous les plants transgéniques et sauvages.

3.2. Effets sur des gènes exprimés dans les feuilles

3.2.1. Expression ciblée mesurée par RT-PCR quantitative

Plusieurs gènes de défense connus dans la littérature comme étant impliqués dans les réponses à un stress aphidien ont été choisis. Parmi les gènes reliés à la voie de l'acide salicylique (SA), l'expression des gènes *Enhanced Disease Susceptibility1* (*EDS1*), *Phytoalexine deficient4* (*PAD4*), *Salicylic acid Induction Deficient2* (*SID2*) et *Pathogenesis Related protein* (*PR1*) a été mesurée par RT-PCR quantitative. Le gène *GSTU24* a été choisi car il code une enzyme de la famille des glutathion S-transférases dépendante de la voie du SA et impliquée dans la détoxification de composés toxiques d'origine endogène ou exogène. Concernant la voie de l'acide jasmonique (JA), ont été choisis pour la représenter : les gènes *Lipoxygenase2* (*LOX2*), *Oxophytodienoate Reductase1* (*OPR1*) et *Plant Defensine 1.2a* (*PDF1.2a*). En parallèle, les gènes d'intérêt codant des protéines pariétales (*PME17, PME3*) ainsi que *SBT3.5*, connu pour réguler les PME, ont été considérés.

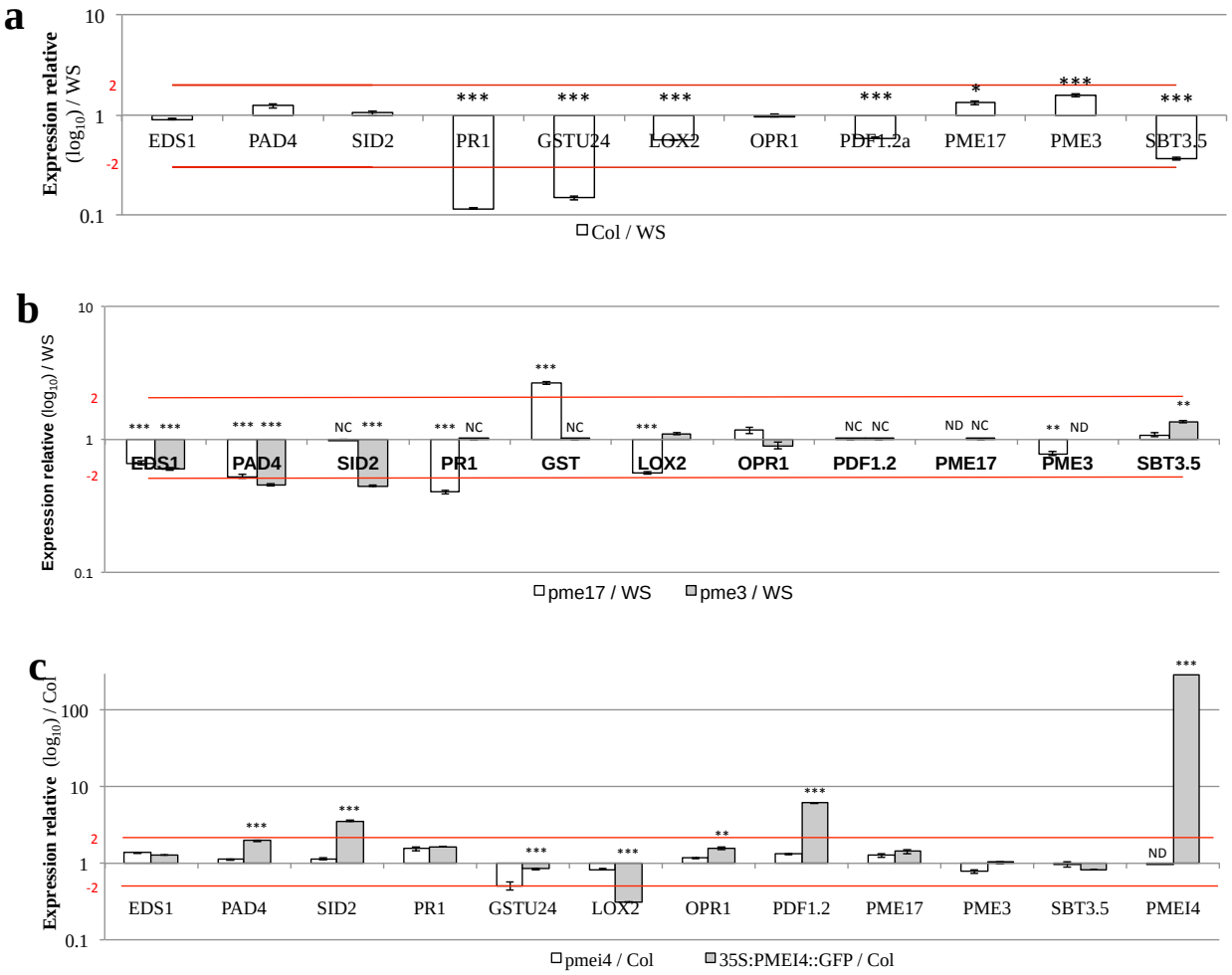


Figure 60 Comparaison d'expressions relatives de gènes de défense ou liés à la paroi dans des feuilles d'*A. thaliana* transgéniques et sauvages

(a) entre les plants sauvages Col et WS ; **(b)** entre les plants mutants *pme17*, *pme3* et le sauvage WS **(c)** entre les plants transgéniques *pmei4* et 35S:PMEI4:GFP et le sauvage Col. L'analyse des transcrits par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel quantitative (qRT-PCR) est effectuée sur des gènes codant des protéines pariétales (*PME17*, *PME3*, *SBT3*.5), des protéines impliquées dans les voies de l'acide salicylique (*EDS1*, *PAD4*, *SID2*, *PR1*, *GSTU24*) et de l'acide jasmonique (*LOX2*, *OPR1*, *PDF1.2*). Les valeurs d'expression sont normalisées en utilisant le gène de référence GAPC2. Les barres représentent les niveaux moyens d'expression ± SE de neuf plantes par modalité, avec trois répétitions biologiques et 2 répétitions techniques. Un test *t* de Student a été réalisé pour évaluer la significativité de la variation d'expression de par rapport aux plants sauvages correspondant à l'axe des ordonnées. Pour chaque gène, le ratio est considéré comme significatif par le test *t* de Student si $P < 0,05$ et si le facteur de variation est supérieur à 2 (pas de significativité entre les deux lignes rouges). $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) et $P < 0,001$ (***). NC, variations non-concordantes entre les trois répétitions biologiques effectuées. ND, expression non détectable.

Pour les analyses, l'expression de chaque gène a été comparée à celle du gène de référence GAPC2 (*GlycerAldehyde-3-Phosphate dehydrogenase C2*). Une variation est considérée comme significative si la p-value du test *t* de Student est inférieure à 0,05 et si le facteur de variation est supérieur à 2.

3.2.1.1. Au sein des feuilles des plants non infestés

Dans les feuilles de l'écotype Col, seuls les gènes *PR1* et *GSTU24* sont significativement sous-exprimés avec un facteur de variation supérieur à 2 (respectivement 8,6 et 6,7 fois) par rapport aux feuilles de l'écotype WS (**Figure 60a**). Les gènes *LOX2*, *PDF1.2a*, *PME17* et *PME3* et *SBT3.5* sont exprimés de façon significativement différente chez les deux plants sauvages mais avec un facteur de variation inférieur à 2 ce qui ne permet pas de les considérer comme marqueur de différenciation.

Les gènes de défense marqueurs de différence d'expression supérieure à 2 entre les plants *pme17*, *pme3* et la plante sauvage WS sont au nombre de 4 et sont reliés à la voie du SA (**Figure 60b**). Chez *pme17* les gènes *PAD4* et *PR1*, intervenant en début et fin de voie SA, sont sous-exprimés (2,0 et 2,5 fois) et le gène *GSTU24* est surexprimé (2,7 fois). Dans les feuilles de *pme3*, les gènes *SID2* et *PAD4*, intervenant en début de voie SA, sont sous-exprimés (respectivement 3,2 et 2,0 fois).
Pour les plants dont l'expression du gène *PMEI4* a été modifiée, seul le surexpresseur présente des différences significatives avec les plants Col. La surexpression du gène *PMEI4* bien effective (230 fois, **Figure 60c**) est associée à une surexpression des gènes *SID2* et *PDF1.2a* (respectivement 3,6 et 6,2 fois) tandis que le gène *LOX2* est sous-exprimé (3,2 fois). Ces deux derniers gènes sont liés à la voie du JA.

L'ensemble des modifications observées au niveau de l'expression des gènes cibles étudiés des plants non infestés est résumé ci-dessous :

Gènes	***pme3*** /WS	***pme17*** /WS	***pmei4*** /Col	**35S:PMEI4::35S** /Col	**Col** /WS
EDS1					
PAD4	↘	↘			
SID2	↘	nc		↗	
PR1		↘			↘
GSTU24		↗			↘
LOX2				↘	
OPR1					
PDF1.2a	nc	nc		↗	
PME17	nc	nd			
PME3	nd				
SBT3.5				↗	

↗ ou ↘ : différence d'expression de gène lors des comparaisons entre deux plants, le sens de la flèche considérant les expression écrites en gras par rapport aux plants comparés. nc, variation non concordante entre les répétitions biologiques effectuées. nd, expression non détectable.

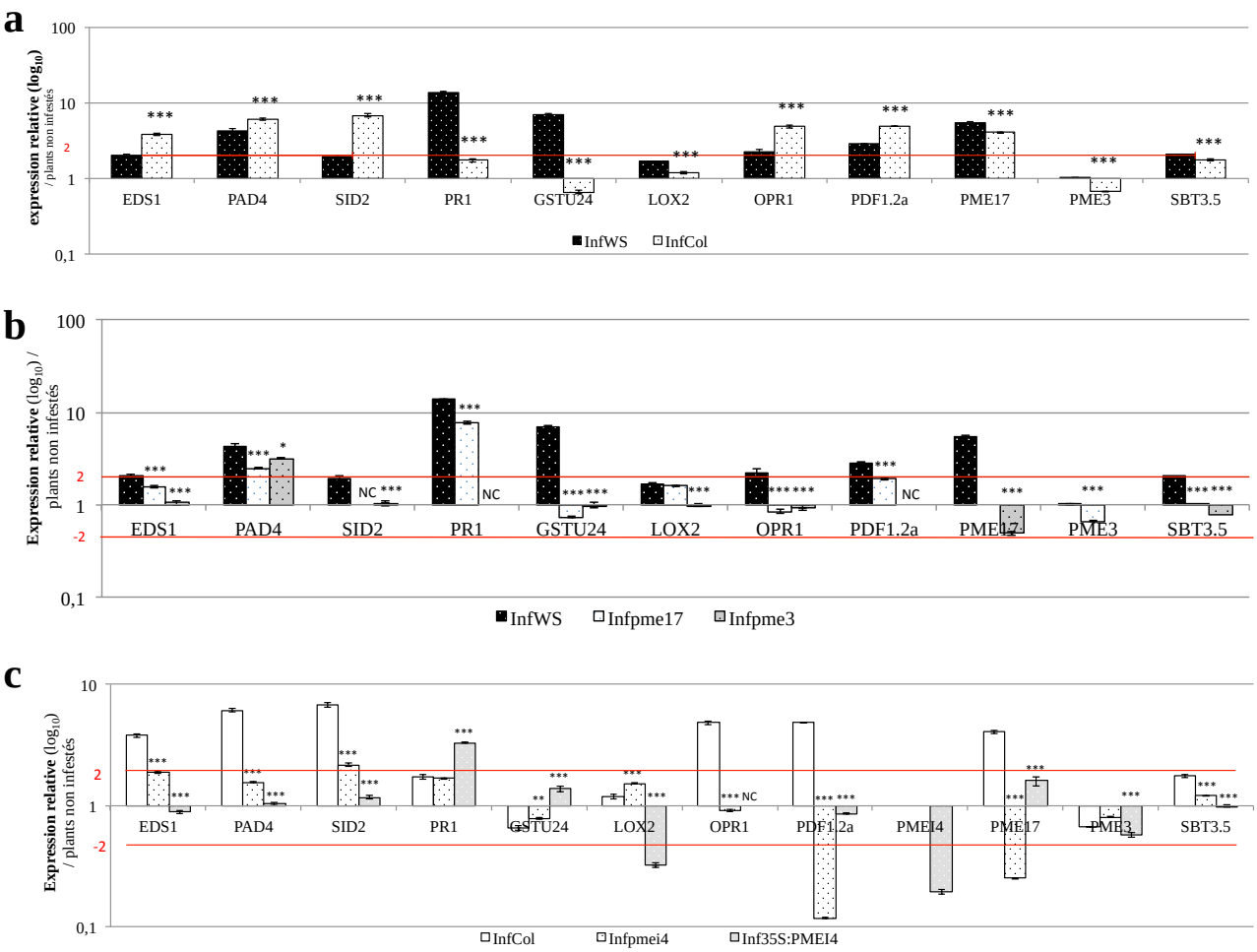


Figure 61 Comparaison d'expressions relatives de gènes de défense ou liés à la paroi dans des feuilles d'*A. thaliana* transgéniques et sauvages infestées (Inf) par *M. persicae* par rapport aux plants non infestés correspondants

(a) pour chaque plants Col et WS ; **(b)** pour les plants *pme17* et *pme3* ; **(c)** pour les plants *pmei4* et 35S:PMEI4::GFP. L'ensemble des infestation sont comparées deux à deux selon un test *t* de Student **(a)** entre les plans sauvages et **(b et c)** entre chaque plant transgénique et le sauvage. Pour chaque gène, le ratio est considéré comme significatif par le test *t* de Student si P < 0,05 et si le facteur de variation est supérieur à 2 (pas de significativité entre les deux lignes rouges). P < 0,05 (*), P < 0,01 (**) et P < 0,001 (***). L'analyse des transcrits par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel quantitative (qRT-PCR) est effectuée sur des gènes codant des protéines pariétales (*PME17*, *PME3*, *SBT3.5*), des protéines impliquées dans les voies de l'acide salicylique (*EDS1*, *PAD4*, *SID2*, *PR1*, *GSTU24*) et de l'acide jasmonique (*LOX2*, *OPR1*, *PDF1.2*). Les valeurs d'expression sont normalisées en utilisant le gène de référence *GAPC2*. Les barres représentent les niveaux moyens d'expression ± SE de neuf plantes par modalité, avec trois répétitions biologiques et deux répétitions techniques. NC, variations non-concordantes entre les trois répétitions biologiques effectuées. ND, expression non détectable.

3.2.1.2. Au sein des feuilles après une infestation par *M. persicae*

Parmi les gènes significativement induits suite à une infestation par 10 adultes *M. persicae*, une surexpression du gène *PME17* a été observée dans les feuilles des plants Col et WS, respectivement 4,0 et 5,5 fois (**Figure 61a**). L'expression de *PME3* n'est pas affectée. La SBT3.5 est en limite de significativité en étant surexprimé d'un facteur 2, chez WS uniquement. Les gènes reliés aux voies du SA et du JA sont induits chez les deux écotypes suite à l'infestation. Globalement *EDS1*, *PAD4*, *OPR1* et *PDF1.2a* sont surexprimés de façon plus importante chez Col que chez WS. *PR1* et *GSTU24* sont surexprimés de façon significative exclusivement chez WS. L'expression du gène *LOX2* ne varie pas significativement chez les deux écotypes.

Les mutants *pme17* présentent après infestation une induction significative uniquement des gènes *PAD4*, *PR1* et *PDF1.2a* (respectivement 2,5, 7,7 et 2,0 fois) (**Figure 61b**). Cette induction reste significativement inférieure comparée à celle obtenue chez WS. Il semble y avoir encore moins de gènes de défenses induits chez le mutant *pme3* infesté par rapport aux plants non-infestés, avec uniquement une surexpression du gène *PAD4*. Cependant, l'expression des gènes *PR1*, *PDF1.2a* et *SID2* n'a pas pu être correctement déterminée chez *pme3* car de trop grandes variations d'expression ont été mises en évidence entre les trois répétitions biologiques effectuées. Suite à l'infestation, les gènes de défense sont non significativement surexprimés chez *pmei4* comparés à un équivalent chez l'écotype sauvage Col (**Figure 61c**). Seul le gène *PDF1.2a* y est fortement sous-exprimé (8,5 fois) alors qu'il est surexprimé dans les feuilles sauvages infestées. Le gène *PR1* est surexprimé (3,3 fois) et le gène *LOX2* est sous-exprimé (3,1 fois) dans les plants 35S:PMEI4::GFP infestés. L'expression des gènes liés à la paroi n'est pas modifiée chez mes plantes *pme17* et *pme3* infestées exception faite des KO respectifs. Seul le gène *PME17* est sous-exprimé (4 fois) chez *pmei4* tandis qu'il est surexprimé (4 fois) chez le sauvage Col infesté. Par ailleurs, *PMEI4* est 5,5 fois sous-exprimé dans les plants 35S:PMEI4::GFP infestés.

L'ensemble des modifications observées au niveau de l'expression des gènes cibles étudiés des plants infestés par *M. persicae* est résumé ci-dessous :

Gènes	**InfWS** /WS	**Inf*pme17*** */pme17*	**Inf*pme3*** */pme3*	**InfCol** /Col	**Inf*pmei4*** */pmei4*	**Inf35S:PMEI4::GFP** /35S:PMEI4::GFP
EDS1	↗			↗	↗	
PAD4	↗	↗	↗	↗		
SID2	↗		nc	↗	↗	
PR1	↗	↗	nc			↗
GSTU24	↗					
LOX2						↘
OPR1	↗			↗		
PDF1.2a	↗	↗	nc	↗	↘	
PME17	↗			↗	↘	
PME3						
PMEI4	nd	nd	nd	nd		↘
SBT3.5	↗					

↗ ou ↘ : différence d'expression de gène lors des comparaisons entre deux plants, le sens de la flèche considérant les expression écrites en gras par rapport aux plants comparés. nc, variation non concordante entre les répétitions biologiques effectuées. nd, expression non détectable.

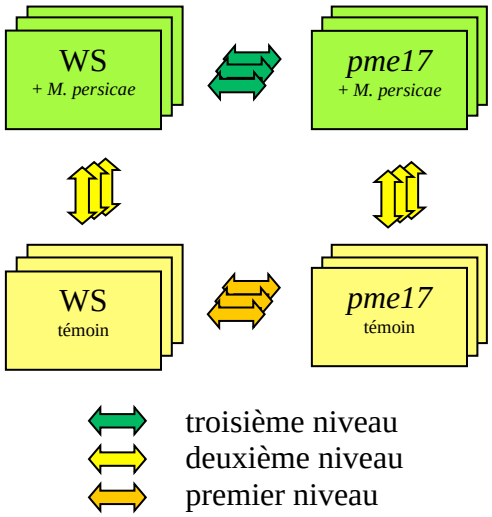


Figure 62 Niveaux de comparaisons à partir des puces à ADN pour appréhender **(i)** l'effet de la mutation (flèches oranges) en absence de stress **(ii)** l'effet d'un stress *M. persicae* sur une plante donnée (flèches jaunes) et **(iii)** l'effet de la mutation en présence du stress *M. persicae* (flèches vertes). Chaque carré représente une répétition biologique comprenant les plantes non infestées, témoins (jaune) ou les plantes infestées pendant 24 h par *Myzus persicae* (vert). Chaque flèche représente une comparaison directe entre deux sections des puces à ADN).

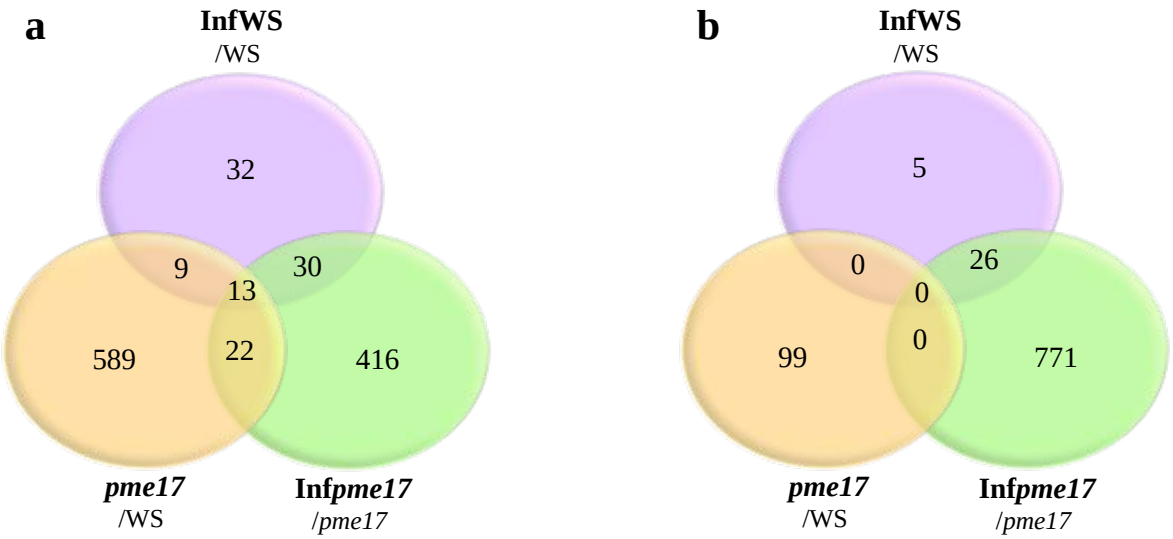


Figure 64 Diagrammes de Venn relatant le nombre de transcrits significativement régulés pour les deux premiers niveaux de comparaisons étudiés avec les puces à ADN

Nombre de transcrits **(a)** surexprimés et **(b)** sous-exprimés. Niveau 1 de comparaison : dans les feuilles du mutant *pme17* par rapport à WS (cercles oranges). Niveau 2 : dans les feuilles *pme17* (cercles verts) et WS (cercles violets) infestées pendant 24 h par *M. persicae*, par rapport aux feuilles témoins respectives non infestées. Un gène est significativement induit s'il présente un facteur de variation ≥ 2 et si la valeur *q* de l'ANOVA corrigée est ≤ 0,05.

3.2.2. Expression de gènes à l'échelle du transcriptome de la plante infestée ou non

Une analyse transcriptomique par puces à ADN a pu être effectuée sur des plants *pme17* et WS afin d'estimer l'importance de la PME17 dans la reprogrammation transcriptionnelle d'*A. thaliana* qui a lieu suite à une infestation aphidienne. Les plants ont été infestés pendant 24 h par 60 individus adultes *M. persicae* (au lieu de 10 individus lors des études des gènes ciblés par qRT-PCR), afin de pouvoir comparer avec une étude récente menée sur l'écotype Col et des mutants de la voie de la vitamine C qui utilise le même nombre de pucerons et la même durée d'infestation (Kerchev *et al.* 2013). Pour analyser le rôle de la PME17 dans l'interaction, les profils génomiques (génome entier) ont été comparés à trois niveaux (**Figure 62**).

Chaque niveau a été étudié grâce à une série d'hybridations sur puces à ADN en explorant les changements transcriptionnels intervenant dans les trois répétitions biologiques d'un niveau de comparaison. Pour le premier niveau, le but était d'identifier les différents gènes apparaissant dépendant de la PME17 pour leur expression de base, en comparant des profils de transcription des feuilles WS non infestées et des feuilles *pme17* non-infestées. Pour le deuxième niveau, les changements d'activité transcriptionnelle résultant de l'infestation de 24 h par 60 pucerons sur les feuilles WS et *pme17* ont été analysés. Pour le troisième niveau, une comparaison directe a été effectuée entre les changements transcriptionnels induits par les pucerons dans les feuilles *pme17* et ceux induits dans les feuilles WS. Les données générées par l'analyse des trois niveaux ont été analysées statistiquement. La vérification par qRT-PCR des gènes les plus induits n'a pas pu être réalisée dans les temps impartis mais sera indispensable pour valider ces données dans la littérature à venir. Au sein d'un niveau de comparaison, l'expression d'un gène a été considérée comme significativement induite si son facteur de variation était supérieur à 2 (valeurs linéaires) et si la q-value issue de la correction du FDR (*False Discovery Rate*) effectuée après une ANOVA était inférieure à 0,05.

Une **classification hiérarchique** des transcrits différemment surexprimés et sous-exprimés pour deux niveaux de comparaison de profils transcriptomiques a été réalisée afin de visualiser graphiquement les principales variations significatives (**Figure 63**). Concernant le premier niveau de comparaison, on peut remarquer que la plupart des 732 gènes montrant une expression différentielle sont sous-exprimés (86,5 %) chez le mutant *pme17* par rapport au sauvage WS. L'analyse du deuxième niveau montre que suite à l'infestation par *M. persicae*, la majorité des 115 transcrits des feuilles WS sont surexprimés (InfWS, 73 %). La majorité des 1278 transcrits chez les plants *pme17* sont sous-exprimés (Inf*pme17*, 62,4 %) suite à une infestation aphidienne.

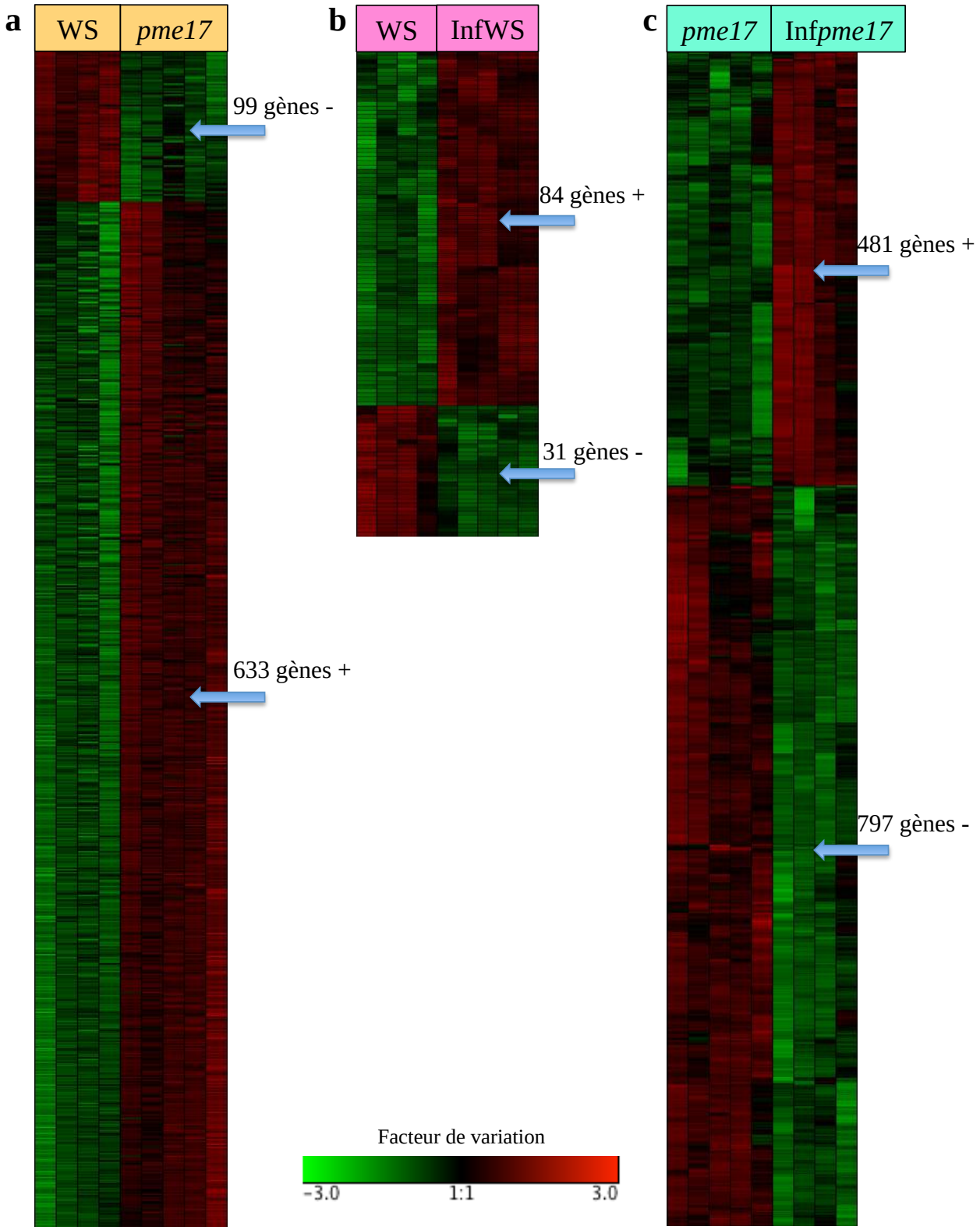


Figure 63 Classifications hiérarchiques des gènes significativement induits pour les deux premiers niveaux de comparaison de profils transcriptomiques

Le premier niveau de comparaison met en évidence les différences d'expression des gènes entre les profils transcriptionnels des plants mutants *pme17* et WS non infestés (WS/*pme17*, **a**). Le deuxième niveau consiste à appréhender les changements d'expression de gènes après une infestation par *M. persicae* chez WS (WS/InfWS, **b**) et chez *pme17* (*pme17*/Inf*pme17*, **c**). Chaque colonne représente une répétition parmi les 3 répétitions biologiques (6 plants x 4 feuilles par répétition) comportant chacune 2 répétitions techniques. Les classifications hiérarchiques ont été construites grâce au logiciel Genesis (version 1.7.6).

Selon le diagramme de Venn, parmi les 633 gènes dont les transcrits sont surexprimés par la mutation pme17, seulement 22 gènes sont aussi induits chez *pme17* infestés (**Figure 64 page précédente**). De plus, 56 gènes sont exprimés de façon différentielle suite à l'infestation dans les feuilles WS ou *pme17* infestées (30 surexprimés et 26 sous-exprimés). Ces gènes apparaissent comme marqueurs de l'infestation aphidienne et parmi eux 56 sont indépendants des effets de la mutation du gène *PME17*.

Afin de mieux comprendre les modifications engendrées par la mutation du gène *PME17* sur l'infestation, il est important de connaître dans un premier temps les variations constitutives (sans infestation), issues des analyses portées sur le premier niveau de comparaison.

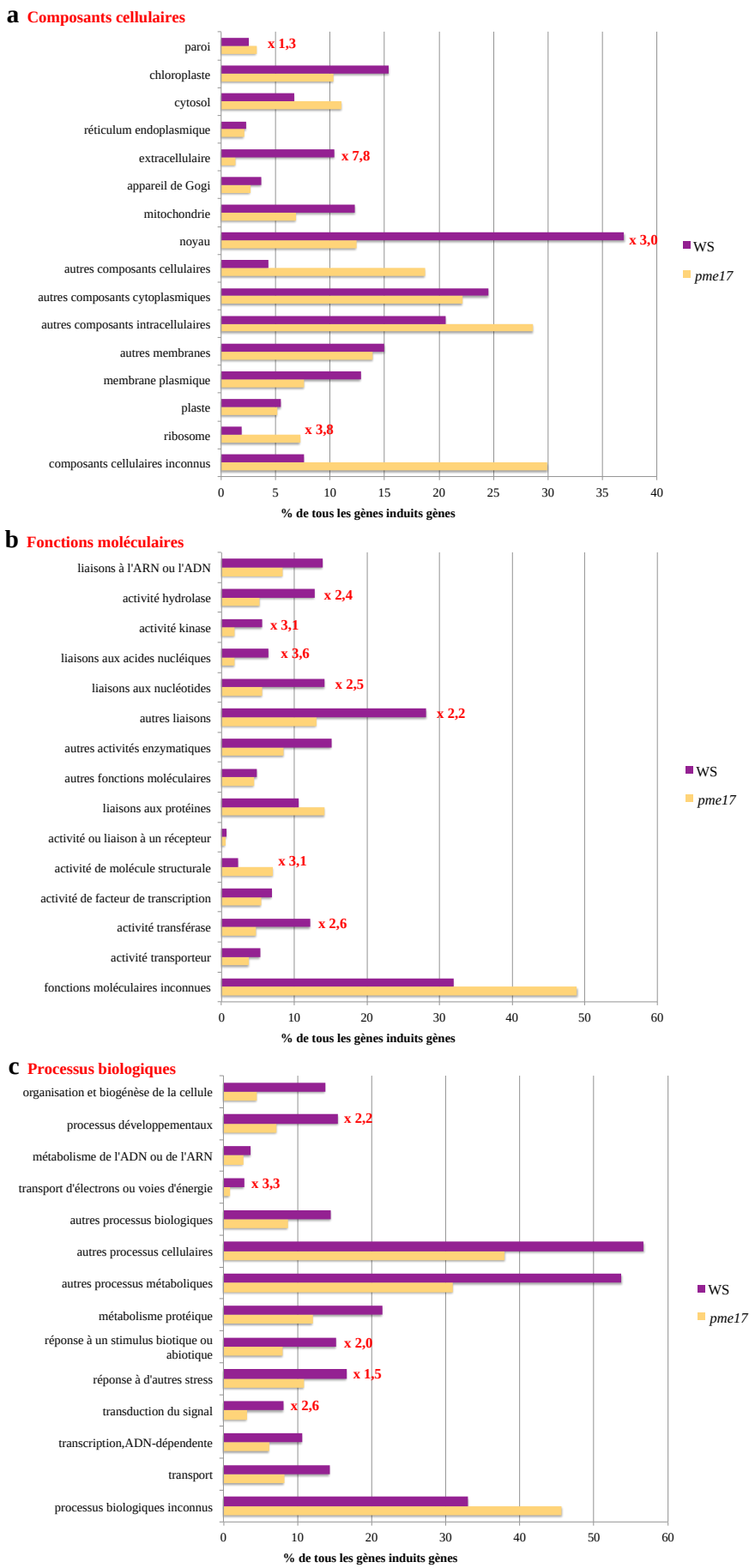


Figure 65 Vue globale des différences de gènes induits par la mutation du gène *PME17*, par comparaison des plants *pme17* et WS, en terme de catégories fonctionnelles

Les barres (violet, WS et orange, *pme17*) représentent la contribution (%) des gènes induits dans les différentes catégories d'annotation fonctionnelle : **(a)** composants cellulaires, **(b)** fonctions moléculaires et **(c)** processus biologiques. Les gènes sont significatifs s'ils présentent un facteur de variation > 2 et une q-value issue ANOVA corrigée < 0,05).

3.2.2.1. Effet de la mutation du gène *pme17* sur l'expression des gènes fonctionnels de la plante

Les 732 gènes induits chez le mutant *pme17* (par rapport au sauvage WS) ont été classés en **catégories fonctionnelles** (*Gene Ontology* GO) (Carbon *et al.* 2009). Trois grandes catégories sont définies : (i) les composants cellulaires où sont exprimés les gènes induits, (ii) les fonctions moléculaires de ces mêmes gènes, (iii) ainsi que les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués (**Figure 65**). L'implication des 719 gènes (607 annotations disponibles) dans les différentes catégories a été comparée avec l'implication de l'ensemble des gènes d'un plant d'*A. thaliana* sauvage (WS) disponible sur TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) (24200 annotations). Une implication a été considérée significative seulement s'il y avait un facteur de variation ≥ 2 entre les deux plants.

Parmi les 607 annotations de gènes disponibles en ligne, on peut noter tout d'abord que globalement, 2/3 des catégories fonctionnelles présentées dans la **Figure 65** montrent un pourcentage de gènes induits plus faible chez le mutant *pme17* par rapport à WS. Concernant la paroi, le pourcentage de gènes dont les produits sont localisés dans le composant cellulaire « paroi » ne varie pas entre les feuilles *pme17* et les feuilles WS (**Figure 65a**, catégorie *paroi*). Cependant, il y a chez *pme17* moins de gènes (7,8 fois) dont les produits sont localisés dans le milieu extracellulaire, c'est à dire non attachés à la membrane plasmique (**Figure 65a**, catégorie *extracellulaire*).

Par ailleurs, par rapport aux plants WS, le mutant *pme17* présente moins de gènes impliqués dans la réponse aux stress en dehors des stimuli biotique ou abiotique (2,0 fois, catégorie *Réponse à d'autres stress*) et dans la transduction du signal (régulant la transcription ou des processus métaboliques, 2,7 fois) (**Figure 65c**). De plus, parmi les gènes différemment induits suite à la mutation *PME17*, beaucoup codant un produit dans le noyau sont fortement sous-représentés par rapport aux plants WS (3,0 fois, Figure 73a), tout comme les nombres de gènes impliqués dans les fonctions de liaisons aux nucléotides ou aux acides nucléiques et dans l'activité transférase ou hydrolase (respectivement 2,2 ; 3,6 ; 2,4 et 2,6 fois, **Figure 65b**). La même variation est observée en ce qui concerne le nombre de gènes impliqués dans les processus développementaux et le métabolisme protéique (baisse respective 2,2 et 2,0 fois, **Figure 65c**). Enfin, le nombre de gènes dont le produit constitue les ribosomes est plus important (3,8 fois, **Figure 65a**) chez *pme17* que chez WS, tout comme le nombre de gènes possédant une activité de molécule structurale (intra- ou extracellulaire, 3,1 fois, **Figure 65b**).

Tableau 21 Liste des gènes reliés à la paroi végétale et présentant une induction significative dans les deux premiers niveaux de comparaison effectués lors de l'expérimentation sur puces à ADN

Liste des gènes surexprimés (rouge) ou sous-exprimés (bleu) dont l'expression varie significativement pour chaque comparaison, c'est à dire si le facteur de variation (Facteur) est ≥ 2 et la valeur *q* issue de l'ANOVA corrigée ≤ 0,05. Deux niveaux de comparaison sont présentés : chez le mutant *pme17* par rapport à l'écotype sauvage WS (*pme17*-WS) et chez les plants WS ou *pme17* infestés par *M. persicae* par rapport à leur plants non-infestés (InfWS-WS et Inf*pme17-pme17*).

Gènes impliqués dans la paroi			InfWS-WS	Inf*pme17-pme17*	*pme17*-WS
Catégories	**Gène**	**Nom**	**Facteur**	**Facteur**	**Facteur**
Modification du réseau pectique	*AT5G47500*	PECTINE METHYLESTERASE 5 (PME5)		-2,2	
	AT3G17220	INHIBITEUR DE PECTINE METHYLESTERASE 2 (PMEI2)		-2,5	
	AT3G17130	INHIBITEUR DE PECTINE METHYLESTERASE		-2,2	
	AT2G47670	PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR (PMEI6)		-2,5	2,5
	AT5G23870	PECTINE ACETYLESTERASE		-2,3	
	AT5G26670	PECTINE ACETYLESTERASE		-4,6	
	AT3G09405	PECTINE ACETYLESTERASE		2,0	
	AT3G06550	REDUCED WALL ACETYLATION 2 (RWA2)		-2,8	
	AT2G34410	REDUCED WALL ACETYLATION 3 (RWA3)		-2,4	
	AT1G67750	PECTATE LYASE	-2,7	-3,7	
	AT3G55140	PECTATE LYASE			2,5
	AT3G53190	PECTATE LYASE		-3,3	
	AT3G24230	PECTATE LYASE		-2,1	
	AT4G24670	PECTATE LYASE		-2,8	
	AT1G48100	POLYGALACTURONASE		-3,1	
	AT2G43870	POLYGALACTURONASE		-2,4	
	AT1G10640	POLYGALACTURONASE		-2,8	
	AT3G15720	POLYGALACTURONASE		-3,1	
	AT5G06860	PROTEINE INHIBITRICE DE POLYGALACTURONASE 1 (PGIP1)			2,1
	AT5G08370	ALPHA-GALACTOSIDASE 2 (AGAL2)			2,2
	AT4G36360	BETA-GALACTOSIDASE 3 (BGAL3)		-2,6	
	AT1G77410	BETA-GALACTOSIDASE 16 (BGAL16)		-2,2	
Protéines de structure	*AT5G55730*	PROTEINE FASCICLINE-LIKE ARABINOGALACTANE 1 (FLA1)	-2,5	-4,9	
	AT4G31370	PROTEINE FASCICLINE-LIKE ARABINOGALACTANE 5 (FLA5)		2,1	
	AT2G04780	PROTEINE FASCICLINE-LIKE ARABINOGALACTANE 7 (FLA7)		-2,2	
	AT2G45470	PROTEINE FASCICLINE-LIKE ARABINOGALACTANE 8 (FLA8)		-2,0	
	AT2G35860	PROTEINE FASCICLINE-LIKE ARABINOGALACTANE 16 (FLA16)		-2,5	
	AT3G54590	GLYCOPROTEINE RICHE EN HYDROXYPROLINE (HRGP1)		2,7	
	AT2G27380	EXTENSINE RICHE EN PROLINE 1 (EPR1)		2,5	-2,2
	AT2G24980	EXTENSINE 6 (EXT6)		2,0	
	AT5G06640	EXTENSINE 10 (EXT10)		2,3	-2,0
	AT5G49080	EXTENSINE 11 (EXT11)			-3,3
	AT4G13390	EXTENSINE 12 (EXT12)		2,2	
	AT5G35190	EXTENSINE 13 (EXT13)		2,1	-2,0
Protéines de structure et de signalisation	*AT1G35230*	ARABINOGALACTANE PROTEINE 5 (AGP5)		2,0	
	AT2G14890	ARABINOGALACTANE PROTEINE 9 (AGP9)		-2,0	
	AT5G56540	ARABINOGALACTANE PROTEINE 14 (AGP14)		-2,0	2,5
	AT4G37450	ARABINOGALACTANE PROTEINE 18 (AGP18)		-2,1	
	AT2G47930	ARABINOGALACTANE PROTEINE 26 (AGP26)		-2,1	
	AT3G20865	ARABINOGALACTANE PROTEINE 40 (AGP40)		-2,0	2,7
	AT5G24105	ARABINOGALACTANE PROTEINE 41 (AGP41)		-2,4	2,5
Modification des hémicelluloses	*AT2G37640*	EXPANSINE A3 (EXPA3)		-3,0	
	AT5G02260	EXPANSINE A9 (EXPA9)		2,2	
	AT1G26770	EXPANSINE A10 (EXPA10)		-2,1	
	AT5G56320	EXPANSINE A14 (EXPA14)	5,4	2,4	
	AT2G03090	EXPANSINE A15 (EXPA15)	-2,1	-3,1	
	AT4G28250	EXPANSINE B13 (EXPB13)		-2,9	
	AT5G09730	BETA-XYLOSIDASE 3 (BXL3)		-2,7	
	AT1G11545	XYLOGLUCANE ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 8 (XTH8)		-2,5	
	AT2G14620	XYLOGLUCANE ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 10 (XTH10)			2,2
	AT2G36870	XYLOGLUCANE ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 32		-4,8	
Modification de la cellulose	*AT1G45191*	BETA GLUCOSIDASE 1 (BGLU1)		-2,3	
	AT5G24540	BETA GLUCOSIDASE 31 (BGLU31)		2,4	
	AT5G36890	BETA GLUCOSIDASE 42 (BGLU42)		-2,3	
	AT1G61810	BETA-GLUCOSIDASE 45 (BGLU45)			2,0

Les gènes nous intéressant plus particulièrement parmi ceux significativement régulés par la PME17 sont les gènes codant des protéines pariétales et ceux codant des protéines intervenant dans la défense. La majorité des gènes induits codant des produits présents dans la paroi végétale sont surexprimés par rapport au sauvage WS (**Tableau 21**, colonne de droite «*pme17* / WS »), sauf quatre gènes codant des extensines qui sont sous-exprimés (*EXT10*, *EXT11*, *EXT13* et *Extensin-proline-rich EPR1*). Parmi les gènes surexprimés, on retrouve notamment quelques gènes codant des protéines interagissant avec le réseau pectique, comme le *PMEI6* (*At2g47670*), une *PL* (*At3g55140*), le *PGIP1* (*At5g06860*) ou l'alpha-galactosidase 2 (*AGAL2*, *At5g08370*). On retrouve aussi une surexpression des gènes codant des protéines de structure (trois protéines à arabinogalactanes : *AGP14*, *AGP40* et *AGP41*) ou modifiant la cellulose (beta-glucosidase 45 *BGLU45*) ou les hémicelluloses (xyloglucane endotransglycosidase hydrolase 10 *XTH10*).

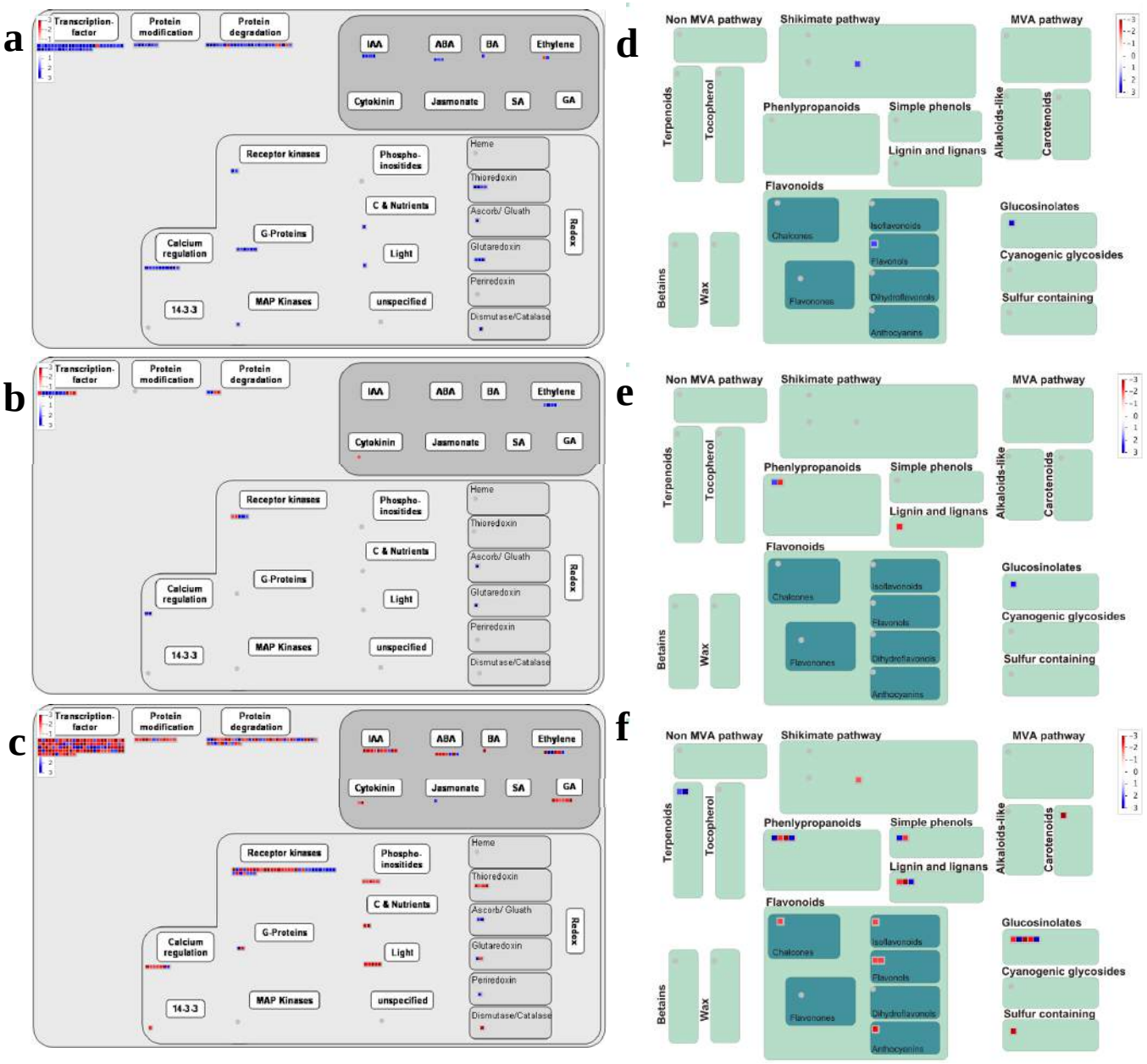


Figure 66 Vue d'ensemble des gènes intervenant dans les processus généraux de régulation dans les feuilles d'*A. thaliana* (a, b et c) et dans la production de métabolites secondaires (d, e et f)

Les carrés représentent les valeurs d'expression des différents gènes significativement induits dans **(a et d)** la première comparaison effectuée représentant l'effet de la mutation du gène *PME17* et l'effet de l'infestation par *M. persicae* sur les plants **(b et e)** WS et **(c et f)** *pme17*. Les gènes en rouge sont surexprimés et ceux en bleu sont sous-exprimés. Représentations obtenues avec le logiciel MapMan (version 3.5).

D'autres analyses réalisées avec le logiciel MapMan (version 3.5) donnent des informations complémentaires sur les gènes des différentes listes. La mutation du gène PME17 engendre une augmentation du nombre de gènes codant des facteurs de transcription et intervenant dans la dégradation des protéines (**Figure 66a**). Elle induit aussi un gène de la voie des flavonoïdes et un gène de la voie des glucosinolates (**Figure 66d**).

Tableau 22 Liste des gènes reliés à la défense de la plante et présentant une induction significative dans les deux premiers niveaux de comparaison effectués lors de l'expérimentation sur puces à ADN

Liste des gènes surexprimés (rouge) ou sous-exprimés (bleu) dont l'expression varie significativement pour chaque comparaison, c'est à dire si le facteur de variation (Facteur) est ≥ 2 et la valeur *q* issue de l'ANOVA corrigée ≤ 0,05. Deux niveaux de comparaison sont présentés : *pme17* par rapport à l'écotype sauvage WS (*pme17*-WS) et chez les plants WS ou *pme17* infestés par *M. persicae* par rapport à leur plants non-infestés (InfWS-WS et Inf*pme17-pme17*).

Gènes impliqués dans les réactions de défense			InfWS-WS	Inf*pme17-pme17*	*pme17*-WS
Catégories	**Gène**	**Nom**	**Facteur**	**Facteur**	**Facteur**
Signalisation	*AT4G14640*	CALMODULINE 8 (CAM8)			2,6
	AT3G22930	CALMODULINE-LIKE 11 (CML11)			3,1
	AT1G66400	CALMODULINE LIKE 23 (CML23)			2,2
	AT1G76650	CALMODULINE-LIKE 38 (CML38)			2,6
	AT3G50770	CALMODULINE-LIKE 41 (CML41)			2,2
	AT4G20780	CALMODULINE LIKE 42 (CML42)			2,1
	AT5G67280	RECEPTOR-LIKE KINASE (RLK)		-2,0	
	AT4G26070	MAP KINASE/ ERK KINASE 1 (MEK1)			2,2
Facteurs de transcription	*AT5G51190*	ERF	2,2		
	AT4G17500	ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 1 (ERF1)	2,0		
	AT4G17490	ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 6 (ERF6)		3,2	
	AT2G44840	ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 13 (ERF13)	4,0		
	AT1G28370	ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 11 (ERF11)	2,5	2,3	
	AT2G35700	ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 38 (ERF38)		-3,9	
	AT1G04310	ETHYLENE RESPONSE SENSOR 2 (ERS2)		-2,4	
	AT4G23810	WRKY 53 (WRKY53)	2,2		
	AT5G24110	WRKY 30 (WRKY30)	2,3	2,7	
	AT5G22570	WRKY 38 (WRKY38)		2,2	3,3
	AT1G80840	WRKY 40 (WRKY40)	3,9	2,1	
	AT5G64810	WRKY 51 (WRKY51)		2,5	
	AT2G40740	WRKY 55 (WRKY55)		2,0	
	AT5G01900	WRKY 62 (WRKY62)		4,6	
	AT5G13080	WRKY 75 (WRKY75)			3,2
	AT3G23250	PROTEINE A DOMAINE MYB 15 (MYB15)	3,9	4,6	
	AT5G60890	PROTEINE A DOMAINE MYB 34 (MYB34)		-2,4	2,7
	AT1G08810	PROTEINE A DOMAINE MYB 60 (MYB60)			3,5
	AT5G40330	PROTEINE A DOMAINE MYB 23 (MYB23)		-2,1	
	AT3G13890	PROTEINE A DOMAINE MYB 26 (MYB26)		2,2	
	AT5G07690	PROTEINE A DOMAINE MYB 29 (MYB29)		-3,3	
	AT5G11510	PROTEINE A DOMAINE MYB 3R-4 (MYB3R-4)		-2,1	
	AT5G16600	PROTEINE A DOMAINE MYB 43 (MYB43)		-2,9	
	AT4G01680	PROTEINE A DOMAINE MYB 55 (MYB55)		-3,6	
	AT4G21440	MYB-LIKE 102 (MYB102)		-2,0	
Mécanismes d'oxydo-réduction	*AT1G02930*	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 6 (GSTF6)	2,1		
	AT1G69930	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 11 (GSTU11)	2,1		
	AT2G29470	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 3 (GSTU3)			2,2
	AT2G29460	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 4 (GSTU4)			2,1
	AT5G62480	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 9 (GSTU9)		4,5	2,3
	AT1G78320	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 23 (GSTU23)		-2,5	
	AT1G53680	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 28 (GSTU28)		-2,4	
	AT3G03190	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE F11 (GSTF11)		-3,3	
	AT2G02930	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE F3 (GSTF3)		2,4	
	AT5G40150	PEROXYDASE 63		-2,4	
	AT4G11290	PEROXYDASE 39		-2,1	
	AT3G49110	PEROXYDASE 33		2,8	
	AT5G19880	PEROXYDASE 58		2,8	
	AT4G08770	PEROXYDASE 37		3,6	
Voie de l'acide salicylique	*AT5G36910*	THIONINE 2.2 (THI2.2) (PR13)		-2,2	2,1
	AT1G18870	ISOCHORISMATE SYNTHASE 2 (ICS2)		-2,4	
	AT1G75030	PROTEINE THAUMATINE-LIKE 3 (TLP-3) (PR5)		-3,1	
Voie de l'acide jasmonique	*AT1G75830*	PLANT DEFENSIN 1.1 (PDF1.1)		2,1	
	AT2G26020	PLANT DEFENSIN 1.2B (PDF1.2b)		2,1	
	AT2G26010	PLANT DEFENSIN 1.3 (PDF1.3)		3,0	
	AT1G17380	PROTEINE A DOMAINE JASMONATE-ZIM 5 (JAZ5)	2,4	2,2	
	AT1G19180	PROTEINE A DOMAINE JASMONATE-ZIM 1 (JAZ1)	2,6		
Protéines de défense	*AT3G16530*	PROTEINE DE TYPE LECTINE	3,2		
	AT5G18470	PROTEINE DE TYPE LECTINE SIMILAIRE A UNE CURCULINE	2,0		
	AT2G30770	CYTOCHROME P450, FAMILLE 71, SOUS-FAMILLE A, POLYPEPTIDE 13 (CYP71A13)	2,2	2,0	
	AT2G30750	CYTOCHROME P450, FAMILLE 71, SOUS-FAMILLE A, POLYPEPTIDE 12 (CYP71A12)		2,1	
	AT5G57220	CYTOCHROME P450, FAMILLE 81, SOUS-FAMILLE F, POLYPEPTIDE 2 (CYP81F2)	2,4	3,0	
	AT1G56240	PROTEINE PHLOEMIENNE 2-B13 (PP2-B13)	3,0		
	AT1G56250	PROTEINE PHLOEMIENNE 2-B14 (PP2-B14)	2,2		

De façon plutôt inattendue, l'absence de la PME17 affecte aussi certains gènes intervenant dans la défense (**Tableau 22**, colonne de droite « *pme17* / WS »). Ces gènes sont tous surexprimés chez le mutant *pme17* par rapport au sauvage WS. Ceux-ci correspondent à des gènes codant des protéines impliquées dans la signalisation des défense faisant intervenir le calcium comme la calmoduline 8 (*CAM8*) et cinq gènes codant des protéines similaires à la calmoduline (*Calmodulin-like CML11*, *CML23*, *CML38*, *CML41* et *CML42*). Des gènes codant des facteurs de transcription nucléaires sont aussi spécifiquement surexprimés chez *pme17*, comme les facteurs MYB (*MYéloBlastose aviaire*) *MYB34* et *MYB60* et le facteur *WRKY75*. Enfin, notons que trois gènes codant des glutathion-S-transférases intervenant dans les mécanismes d'oxydo-réduction sont aussi surexprimées (*GSTU3*, *GSTU4* et *GSTU9*), ainsi qu'un gène codant la thionine 1.2 (*THI1.2*), correspondant à la protéine PR13 (*Pathogenesis related*) régulée par la voie de l'acide salicylique.

Après avoir identifié les gènes régulés par la PME17 (premier niveau de comparaison), il est désormais nécessaire d'identifier les variations d'expression de gènes se produisant suite à une l'infestation par *M. persicae* chez le sauvage WS puis chez le mutant *pme17* (deuxième niveau de comparaison). Ceci nous permettra ensuite de caractériser le rôle de la PME17 dans l'infestation (troisième niveau).

3.2.2.2. Effet de l'infestation par *M. persicae* sur l'expression des gènes fonctionnels des plants sauvages et *pme17*

Les gènes induits chez les plants WS et *pme17* après infestation ont été comparés en terme de **catégories fonctionnelles** (GO, Carbon *et al.* 2009). L'implication dans chaque catégorie fonctionnelle des 102 gènes induits par l'infestation chez WS (dont 92 annotations disponibles) a été comparée à l'implication des 1265 gènes induits chez *pme17* par l'infestation (dont 955 annotations disponibles). Globalement, on peut noter que la moitié des catégories fonctionnelles présentées dans la **Figure 67** montre un pourcentage de gènes induits après l'infestation plus faible chez *pme17* par rapport à WS. Même si de façon générale le nombre de gènes impliqués dans l'organisation et la biogénèse de la paroi ou codant une molécule présente dans la paroi ou le milieu extracellulaire, ne semble pas différent entre *pme17* et WS (< 2,0 fois, **Figure 67a** et **c**), les activités de molécules structurales sont davantage représentées chez *pme17* (2,3 fois plus de gènes induits). Par ailleurs, de façon surprenante, les feuilles des plants mutants *pme17* présentent 2,6 fois moins de gènes impliqués dans la réponse à un stimulus biotique ou abiotique (**Figure 67c**). De plus, les mutants *pme17* présentent moins de gènes dont le produit se lie aux acides nucléiques (**Figure 67b**) ou participant au métabolisme de l'ARN ou de l'ADN (**Figure 67c**). Cependant, plus de gènes sont impliqués dans le transport (2,7 fois, **Figure 67c**) et plus de gènes codant des protéines dans les plastes (3,2 fois, **Figure 67a**).

L'infestation aphidienne entraîne au niveau des feuilles des plants sauvages WS une augmentation du nombre de gènes codant des facteurs de trasncription, des récepteurs kinases ainsi que des produits intervenant dans la dégradation des protéines (**Figure 66b**).

La liste des 115 gènes induits chez les feuilles WS infestées pendant 24 h avec 60 pucerons par rapport aux feuilles non-infestées (témoins) nous montre que, dans nos conditions expérimentales, l'infestation aphidienne n'engendre que quelques variations de l'expression de gènes codant des protéines pariétales (**Tableau 21**, colonne « InfWS-WS »). En effet, quatre

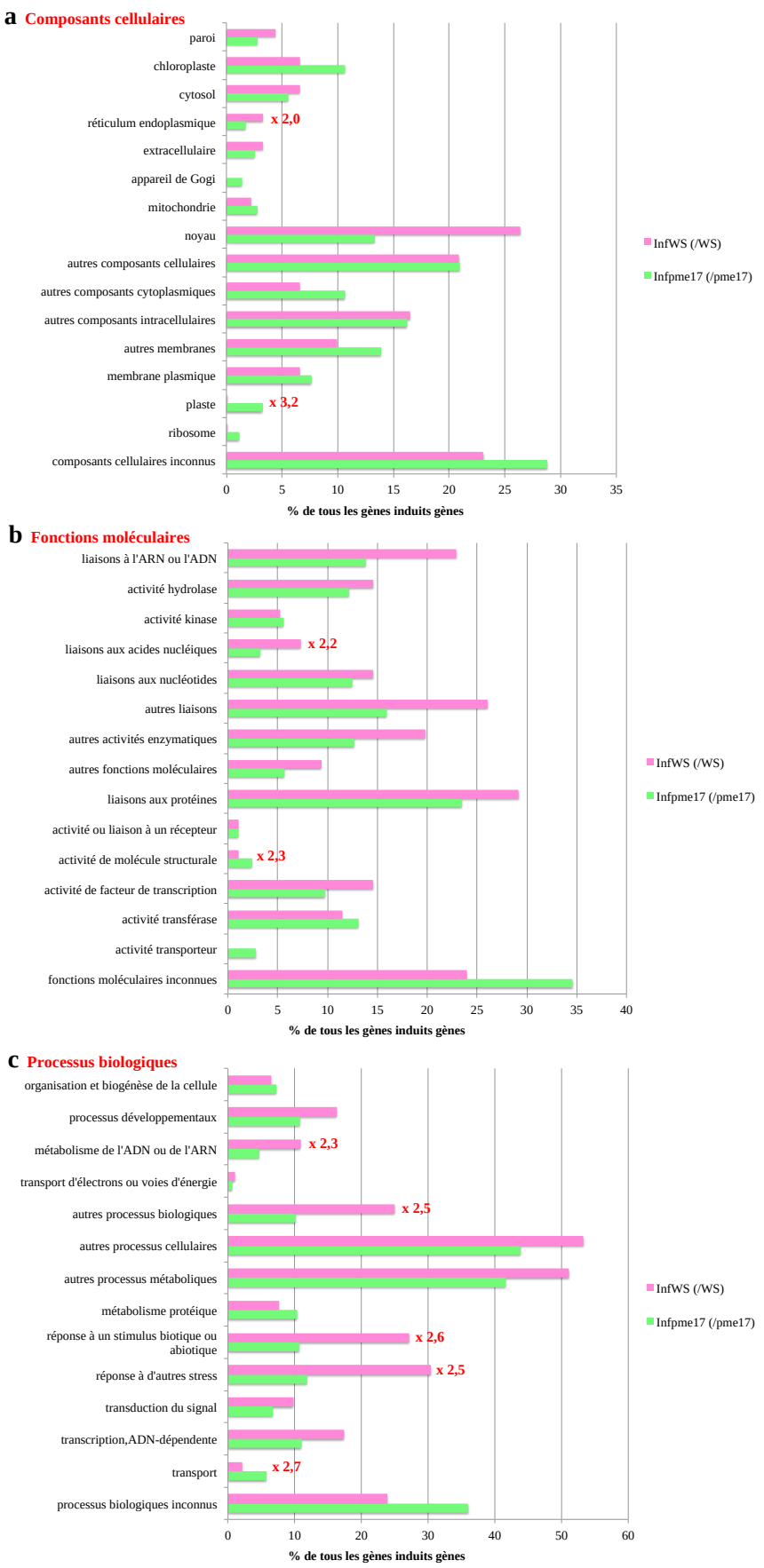


Figure 67 Vue globale des différences de gènes induits dans les plants WS et *pme17* infestés par *M. persicae*, en terme de catégories fonctionnelles

Les barres représentent la contribution des gènes significativement induits (%) par l'infestation aphidienne chez WS (InfWS, vert) et chez le mutant *pme17* (Inf*pme17*, violet) dans les différentes catégories d'annotation fonctionnelle (GO) : (a) composants cellulaires, (b) fonctions moléculaires et (c) processus biologiques. Les gènes sont significatifs s'ils présentent un facteur de variation >2 et une q-value issue ANOVA corrigée <0,05).

gènes sont sous-exprimés significativement : une *PL* (*At1g67750*), une protéine de structure (Fasciclin-*like* arabinogalactane 1, *FLA1*) et deux protéines modifiant le réseau cellulosique (expansines *EXPA14* et *EXPA15*). En ce qui concerne les gènes intervenant dans les défenses mises en place suite à l'infestation (**Tableau 22**, colonne « InfWS-WS »), on peut noter l'activation de nombreux gènes codant des facteurs de transcription, comme les facteurs ERF (*Ethylene responsive element binding factor) ERF1*, *ERF11* et *ERF13*, les facteurs *WRKY30*, *WRKY40* et *WRKY53* et le facteur *MYB15*. De plus, deux gènes codant des GST (*GSTF6* et *GFTU11*) sont aussi surexprimés dans les feuilles WS infestées. Enfin, de nombreux gènes codant des protéines intervenant dans les réponses de défense sont surexprimés, notamment deux lectines (*At3g16530* et *At5g18470*), trois gènes codant des cytochromes P450 intervenant dans la production de la camalexine (*CYP71A12* et *CYP71A13*) ou de glucosinolates (*CYP81F2*) et deux gènes codant des protéines phloémiennes (*PP2-B13* et *PP2-B14*).

Sur les plants *pme17*, l'infestation amplifie considérablement le nombre de gènes codant pour les facteurs de transcription, les récepteurs kinases et les produits intervenant dans la dégradations des protéines (**Figure 66c**). Il en est de même en ce qui concerne les gènes codant des produits intervenant dans la voie des phénylpropanoïdes, des lignines/lignanes, des flavonoïdes et des glucosinolates (**Figure 66e** et **f**).
Parmi les 1278 gènes induits chez les plants mutants *pme17* infestés pendant 24 h avec 60 pucerons par rapport aux plants *pme17* non-infestés (témoins), de nombreuses variations d'expression de gènes codant des protéines pariétales ou intervenant dans la défense de la plante ont lieu, une grande majorité étant sous-exprimés (**Tableaux 21 et 22**, colonnes « Inf*pme17-pme17* »). Concernant la paroi, d'importantes modifications significatives des transcrits de gènes intervenant dans la modification du réseau pectique ont lieu, plus particulièrement dans la modification du degré de méthylestérification et d'acétylation des HG, avec la sous-expression des gènes codant une PME (*PME5*), trois PMEI (*PMEI2*, *PMEI6* et *At3g17130*), trois PAE (*At5g23870*, *At5g26670*, *At3g09405*) et deux gènes réduisant l'acétylation de la paroi et des HG (*Reduced wall acetylation*, *RWA2* et *RWA3*). Des gènes codant pour des protéines de dégradation des HG sont aussi sous-exprimés : quatre PLs (*At1g67750*, *At3g53190*, *At3g24230* et *At4g24670*) et quatre PG (*At1g48100*, *Atég43870*, *At1g10640* et *At3g15720*). Le gène codant une subtilase (*SBT1*.3) est aussi sous-exprimé après infestation chez *pme17*. Par ailleurs, de nombreux gènes codant des protéines de structure sont sous-exprimés (*AGP9*, *AGP14*, *AGP18*, *AGP26*, *AGP40*, *AGP41*, *FLA1*, *FLA7*, *FLA8*, *FLA16*), ainsi que certaines enzymes modifiant la cellulose (*BGLU1*, *BGLU42*) et les hémicelluloses (*XTH8*, *XTH32*, β-xylosidase *BXL3*). A l'inverse de ce qui a été observé précédemment au premier niveau de comparaison (*pme17*-WS), tous les gènes codant des extensines induits sont surexprimés suite à l'infestation aphidienne (*EXT6*, *EXT10*, *EXT12*, *EXT13* et *EPR1*).

Certains gènes codant des protéines pariétales ou de défense semblent être des marqueurs de l'infestation aphidienne et leur expression ne semble pas être influencée par la *PME17* puisqu'aussi bien chez le mutant *pme17* que chez le sauvage WS, ces gènes gardent un niveau d'expression allant dans le même sens. C'est notamment le cas des gènes codant la PL *At1g67750*, la *FLA1*, les expansines *EXP14* et *EXP15*, les facteurs de transcription *ERF11*, *WRKY30*, *WRKY40* et *MYB15*, la protéine *JAZ1* (impliquée dans la voie du JA) et les cytochromes *CYPA13* (camalexine) et *CYP81F2* (glucosinolates). Afin de caractériser le rôle de la PME17 dans l'infestation aphidienne, le troisième niveau de comparaison nous a permis d'identifier des différences de réponse à l'infestation entre WS et *pme17*.

Chapitre 4. Discussion

Les interactions plantes-pucerons ont été largement étudiées et ont montré l'importance de nombreux mécanismes de résistance constitutive ou induite développés par la plante (Louis *et al*. 2012 ; Smith & Clement 2012). Cependant, le rôle de la paroi dans l'établissement de ces mécanismes de défense n'a été que très peu étudié. Il a été démontré par exemple que deux gènes modifient la résistance d'*A. thaliana* au puceron du pêcher *M. persicae*, les gènes *XTH33*, codant une xyloglucane transglycosidase hydrolase modifiant les hémicelluloses et *CEV1*, impliqué dans la synthèse des fibrilles de cellulose (Ellis *et al.* 2002b ; Divol *et al.* 2007). En ce qui concerne les pectines, seule une étude a identifié une modification de la résistance du sorgho (*Sorghum bicolor*) aux pucerons (*Schizaphis graminum*) faisant intervenir le degré de méthylestérification (DM) des pectines (Dreyer & Campbell 1984). Notre étude permet d'en savoir plus quant à une éventuelle implication du DM dans la résistance d'*A. thaliana* au puceron *M. persicae*, par son contrôle direct *via* les PME et indirect *via* les PMEI.

Dans un premier temps, les modifications engendrées au niveau des feuilles par les mutations *PME17*, *PME3* ou *PMEI4* et la surexpression de *PMEI4* vont être mises en évidence (comparaison des plants transgéniques à leur plant sauvage respectif). Ces modifications concernent particulièrement l'activité PME et la présence de groupement esters au niveau des HG mais aussi plus largement la structure des pectines voire même l'expression de gènes codant d'autres composés pariétaux ou des gènes défense de la plante. Dans un deuxième temps, il sera démontré que ces différences constitutives apparaissant au niveau des plants transgéniques peuvent contribuer à des modifications du comportement du puceron *M. persicae*, notamment de son comportement trophique, estimées grâce à la technique de l'EPG. En effet, les pucerons s'alimentant sur les plants *pme3*, *pme17*, *pmei4* ou 35S:PMEI4:GFP présentent des différences avec ceux s'alimentant sur leurs plants sauvages respectifs. Les analyses ont montré que durant les 8 premières heures suivant le dépôt du puceron sur la plante, différents items de son comportement trophique sont affectés (phase de recherche des tubes criblés, de salivation et/ou d'ingestion de sève élaborée dans le phloème, etc.). Cependant, durant cette période, en plus des différences constitutives mises en évidence, des défenses ont aussi été induites par la plante suite à l'infestation aphidienne. Dans un troisième temps, il s'agira de montrer que ces dernières et la paroi végétale peuvent aussi participer aux effets observés sur le comportement trophique de *M. persicae*. Pour cela, une infestation par des pucerons (10 ou 60 adultes *M. persicae* pendant 24 h) a permis d'étudier les effets directs et indirects de la mutation ou surexpression des gènes *PME17*, *PME3* et *PMEI4* dans les réponses de la plante à l'infestation.

Enfin, des différences constitutives entre les deux écotypes utilisés (*A. thaliana* WS et Col) ont pu être observées au niveau des feuilles et des parois des cellules foliaires, qui sont susceptibles d'impacter aussi bien le comportement alimentaire que la physiologie des pucerons *M. persicae*. Cependant, les préférences d'écotype semblent être dépendantes de l'espèce de puceron considérée. En effet, une expérience menée en parallèle de celles effectuées sur *M. persicae*, a montré que le puceron du chou (*Brevicoryne brassicae*) qui s'alimente exclusivement sur des Brassicaceae, n'a pas les mêmes préférences alimentaires en terme d'écotype. Avant d'aborder ces différences d'acceptabilité entre écotypes et espèces de pucerons,

l'accent va donc être mis dans un premier temps sur le rôle des trois gènes *PME17*, *PME3*, *PMEI4* dans la plante et dans l'interaction *A. thaliana-M. persicae*. Pour cela, il est nécessaire au préalable d'identifier le lieu d'expression de ces trois gènes au niveau de la plante entière et notamment au niveau des feuilles, organe choisi pour étudier l'interaction.

1. Rôles de PME17, de PME3 et de PMEI4 chez *A. thaliana*

1.1. Localisation et rôles de PME17, de PME3 et de PMEI4 dans la plante entière

L'expression de plusieurs isoformes PME et PMEI a déjà été détectée dans différents organes d'*A. thaliana*, tels que les racines, les méristèmes ou les feuilles et peuvent intervenir dans la croissance et le développement de la plante (**Tableau 3** p.12 et **Tableau 5** p.17). Toutefois, leurs rôles dans ces organes ne sont pas toujours connus. Au niveau des feuilles, l'expression de 7 gènes PME (*PME 1*, *2*, *3*, *17*, *26*, *41* et *61*) et de 2 gènes PMEI (*PMEI 1* et *2*) a déjà été mise en évidence (**Tableaux 3 et 5**). Les gènes *PME17* et *PME3* ont été localisés dans les feuilles respectivement par qRT-PCR (feuilles âgées de 3 semaines dans notre étude et de 10 jours dans Sénéchal *et al*. 2014) et par localisation de l'activité du promoteur propre promPME3:GUS (feuilles de 4 semaines ; Guénin *et al*. 2011). La génétique inverse et l'utilisation de plants transgéniques permettent de mettre en évidence le rôle de ces deux PME. Le gène *PME17* a déjà été étudié grâce à deux mutants d'insertion d'un ADN-T. Un mutant, utilisé dans cette étude, est associé à une perte de fonction (*Knock-Out*, KO) avec un fond génétique WS (*pme17* FLAG208G03) et un autre de sous-expression forte (*Knock-Down*, KD) avec un fond génétique Col (*pme17* SALK059908). Ces deux mutants ne présentent pas de différences phénotypiques au niveau des feuilles par rapport à leur sauvage respectif, contrairement aux racines, qui sont plus longues chez les mutants (Sénéchal *et al*. 2014). Concernant le gène *PME3*, trois mutants KO d'insertion d'un ADN-T ont été utilisés jusqu'à maintenant, issus de trois collections différentes. Le mutant *pme3* de notre étude (FLAG585E02) est le seul issu d'un fond génétique WS (Guénin *et al*. 2011), les deux autres étant issus d'un fond Col, de la collection GABI-Kat (00210, Raïola *et al*. 2011) et de la collection ABRC (CS857169, Hewezi *et al*. 2008). Tout comme les mutants *pme17*, les mutants *pme3* FLAG et ABRC présentent un phénotype racinaire, avec respectivement davantage de racines adventives et des racines principales plus courtes par rapport à leur sauvage respectif. Le mutant *pme3* FLAG présente une phénologie particulière avec un phénotype au niveau des parties aériennes, dont la longueur des tiges inflorescentielles et le diamètre de la rosette sont réduits par rapport aux plants WS (respectivement 8 % et 10 %). Le gène *PMEI4* n'est que très faiblement exprimé au niveau des feuilles d'*A. thaliana* et les plants *pmei4* et 35S:PMEI4:GFP ne présentent pas de phénotype foliaire particulier. Cependant, ces deux plants transgéniques montrent que la PMEI4 favorise l'accélération de la croissance d'un hypocotyle étiolé (Pelletier *et al*. 2010).

Différents phénotypes macroscopiques ont donc été observés au niveau des différents plants transgéniques utilisés pour caractériser la PME17, la PME3 et le PMEI4. Au niveau moléculaire, ces protéines ont elles un rôle dans la composition et la structure de la paroi végétale ?

Variations constitutives des plants étudiés

ligne	Principaux paramètres foliaires étudiés		*pme3* / WS	*pme17* / WS	*pmei4* / Col	35S:PMEI4::GFP / Col	Col / WS
1	**Activité PME** (extraction pH7)		- 650%	=	+ 17%	+ 18%	- 50%
2	**Contenu en liaisons esters des pectines**		=	-	=	+	=
3	**Contenu en pectines**	GalA	=	- 290%	=	=	- 30%
	(chaînes principales RG1 et/ou HG)	Rha	=	- 300%	=	=	=
4	**Contenu en chaînes latérales RGI**	Ara	=	+ 70%	=	=	+ 40%
		Gal	=	=	=	=	=
	Contenu en chaînes latérales RGII	Fuc	=	=	=	=	+ 90%
5	**Activité PG**		+ 54%	=	=	=	- 244%
6	**Expression des principaux gènes de défense**	*PR1*	?	- 125%	=	=	- 430%
		PAD4	- 110%	- 100%	=	=	=
		PDF1.2a	?	?	=	+ 310%	=
		Calmodulines	ND	+	ND	ND	ND
		Facteurs de transcription	ND	+ (WRKY, MYB)	ND	ND	ND

Figure 68 Synthèse des variations observées constitutivement au niveau des paramètres étudiés dans les feuilles des différents plants sauvages et transgéniques

1.2. Rôles de PME17, de PME3 et de PMEI4 dans les feuilles

Un éventuel rôle direct de ces trois protéines pariétales a été estimé au niveau de variations de l'activité PME et du contenu en liaisons esters. La PME17 et la PME3 sont susceptibles d'avoir un rôle direct sur ces deux paramètres alors que le PMEI4 jouerait plutôt un rôle indirect. L'activité PME globale a été mesurée, dans un premier temps, dans les feuilles des différents plants transgéniques ou sauvages âgés de 3 semaines (**Figure 68 ligne 1**). Les mesures ont été effectuées dans deux types d'extraits enrichis en protéines pariétales, qui diffèrent par la nature des sels et le pH utilisés (extraction au LiCl à pH 5 ou au NaCl à pH 7). Les résultats obtenus montrent que seule la mutation *PME3* engendre une variation significative de l'activité PME dans les deux extraits. En effet, l'activité PME dans les feuilles *pme3* est fortement réduite par rapport à celles des plants WS, dans les deux extraits enrichis en protéines pariétales (9 fois avec l'extraction au LiCl-pH 5 et 13 fois avec NaCl-pH 7). Ceci suppose que l'activité d'un grand nombre d'isoformes est modifiée suite à l'absence de la PME3. Ces résultats confirment l'étude menée par Guénin *et al*. (2011) où une baisse de l'activité PME avait déjà été détectée dans des feuilles de plants âgés de 4 semaines (2,3 fois avec l'extraction au NaCl-pH 7) mais aussi dans les tiges de ces mêmes plants et dans les racines de plants âgés de 10 jours. L'effet direct de la PME3 sur l'activité PME ne semble donc pas spécifique à un organe ou un tissu. Cette baisse d'activité PME au niveau de feuilles âgées de 4 semaines a aussi été observée chez le mutant *pme3* GABI-Kat (2 fois) mais par mesure de l'activité par diffusion sur gel de gélose (Raïola *et al*. 2011). Les résultats expérimentaux montrent aussi que la mutation *PME17* ne modifie pas l'activité PME mesurée dans les deux types d'extraits foliaires. Cependant une baisse d'activité PME a été observée par Sénéchal *et al*. (2014) dans les racines de 10 jours des plantules *pme17* (extraction LiCl-pH 5). L'effet de la PME17 sur l'activité PME semble donc être plutôt spécifique de l'organe considéré. Enfin, les résultats indiquent que la mutation ou la surexpression *PMEI4* modifient l'activité PME foliaire uniquement dans l'extrait NaCl-pH 5 (augmentation). Même si l'on ne dispose pas d'information sur l'activité PME dans d'autres organes, les variations d'activité PME détectées dans les plants *pme3*, *pme17*, *pmei4* et 35S:PMEI4:GFP semblent corrélées à la localisation tissulaire de l'expression de ces gènes dans leurs plants sauvages respectifs. Au niveau de la feuille, seule la PME3 semble donc avoir un effet direct sur l'activité PME globale. Cependant, est-ce que les modifications des gènes *PME3*, *PME17* ou *PMEI4* engendrent des changements de profil de méthylestérification des pectines ?

L'analyse en spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FT-IR) a notamment permis de détecter des différences de contenus en liaisons esters dans les extraits pariétaux (**Figure 68 ligne 2**). Dans les feuilles des plants *pme17*, les spectres acquis révèlent une baisse du contenu en liaisons esters par rapport aux feuilles WS, suggérant une baisse du DM. Cependant, le DM semble évoluer de façon inverse dans la zone du collet de plantules *pme17* âgées de 7 jours où une augmentation du contenu en liaisons esters a été détectée, corrélée à une baisse d'activité PME observée dans les plantules de 10 jours (Sénéchal *et al*. 2014). L'effet direct de la PME17 sur le profil de méthylestérification semble donc encore organe-spécifique. Concernant la PME3, les spectres FT-IR n'indiquent pas de changements du contenu en liaisons esters au niveau des feuilles. Ceci confirme l'étude menée par Guénin *et al*. (2011) où aucune variation significative du DM des acides uroniques n'a été constatée dans les feuilles de plants *pme3* âgés de 4 semaines (mesure par dosage colorimétrique), même si le DM était plus

important dans les autres organes testés (racines, hypocotyles). Toutefois, le DM était plus important dans les feuilles de plants *pme3* GABI-Kat âgés de 4 semaines que dans les feuilles Col (mesure par dosage colorimétrique, Raïola *et al*. 2011). Enfin, même si les spectres ne montrent aucune variation significative du contenu en liaisons au sein des parois des cellules foliaires des plants *pmei4* (par rapport à celles de Col), ils indiquent un contenu en liaisons esters plus important dans les feuilles des plants 35S:PMEI4:GFP que dans les feuilles Col. Ceci suggère une augmentation du DM, qui est en corrélation avec les analyses FT-IR déjà réalisées au niveau des hypocotyles étiolés de ces mêmes plants 35S:PMEI4:GFP (Pelletier *et al*. 2010). En effet, Pelletier et son équipe ont aussi observé une augmentation significative du nombre de liaisons esters (1712 cm^{-1}) dans cet organe, corrélée à une augmentation du contenu en pectines méthylestérifiées et une activité PME supposée réduite (non mesurée). Toutefois, nos résultats montrent des activités PME stables à pH 5 voire plus importante à pH 7 dans les feuilles 35S:PMEI4:GFP que celles de Col. Les variations de profils de méthylestérification observées peuvent avoir une influence sur l'élasticité pariétale. En effet, il a été démontré que durant la formation des primordia floraux au niveau des méristèmes apicaux caulinaires d'*A. thaliana*, une augmentation de la rigidité (corrélée à une élasticité pariétale réduite) a lieu lorsque les HG sont hautement méthylés (Peaucelle *et al.* 2008). Ainsi, les parois seraient plus élastiques dans les feuilles *pme17* que dans les feuilles WS (DM plus faible), alors que dans les feuilles 35S:PMEI4:GFP elles le seraient moins (DM plus élevé).
D'après les résultats obtenus, les variations de contenus en liaisons esters dans les parois foliaires des plants transgéniques ne semblent pas corrélés avec les variations d'activité PME observées. En effet, le DM réduit chez *pme17* suppose une activité PME plus importante que chez le sauvage mais cette dernière n'est pas détectée dans les dosages effectués. Il en est de même pour les feuilles 35S:PMEI4:GFP où le DM plus important n'est pas en corrélation avec l'activité PME mesurée (stable voire plus importante que chez Col). Ces contradictions pourraient provenir de la nature différente des extraits utilisés pour mesurer l'activité PME et les spectres FT-IR.

En dehors de la présence de méthylesters sur les GalA constituant les HG, les teneurs en GalA et d'autres monosaccharides pectiques ont été estimées par chromatographie HPAEC-PAD au niveau des feuilles de chaque plant transgénique et sauvage (**Figure 68 lignes 3 et 4**). D'après les analyses effectuées, les teneurs en GalA et en rhamnose (Rha) sont fortement réduites dans les feuilles *pme17* (respectivement 3,0 et 2,9 fois). Ces variations suggèrent une baisse du contenu en HG et/ou en chaîne principale des RGI. De plus, une augmentation du contenu en arabinose (Ara, 1,7 fois) pourrait traduire une teneur plus importante en chaînes latérales des RGI (arabinanes). Ces arabinanes peuvent potentiellement interagir avec d'autres composés pariétaux et modifier ainsi la rhéologie de la paroi et notamment sa viscoélasticité (Braybrook & Hofte, 2012). Les chaînes latérales des RGI peuvent par exemple interagir par des liaisons covalentes avec des xyloglucanes (XG) et des protéines de structure comme les extensines (EXT) ou les protéines à arabinogalactanes (AGP) (Qi *et al.* 1995 ; Thompson & Fry 2000 ; Lamport & Kieliszewski 2005 ; Nuñez *et al.* 2009). De plus, l'interaction entre les pectines et d'autres composés pariétaux semble être plus complexe chez *pme17*, puisque les analyses menées sur puces à ADN montrent que la mutation *PME17* engendre au niveau des feuilles

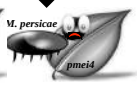
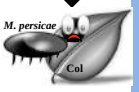
pme17 une sous-expression de 4 EXT et une surexpression de 3 AGP par rapport aux feuilles WS.
L'absence de la PME17 (et/ou les effets engendrés par son absence) semble donc modifier de façon indirecte la composition en monosaccharides pectiques foliaires. Cependant, ce n'est pas le cas de l'absence de la PME3 (et/ou les effets engendrés par son absence). Toutefois, les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des feuilles *pme3* montrent de fortes variations opposées de la teneur en GalA entre les 2 répétitions biologiques effectuées. Dans des travaux antérieurs, une réduction du contenu en acide uronique (25 %) a été observée au niveau des feuilles *pme3* par rapport aux feuilles WS (Guénin *et al*. 2011), par dosage colorimétrique de Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973). Néanmoins, en comparant les feuilles *pme3* GABI-Kat aux feuilles Col, aucune variation significative de la teneur en GalA (ni de la teneur en sucres neutres) n'a été détectée par chromatographie gazeuse (Raïola *et al*. 2011). Enfin, les résultats montrent que la mutation ou la surexpression *PMEI4* ne modifient pas significativement la teneur en monosaccharides pariétaux. Il en est de même dans les feuilles de 4 semaines des sur-expresseurs *AtPMEI1* et *AtPMEI2* (Raïola *et al*. 2011) mais aussi dans la paroi des graines du sur-expresseur *AtPMEI5* (Müller *et al*. 2012).

Outre les variations d'activité PME, du contenu en liaisons esters et des teneurs en HG, l'activité des PG a aussi été mesurée au niveau des feuilles des plants transgéniques (**Figure 68 ligne 5**). Même si l'activité des différentes isoformes de PG est plus importante dans les feuilles *pme3*, elle n'est pas modifiée au sein des feuilles *pme17*, *pmei4* et 35S:PMEI4:GFP. La dépolymérisation des HG par les PG modifie la taille des chaînes de GalA, leur activité augmentant généralement lorsque le DM des HG diminue (Bonnin *et al.* 2002). Même si le DM ne semble par varier chez *pme3*, l'augmentation de l'activité PG peut être un effet indirect de la mutation *PME3*. On peut noter que l'activité PG peut engendrer des changements de la porosité du réseau pectique, l'activité PG étant positivement corrélée à la taille des pores (Baron-Epel *et al.* 1988). De plus, les OG produits par l'hydrolyse sont capables d'activer des voies de signalisation entraînant l'expression de gènes de défense (Côté & Hahn, 1994 ; Ridley *et al.* 2001).

L'analyse par qRT-PCR de l'expression de quelques gènes codant des protéines intervenant au niveau des défenses de la plante ou de la paroi, a montré que les mutations *PME17* et *PME3* provoquent une sous-expression respectivement des gènes *PR1* et *SID2*, intervenant dans la voie de l'acide salicylique (**Figure 68 ligne 6**). De plus, même si la mutation *PMEI4* ne modifie pas l'expression des gènes étudiés, sa surexpression augmente significativement l'expression de *SID2*, *PDF1.2a*. Ces différentes variations d'expression de gène laissent supposer un rôle très indirect de la PME17, la PME3 et du PMEI4 sur les défenses de la plante. L'analyse transcriptomique réalisée sur *pme17* a par ailleurs indiqué qu'en plus de la modification des gènes *EXT* et *AGP*, la mutation *PME17* engendre une surexpression de gènes participant à la modification des pectines comme le *PMEI6*, la *PLL* AT3G55140, le *PGIP1* mais aussi modifiant les hémicelluloses (*XTH10*) et la cellulose (*BGLU45*). Une analyse transcriptomique réalisée lors de la thèse de S. Guénin (soutenue en 2013 à l'UPJV) a montré qu'il y a aussi des modifications significatives de l'expression de plusieurs gènes codant des protéines pariétales (3 *PME*, 3 *PL*, 3 *PMEI*, 2 *XTH*) dans de jeunes pousses du mutant *pme3*

Figure 69 Synthèse des variations du comportement trophique et de la physiologie de *M. persicae* observées sur les feuilles des différents plants sauvages et transgéniques

Variations du comportement trophique de *M. persicae* sur les plants étudiés

ligne	Principaux paramètres EPG étudiés	*pme3* / WS	*pme17* / WS	*pmei4* / Col	35S:PMEI4::GFP / Col	Col / WS
1	**Recherche** (Durée totale, s C)	- 22%	+ 23%	=	=	=
2	**Salivation phloémienne** (Durée totale, s E1)	=	+ 136%	=	- 51%	+ 78%
3	**Ingestion sève élaborée** (Durée totale,	+ 63%	- 30%	=	=	- 23%
4	**Déraillement des stylets** (nombre, n_F)	- 77%	=	+ 84%	=	+ 121%
5	**Temps avant 1ère séquence phloémienne**	=	=	+ 80%	=	=
						
		Sensibilité élevée	**Résistance**	**Résistance**	**Sensibilité faible**	**Résistance**
6	**Suivis physiologiques 21 jours**	**pas de ≠**	**pas de ≠**	**pas de ≠**	**pas de ≠**	**Rejet de Col**

FLAG585E02 (celui de notre étude) par rapport aux pousses d'*A. thaliana* WS (communication personnelle de S. Guénin). Ces études transcriptomiques laissent donc supposer un effet pléiotropique de la PME17 et de la PME3.
Ces différents changements observés de façon constitutive suite à la mutation *PME17*, *PME3*, *PMEI4* ou à la surexpression *PMEI4* peuvent-ils avoir un impact sur le comportement du puceron *M. persicae* ?

2. Rôles de PME17, de PME3 et de PMEI4 dans les interactions *A. thaliana*-puceron

La présence de pectinases (PME, PG) et de β-(1,3)-glucanases dans les salives de différentes espèces de puceron montre que le comportement des pucerons serait étroitement associé à la composition de la paroi végétale (**Tableau 12**) (Campbell & Dreyer 1985 ; Dreyer & Campbell 1987). De plus, même si de nombreuses études ont déjà montré une altération de l'acceptabilité alimentaire de mutants d'*A. thaliana* (Louis 2012), aucune ne portait sur une protéine intervenant dans les modifications de la paroi végétale. Les résultats obtenus dans l'étude comportementale des pucerons par la technique de l'EPG démontrent que des enzymes pariétales modifiant les pectines (PME, PMEI) sont capables d'avoir un impact sur le comportement trophique de *M. persicae*.

2.1. Rôles de *PME17*, *PME3* et *PMEI4* sur le comportement trophique de *M. persicae*

L'évaluation des capacités d'acceptabilité des plants *pme17*, *pme3*, *pmei4* et 35S:PMEI4::GFP a montré des modifications du comportement alimentaire du puceron. Parmi celles-ci, la phase de recherche des tubes criblés joue un rôle important.

Les mutation *PME17* et *PME3* (et/ou les effets engendrés par leur absence) modifient la durée de la phase de recherche des tubes criblés engagée par *M. persicae*, contrairement à *PMEI4*

Lorsque les stylets d'un puceron progressent entre les cellules mésophylliennes et principalement au niveau des parois primaires, des modifications au niveau des pectines *via* les PME ou PMEI sont susceptibles d'avoir un impact direct sur la phase de recherche des tubes criblés. Les analyses EPG montrent que la phase de recherche des individus *M. persicae* s'alimentant sur des plants *pme17*, *pme3* et *pmei4* est modifiée mais pas sur 35S:PMEI4::GFP (comparés aux pucerons s'alimentant sur leur écotype sauvage respectif ; **Figure 69 ligne 1**). Effectivement, la durée totale passée par les stylets du puceron dans le mésophylle avant d'atteindre le phloème est significativement plus longue lorsque le puceron s'alimente sur les plants *pme17* mais plus courte sur les *pme3* (par rapport aux plants sauvages WS). Sur les plants *pmei4*, les pucerons engagent significativement plus de phases de sondage ou de recherche sans que la durée totale de la phase de recherche ne soit modifiée. De plus, le temps écoulé depuis le début de l'enregistrement jusqu'à l'accès des stylets dans le phloème est beaucoup plus important sur les plants *pmei4* que sur Col (**Figure 69 ligne 5**), traduisant une difficulté

rencontrée par les pucerons pour atteindre le phloème. Ces variations observées suggèrent, sur les 8 premières heures suivant le dépôt du puceron sur la feuille, une difficulté du puceron à atteindre les tubes criblés pour s'alimenter dans les plants *pme17* et *pmei4* alors qu'il n'en trouve aucune pour les tissus phloémiens des plants *pme3*.

Des différences d'acceptabilité des plants transgéniques ont aussi été constatées en étudiant les phases de désynchronisation mécanique des mouvements des stylets maxillaires et mandibulaires, qui semblent être principalement causées par des facteurs présents dans les tissus épidermique/mésophyllien (Tjallingii 1987). Dans notre étude, en comparaison avec les écotypes sauvages respectifs, *M. persicae* semble rencontrer beaucoup plus de difficultés de synchronisation des stylets sur les feuilles des plants *pmei4* que dans celles de *pme3*. (**Figure 69 ligne 4**). Ce problème mécanique est connu pour apparaître plus fréquemment dans des plants de pomme de terre (*S. tuberosum*) résistants à *M. persicae*, en association avec une phase de recherche plus longue (Alvarez *et al.* 2006). Ainsi, le faible nombre de déraillements des stylets de *M. persicae* sur les feuilles des plants *pme3* expliquerait une acceptabilité accrue de la plante par le puceron, alors que sur les feuilles des plants *pmei4*, les déraillements plus fréquents reflètent un rejet de ces plants, caractérisant un effet d'antixénose mésophyllienne. (Tjallingii 1990). Le processus d'acceptabilité d'une plante hôte en tant que source alimentaire fait aussi intervenir des paramètres phloémiens, tels que la salivation phloémienne et l'ingestion de sève élaborée (Powell *et al.* 2006). De façon surprenante, des modifications du comportement trophique de *M. persicae* ont lieu lorsque ses stylets se trouvent dans le phloème des feuilles *pme17*, *pme3* ou 35S:PMEI4::GFP.

La mutation *PME17* et la surexpression *PMEI4* (et/ou les effets engendrés par leur absence/surexpression) modifient la durée de salivation phloémienne de *M. persicae*

Dans les tubes criblés, *M. persicae* présente des phases de salivation liquide deux fois plus longues dans les feuilles des plants *pme17* mais deux fois plus courtes dans les feuilles des plants surexprimant *PMEI4* (**Figure 69 ligne 2**). La durée moyenne de salivation des pucerons dans les tubes criblés de ces deux plants transgéniques subit des variations similaires.

La sécrétion de salive soluble précède toute ingestion de sève élaborée et conditionnerait le contenu phloémien au niveau du site d'alimentation, notamment pour limiter l'occlusion des tubes criblés (Tjallingii & Esch 1993 ; Tjallingii 2006). La durée de salivation étant positivement corrélée à un rejet de la composition phloémienne, les résultats laissent supposer un rejet par *M. persicae* de la sève élaborée des plants *pme17* traduisant une antixénose phloémienne alors que de façon étrange cet effet n'est pas observé sur les plants 35S:PMEI4::GFP reflétant une absence d'impact lorsque le gène *PMEI4* est surexprimé. De plus, la durée moyenne des salivations fractionnées (suivies d'une ingestion de sève élaborée) et la durée totale des salivations simples suivies ou non suivies d'ingestion sont aussi beaucoup plus courtes au sein des tubes criblés 35S:PMEI4::GFP que dans ceux de Col. Ceci consolide l'hypothèse d'une meilleure acceptabilité des plants surexprimant *PMEI4*.

Les paramètres évaluant l'ingestion de sève élaborée apportent aussi des informations complémentaires mais uniquement sur l'acceptabilité de la sève élaborée des plants *pme17* et *pme3*.

Les mutations *PME17* et *PME3* (et/ou les effets engendrés par leur absence) modifient la durée d'ingestion de sève élaborée de *M. persicae*, contrairement à la mutation ou surexpression *PMEI4*

La durée d'ingestion de sève élaborée dépend de la qualité du contenu phloémien et reflète principalement l'acceptabilité de la plante par le puceron (Tjallingii & Mayoral 1992). Les résultats expérimentaux (**Figure 69 ligne 3**) indiquent que *M. persicae* ingère de la sève élaborée significativement moins longtemps sur des plants *pme17* que sur l'écotype WS, renforçant ainsi l'hypothèse de rejet de la composition phloémienne de *pme17*, au moins pendant la durée de l'expérimentation (8 h). Néanmoins, la phase d'ingestion soutenue de sève élaborée (> 10 min) est plus longue pour les pucerons s'alimentant sur les plants *pme3* par rapport aux pucerons s'alimentant sur l'écotype WS. La composition phloémienne des plants *pme3* semble donc contribuer à une acceptabilité accrue de ces plants.

Globalement, d'un point de vue comportemental, les analyses des paramètres EPG ont montré d'une part une préférence alimentaire pour *pme3* et pour 35S:PMEI4::GFP et d'autre part un rejet des plants *pme17* et *pmei4*. La préférence des plants n'exprimant pas les protéines PME3 ou surexprimant le PMEI4 traduit une modification de la structure des parois de la plante et de son contenu phloémien en faveur du puceron. Le rejet se traduit par une résistance constitutive de type antixénose, certes faible mais localisée au niveau des cellules mésophylliennes engendrant en particulier des déraillements des stylets des pucerons dans les parois des plants *pmei4*. Une résistance de type antixénose est développée par une plante lorsque des facteurs biophysiques ou allélochimiques affectent défavorablement le comportement trophique d'un insecte, aboutissant à un possible rejet de la plante en tant qu'hôte (Smith & Clement 2012). Une antixénose mésophyllienne conjuguée à une antixénose phloémienne plus importante ont été mises en évidence dans les plants *pme17*. Celles-ci traduisent des difficultés du puceron à accéder aux tubes criblés mais aussi des problèmes d'acceptation de son contenu phloémien. Ces antixénoses reflètent l'importance des protéines PME17 et PMEI4 dans la structure des parois qui interviennent dans le réarrangement et les modifications des pectines.

Dreyer & Campbell (1984) ont montré qu'une différence de DM des pectines entre deux variétés de Sorgho (*Sorghum bicolor*) pourrait modifier la résistance à *M. persicae*. En effet, les feuilles d'une variété résistante de *S. bicolor* (faible ingestion de sève élaborée) présentent un DM constitutivement plus important que les feuilles de la variété sensible (Dreyer & Campbell, 1984). Une augmentation du DM semble donc être associée à une meilleure résistance des plantes vis-à-vis de *M. persicae*. Cependant, le rôle du DM et des pectines semble être beaucoup plus complexe. C'est ainsi que nos résultats montrent qu'une modification des HG par les PME17 et PME3 semble modifier différemment le DM et la résistance à *M. persicae*. Cette hypothèse reste à confirmer.

Les modifications du comportement trophique de *M. persicae* ont été observées à court terme, c'est à dire durant les 8 premières heures suivant le dépôt du puceron sur les différents plants. Les modifications du comportement trophique de *M. persicae* observées sur les plants transgéniques ont-elles un impact sur sa physiologie ? Pour répondre à cette question, des suivis de cohortes de larves néonates de pucerons ont été effectués.

2.2. Rôles de *PME17*, *PME3* et *PMEI4* sur la physiologie de *M. persicae*

Afin de détecter un éventuel impact de la mutation des gènes *PME17*, *PME3*, *PMEI4* et de la surexpression de *PMEI4* sur la physiologie de *M. persicae* à moyen terme (impact sur une génération de puceron uniquement), des suivis de cohortes de larves néonates (âgées de 24 h) ont été réalisés sur des plants *pme17*, *pme3*, *pmei4*, 35S:PMEI4::GFP et sur leurs écotypes sauvages respectifs pendant 21 jours. Dans nos conditions, ni la période pré-reproductive, ni la fécondité journalière, ni le taux d'accroissement naturel intrinsèque et ni le temps de doublement des populations ne varient significativement entre les plants transgéniques et leurs sauvages respectifs (**Figure 69 ligne 6**). L'absence d'effet défavorable des plantes génétiquement modifiées traduit une absence de résistance dite antibiose (Smith & Clement 2012). Le rôle d'autres composés pariétaux tels que les hémicelluloses et la cellulose a déjà été étudié dans les mécanismes de résistance des plantes aux pucerons. En effet, deux études menées chez *A. thaliana* ont montré qu'une xyloglucane transglycosidase hydrolase modifiant les hémicelluloses (XTH33) et une cellulose synthase produisant les fibrilles de cellulose (CEV1) modifient la fécondité de *M. persicae* (Ellis *et al.* 2002 ; Divol *et al.* 2007). D'après Divol et son équipe (2007), la fécondité de *M. persicae* est plus importante (augmentation de 63 %) sur des feuilles isolées (en boîte de Pétri) du mutant *xth33* par rapport aux feuilles des plants sauvages (écotype Col-0). En revanche, la fécondité de *M. persicae* est significativement réduite (-27 %) sur les feuilles du mutant KO cev1 (Ellis *et al.* 2002).

Ainsi, les antixénoses mésophyllienne et phloémienne des plants *pme17* à *M. persicae* mises en évidence à court terme (8 h) ne sont pas accompagnées d'une résistance antibiose à moyen terme (3 semaines). Il semblerait que les pucerons s'alimentant sur des plants *pme17* se soient probablement adaptés à ces deux effets antixénoses ou que les pucerons aient réussi à contourner ces premières barrières physiques (mésophylliennes) ou chimiques (phloémiennes) rencontrées à court terme. Will et son équipe (2007) ont suggéré que la salive d'un puceron pourrait être à l'origine de modifications physiologiques destinées à réduire les mécanismes de défense constitutifs de la plante. Ces altérations des systèmes de défense des plantes permettraient à l'insecte parasite (ici le puceron) de pouvoir s'installer et se développer sans qu'il y ait atteinte à l'intégrité de ses paramètres démographiques.

Les caractéristiques constitutives des plants transgéniques peuvent expliquer en partie les effets antixénoses en particulier mésophylliennes (la phase de recherche) observés sur le comportement de *M. persicae*. Nous nous sommes ensuite intéressé à l'effet de l'infestation par les pucerons sur les caractéristiques pariétales des plants transgéniques par rapport aux plants sauvages.

2.3. Changements engendrés après une infestation par *M. persicae* sur les différents plants

2.3.1. Comment PME3 et PME17 peuvent-ils respectivement constituer un facteur de résistance ou de susceptibilité à *M. persicae* ?

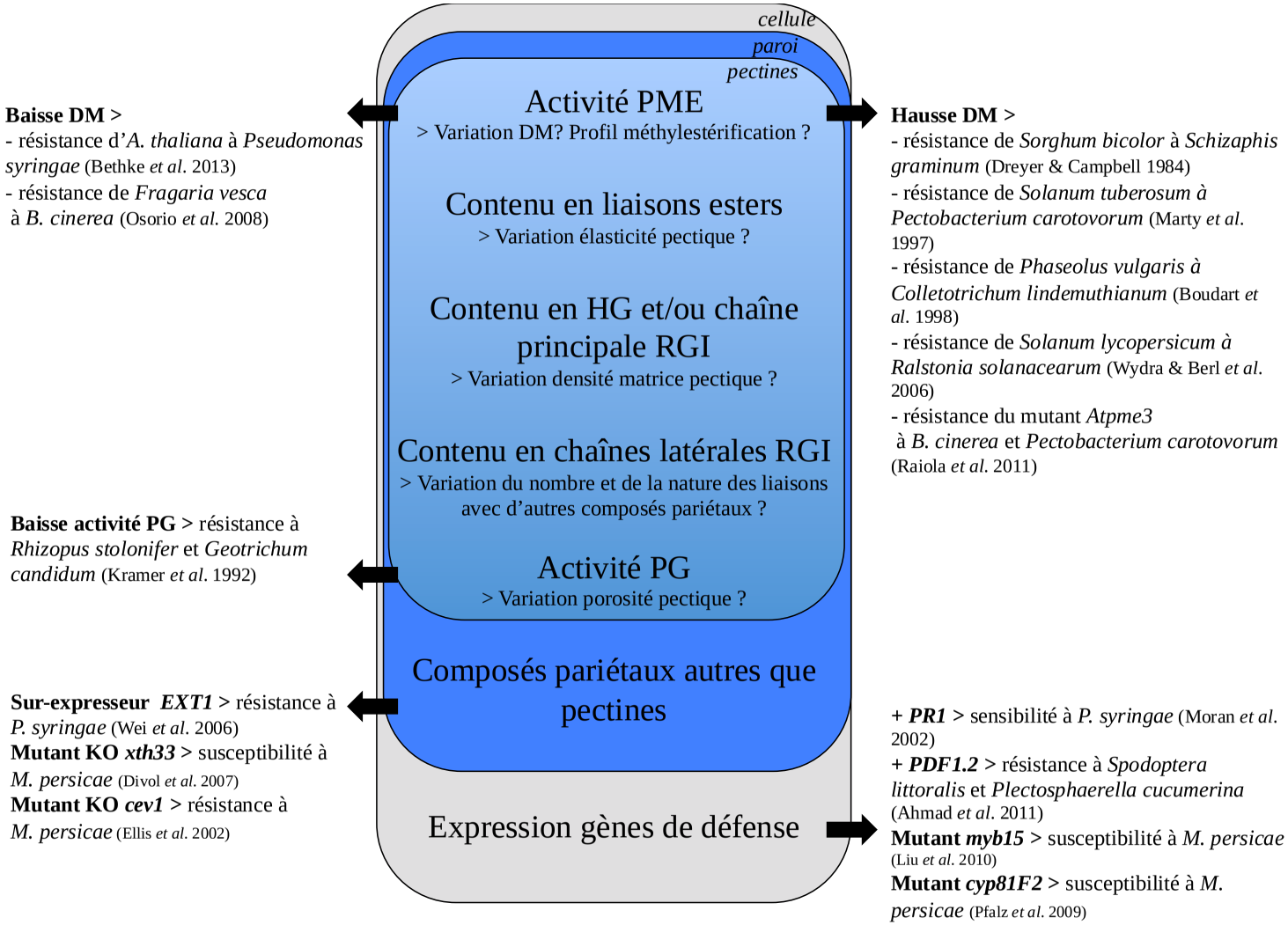


Figure 70 Potentiel impact de différentes composantes (pectique, pariétale et cellulaire) déjà mesuré dans la littérature sur différents modèles plante-bioagresseur. Pour la plupart des composantes étudiées durant la thèse, des phénomènes de résistances et susceptibilités d'espèces végétales contre des pucerons, bactéries ou champignons ont déjà été observées. DM, degré de méthylestérification.

Les mutations *PME17* et *PME3* (et/ou les effets engendrés par leur absence) ont un effet sur les variations d'activité PME et de DM observées suite à une infestation aphidienne

Les études menées sur le comportement de *M. persicae* supposent un rôle de PME3 en tant que facteur de résistance aphidienne et de PME17 en tant que facteur de susceptibilité. Ces variations de résistance peuvent être dues à des protéines végétales constitutives ou inductibles par une infestation aphidienne mais aussi à des composés allélochimiques synthétisés par des produits de gènes de résistance (Smith & Clement, 2012). Nous avons montré que les mutations sur des différents gènes étudiés engendrent des modifications constitutives des activités enzymatiques de PME et de PG, du contenu en liaisons esters et aussi en monosaccharides pectiques des plants transgéniques. Lorsque celles-ci sont soumises à des infestations par des pucerons, la plupart des modifications engendrées au niveau des feuilles sont différentes entre les plants *pme17* et *pme3*. C'est ainsi que l'activité PME ne varie pas suite à l'infestation au niveau de ces deux plants, alors qu'elle diminue significativement chez le sauvage WS (**Figure 71 ligne 1**). Il est donc difficile d'assimiler directement une variation d'activité PME à la résistance de PME3 ou la susceptibilité de PME17 à *M. persicae*. Jusqu'à notre étude, aucune activité PME n'avait été mesurée après une infestation aphidienne. Toutefois, vis-à-vis des pathogènes il a déjà été démontré des variations de résistance en fonction de l'activité PME et du DM dans des feuilles d'*A. thaliana*. D'une part, une augmentation d'activité enzymatique et un faible DM semblent contribuer à une résistance contre la bactérie biotrophe *P. syringae* (Bethke *et al.* 2013) (**Figure 70**). D'autre part, un DM élevé serait impliqué dans la résistance des plantes au champignon *Pectobacterium carotovorum* et à la bactérie *Ralstonia solanacearum* (Marty *et al.* 1997 ; Wydra & Beri 2007) (**Figure 70**). Ces données contradictoires rendent donc difficile l'association systématique d'une variation du DM à une résistance quelconque de la plante. Nos résultats montrent que suite à l'infestation de 24 h par *M. persicae*, le contenu en liaisons esters des pectines n'est pas significativement modifié au niveau des parois des cellules foliaires des plants WS, ni de celles de *pme3* (**Figure 71 ligne 2**). Cependant, il y a davantage de liaisons esters dans celles de plants *pme17* suite à une infestation aphidienne, supposant donc une augmentation du DM, alors que sans infestation les plants *pme17* étaient caractérisés par un contenu réduit en liaisons esters (baisse du DM). La PME17 pourrait donc être un des régulateurs du contenu en acide carboxylique (COOH) et en méthylester ($COO\text{-}CH_3$) et donc du DM lors d'une infestation aphidienne. Quoiqu'il en soit, un DM élevé a déjà été associé à une augmentation de la résistance constitutive du sorgho (*Sorghum bicolor*) au puceron *M. persicae*, (Dreyer & Campbell 1984) (**Figure 70**). L'augmentation du DM des plants *pme17* suite à l'infestation de 24 h pourrait donc participer à la résistance antixénose observée pendant les 8 h d'enregistrements d'EPG. Il est possible que l'élasticité pariétale soit aussi affectée dans les cellules foliaires de plants *pme17*, puisqu'un fort DM au niveau d'un méristème apical caulinaire d'*A. thaliana* a été corrélé à une faible élasticité pariétale (Peaucelle *et al.* 2011). L'analyse transcriptomique réalisée révèle que suite à l'infestation des plants *pme17*, en plus des variations de DM, de nombreux gènes modifiant les HG sont sous-exprimés.

La mutation *PME17* (et/ou les effets engendrés par son absence) a un effet sur la modification des HG en réponse à l'infestation aphidienne

En effet, la sous-expression du gène *PME5* ainsi que de 3 *PMEI* suggère des modifications du DM dans les cellules foliaires des plants *pme17*. *PME5* n'a pour le moment pas

Variations constitutives des plants étudiés

ligne	Principaux paramètres foliaires étudiés		*pme3* / WS	*pme17* / WS	*pmei4* / Col	35S:PMEI4::GFP / Col	Col / WS
1	**Activité PME** (extraction pH7)		- 650%	=	+ 17%	+ 18%	- 50%
2	**Contenu en liaisons esters des pectines**		=	-	=	+	=
3	**Contenu en pectines**	GalA	=	- 290%	=	=	- 30%
	(chaînes principales RG1 et/ou HG)	Rha	=	- 300%	=	=	=
4	**Contenu en chaînes latérales RGI**	Ara	=	+ 70%	=	=	+ 40%
		Gal	=	=	=	=	=
	Contenu en chaînes latérales RGII	Fuc	=	=	=	=	+ 90%
5	**Activité PG**		+ 54%	=	=	=	- 244%
6	**Expression des principaux gènes de défense**	*PR1*	?	- 125%	=	=	- 430%
		PAD4	- 110%	- 100%	=	=	=
		PDF1.2a	?	?	=	+ 310%	=
		Calmodulines	ND	+	ND	ND	ND
		Facteurs de transcription	ND	+ (WRKY, MYB)	ND	ND	ND

Variations du comportement trophique de *M. persicae* sur les plants étudiés

ligne	Principaux paramètres EPG étudiés	*pme3* / WS	*pme17* / WS	*pmei4* / Col	35S:PMEI4::GFP / Col	Col / WS
1	**Recherche** (Durée totale, s C)	- 22%	+ 23%	=	=	=
2	**Salivation phloémienne** (Durée totale, s E1)	=	+ 136%	=	- 51%	+ 78%
3	**Ingestion sève élaborée** (Durée totale,	+ 63%	- 30%	=	=	- 23%
4	**Déraillement des stylets** (nombre, n_F)	- 77%	=	+ 84%	=	+ 121%
5	**Temps avant 1ère séquence phloémienne**	=	=	+ 80%	=	=
		Sensibilité élevée	**Résistance**	**Résistance**	**Sensibilité faible**	**Résistance**
	Suivis physiologiques 21 jours	**pas de ≠**	**pas de ≠**	**pas de ≠**	**pas de ≠**	**Rejet de Col**

Variations des plants étudiés induites par une infestation par *M. persicae* (10 adultes / 24h)

ligne	Principaux paramètres foliaires étudiés		Inf*pme3* / *pme3*	Inf*pme17* / *pme17*	Inf*pmei4* / *pmei4*	Inf35S:PMEI4::GFP / 35S:PMEI4::GFP	InfWS / WS	InfCol / Col
1	**Activité PME**		=	=	+ 22%	+ 24%	- 21%	+ 33%
2	**Contenu en liaisons esters des pectines**		=	+	=	=	=	=
3	**Contenu en pectines**	GalA	=	+ 290%	=	=	=	=
	(chaînes principales RG1 et/ou HG)	Rha	=	+ 310%	=	=	=	=
4	**Contenu en chaînes latérales des RGI**	Ara	+ 50%	=	=	=	=	+ 20%
		Gal	+ 30%	+ 10%	=	=	- 20%	=
	Contenu en chaînes latérales des RGII	Fuc	=	=	=	=	=	=
5	**Activité PG**		- 25%	+ 52%	=	+ 47%	+ 80%	+ 131%
6	**Expression des principaux gènes de défense**	*PR1*	?	+ 385%	=	+ 165%	+ 685%	=
		PAD4	+ 155%	+ 125%	=	=	+ 215%	+ 305%
		PDF1.2a	=	+ 100%	- 425%	=	+ 145%	+ 240%
		Calmodulines	ND	=	ND	ND	=	ND
		Facteurs de transcription	ND	+(WRKY) / -(MYB)	ND	ND	+	ND

Figure 71 Synthèse des variations observées au niveau des paramètres étudiés dans les feuilles des différents plants sauvages et transgéniques suite à une infestation par *M. persicae* de 24 h.

été impliqué dans la réponse au stress d'*A. thaliana* mais uniquement dans la formation du méristème apical caulinaire (Peaucelle *et al.* 2008). Toutefois, *PMEI6* a déjà été observé sous-exprimé chez l'écotype Col suite à 48 h d'infestation par 60 adultes *M. persicae* (Kerchev *et al.* 2013). De plus, *PMEI2* est impliqué dans la réponse à une infection par *B. cinerea* ou *P. carotovorum* et sa surexpression engendrerait une résistance à ces deux pathogènes (concomitant à une activité PME plus faible et un DM plus élevé) (Lionetti *et al.* 2007). L'infestation de plants *pme17* par *M. persicae* engendre aussi une sous-expression des gènes *RWA2* et *RWA3* chez *pme17* suite à l'infestation, suggérant aussi une variation du degré d'acétylation (Manabe *et al.* 2013). Une sous-expression de 4 isoformes *PLL* et 4 *PG* a aussi été observée, évoquant une possible hydrolyse des HG. La mutation *PME17* (et/ou les effets engendrés par son absence) conjuguée au stress aphidien semble donc avoir un rôle indirect sur les modifications apportées aux HG (DM, DA, hydrolyse), alors que la mutation ou l'infestation seule sur l'écotype WS n'engendrent que très peu de modifications de ces derniers.

En plus de ces variations de gènes, l'activité des enzymes hydrolytiques (PG) a été mesurée sur les plants WS, *pme17* et *pme3* avant et après infestation aphidienne (**Figure 71 ligne 5**). Alors que l'activité des différentes isoformes PG est significativement plus importante suite à l'infestation dans les feuilles de plants *pme17*, comme sur WS, elle est significativement plus faible dans les feuilles de *pme3*. Le rôle indirect de la PME17 et de la PME3 sur la dégradation des HG en réponse à une infestation par *M. persicae* semble donc différent. Il a déjà été démontré qu'une baisse d'activité PG (mesurée avec la méthode de Sheehy *et al.* 1988) participait à la résistance contre le champignon nécrotrophe *Rhizopus stolonifer* et la levure *Geotrichum candidum* (Kramer *et al.* 1992). Même si le mode de colonisation de la plante est très différent pour un insecte phytophage, il est possible que les variations d'activité PG observées puissent participer aux variations de résistance à *M. persicae* observées sur *pme17* et *pme3*. Des variations d'activité PG peuvent aussi modifier la porosité du réseau pectique (Baron-Epel *et al.* 1988). En plus des variations de structure et d'agencement des HG, il y aussi de fortes variations de la teneur en HG et en RGI dans les feuilles *pme17* suite à l'infestation mais aussi dans celles de *pme3*.

<u>Les mutations *PME17* et *PME3* (et/ou les effets engendrés par leur absence) ont un effet sur les variations du contenu en pectines observées suite à l'infestation aphidienne</u>

Comme pour le contenu en liaisons esters, la composition des pectines en monosaccharides (GalA et Rha) dans les feuilles *pme3* et *pme17* évolue différemment suite à un stress aphidien (**Figure 71 ligne 3**). Effectivement, aucune variation de ces deux monosaccharides n'a été détectée dans les feuilles des plants *pme3* infestées par *M. persicae* alors qu'une très forte augmentation des contenus en Rha et GalA a été observée dans les plantes *pme17* infestées. Cette augmentation suggère un contenu plus élevé en chaînes latérales des RGI légèrement riches en galactane par rapport aux plants WS. De la même façon, même si le taux en RGI n'est pas modifié dans les feuilles *pme3* infestées, ils semblent présenter davantage de chaînes latérales riches en Gal et en Ara (**Figure 71 ligne 4**). La PME17 et la PME3 (et/ou les effets engendrés par leur mutation) pourraient donc avoir un rôle indirect lors d'une infestation aphidienne sur la régulation des RGI, respectivement sur le contenu en chaînes principales et en chaînes latérales. Les chaînes latérales des RGI peuvent interagir avec d'autres composés

pariétaux (protéines, polysaccharides) et modifier *in-situ* la porosité et la rigidité de la paroi. Sur des cultures cellulaires de coton (*Gossypium hirsutum*) et de rose (*Rosa* sp.) des liaisons covalentes ont été mises en évidence respectivement entre les résidus Ara des chaînes latérales des RGI et les protéines de structure appelées extensines (EXT, Qi *et al.* 1995) et entre les arabinogalactanes, arabinanes et/ou galactanes et les xyloglucanes (XG, Thompson & Fry 2000). Les chaînes latérales des RGI riches en arabinose peuvent aussi interagir avec les arabinogalactanes protéines (AGP), capables de diminuer la réticulation des pectines et ainsi augmenter la plasticité pectique (Lamport *et al.* 2006). Ces protéines de structure situées à l'interface paroi-membrane ont un double rôle au sein de la paroi, en tant que stabilisateur mécanique influençant la plasticité lors de la croissance et du développement de la plante (Beckman 1971) mais aussi en tant que mécanorécepteur impliqué notamment dans la perception d'un stress osmotique (Moore *et al.* 2013).

La mutation *PME17* (et/ou les effets engendrés par son absence) change l'expression de gènes codant des protéines pariétales (autres que pectiques) et de défense en réponse à l'infestation aphidienne

L'analyse transcriptomique réalisée sur *pme17* montre que suite à l'infestation par *M. persicae*, 5 *EXT* sont sous-exprimées et 6 *AGP* sont surexprimées, alors que l'expression de ces gènes ne varie pas chez l'écotype sauvage WS. Plusieurs études ont déjà révélé chez *A. thaliana* des variations d'expression de gènes codant des AGP et des EXT suite à un stress d'insecte phloémophage comme le puceron *M. persicae* ou l'aleurode *Bemisia tabaci* (Kempema *et al.* 2007 ; Couldridge *et al.* 2007 ; Barah *et al.* 2013). De plus, Couldridge et son équipe (2007) ont émis l'hypothèse que les AGP peuvent changer la pénétration de stylets du puceron. Il a par ailleurs été démontré que la surexpression d'une *EXT* chez *A. thaliana* (*EXT1*) engendre une résistance contre la bactérie *P. syringae* (Wei & Shirsat 2006) (**Figure 70**). La surexpression des 5 *EXT* et la sous-expression des 6 *AGP* observées de façon induite dans les feuilles de plants *pme17* pourraient participer à la résistance antixénose mise en évidence contre *M. persicae*. Il est aussi possible que la sous-expression des 4 *EXT* et/ou la surexpression des 3 *AGP* observées de façon constitutive chez *pme17* participent aussi à cette résistance.

Au niveau de la paroi végétale, il semblerait que l'activité PME totale ne soit pas impliquée directement dans la modification de l'immunité d'*A. thaliana* mais elle jouerait un rôle aussi bien dans les variations de DM que dans la présence, la structure et la teneur de certains composés pariétaux et leur interaction au sein de la paroi.

Les analyses transcriptomiques sur puce à ADN ont aussi montré que les feuilles de plants *pme17* infestées par *M. persicae* présentent 2,5 fois moins de gènes impliqués dans la réponse au stress que les feuilles WS**.** Parmi ces gènes de réponse au stress, la voie du SA est globalement réprimée dans les feuilles infestées *pme17*, avec la sous-expression des gènes codant la thionine 2.2 (*PR15*), l'isochorismate synthase 2 (*ICS2*, qui participe à la synthèse du SA) et la thaumatine (*PR5*). En revanche, l'infestation par *M. persicae* des feuilles de plants *pme17* entraîne une induction plus marquée de la voie du JA, avec la surexpression des trois gènes codant les défensines PDF1.2, PDF1.2b, PDF1.3.

Les analyses, par qRT-PCR, de l'effet de l'infestation aphidienne des feuilles *pme17* et *pme3* comparées à l'écotype sauvage WS, suggèrent une activation plus faible des gènes intervenant dans les deux principales voies de défense du salicylate et du jasmonate. Dans les feuilles *pme3*, l'activation du gène *PDF1.2a* est très fluctuante entre les deux répétitions biologiques prises en comptes alors qu'une surexpression de ce gène est confirmée dans les feuilles *pme17* infestées (plus faible tout de même que chez WS).

Sur les écotypes sauvages, les infestations par *M. persicae* entrainent une régulation des deux voies hormonales antagonistes du SA et du JA. Celle du SA conduit à la production de protéines *Pathogenesis-Related* (PR) et n'intervient pas dans la résistance contre *M. persicae* car le puceron est insensible notamment à PR1 (Moran & Thompson, 2001 ; Moran *et al.* 2002 ; Louis & Shah 2013). Concernant les gènes intervenant dans la voie SA, même si *SID2* n'a pas un rôle important dans la résistance basale à *M. persicae* (Pegadaraju *et al.* 2005), ce dernier est sensible à *PAD4* (résistance antibiose de *PAD4* avec une ingestion de sève élaborée plus importante sur le mutant *pad4*) (Pegadaraju *et al.* 2007). La voie du JA conduit à la production de défensines et participe à la production d'autres composés secondaires (camalexine, glucosinolates, etc.). Ainsi, la voie du SA est principalement activée par les phloémophages pour contrer les effets néfastes des défenses enclenchées par la voie du JA (Adio *et al.* 2011 ; Louis & Shah 2013).

Sur les plants présentant la mutation *PME17*, les infestations par *M. persicae* engendrent une perturbation de l'homéostasie hormonale, avec un changement d'équilibre entre les voies SA et JA suite à l'infestation aphidienne : la voie du SA est minimisée alors que celle du JA est prépondérante. Ce déséquilibre pourrait donc participer à la résistance antixénose observée sur *pme17*. La PME17 a donc un rôle indirect dans les défenses mises en place par la plante contre le puceron *M. persicae*. La mutation *PME3* semble avoir un effet encore plus important que la mutation *PME17* en particulier dans la réduction de l'expression des gènes des voies SA et JA, excepté *PAD4*. La PME3 pourrait donc aussi avoir un rôle indirect sur les défenses de la plante.

En plus des hormones végétales, les oligogalacturonides (OG), fragments pectiques issus de l'hydrolyse des HG, sont aussi capables d'éliciter des défenses de la plante. Après infestation des plants *pme17* par *M. persicae*, il n'y a pas de différence avec WS au niveau de gènes marqueurs des OG (*WRKY40*, *CYP81F2*) (Denoux *et al.* 2008 ; Ferrari *et al.* 2013). Cette absence de variation d'expression est en corrélation avec l'augmentation de l'activité PG associée à l'infestation et non à la mutation *PME17*. Par ailleurs, de nombreux gènes (8) codant facteurs de transcription MYB sont sous-exprimés suite à l'infestation chez *pme17*, indiquant un retard dans les voies de signalisation des défenses. Toutefois, *MYB15* étant surexprimé chez *pme17* (4,6 fois), davantage que chez WS (3,9 fois), peut participer à la résistance contre *M. persicae* car le mutant KO *myb15* présente une susceptibilité vis-à-vis de *M. persicae* (Liu *et al.* 2010).

Le rôle de la PME3, dont le gène est exprimé au niveau des tubes criblés, dans la réduction de l'expression des gènes de défense de la plante, représente plutôt un facteur de résistance limitant l'ingestion de la sève élaborée par le puceron *M. persicae*. Si PME17 ne semble pas être impliquée dans la résistance à un bioagresseur, la PME3 représente néanmoins un facteur de susceptibilité à des pathogènes nécrotrophes (champignon *B. cinerea* et bactérie *Pectobacterium*

carotovorum). En effet, la croissance de ces pathogènes a été réduite sur des feuilles du mutant d'insertion *pme3* (collection Gabi-Kat), dont le DM était plus important que Col-0 (Raiola *et al.* 2011).

2.3.2. Comment PMEI4 peut-il constituer un facteur de susceptibilité à *M. persicae* ?

A court terme, les modifications du gène *PMEI4* contribuent-elles à des changements de la paroi végétale qui pourraient expliquer son effet bénéfique sur le comportement trophique de *M. persicae* ?

PMEI4 n'a pas d'effet sur les variations d'activité PME mais sur les variations de DM observées suite à une infestation aphidienne

Après une infestation de 24 h par *M. persicae*, l'activité PME augmente dans les feuilles de plants *pmei4* et 35S:PMEI4::GFP, de la même façon que dans les feuilles Col, quelque soit le type d'extraction réalisé (NaCl-pH 7 ; LiCl-pH 5). Le PMEI4 ne semble donc pas intervenir directement dans les changements d'activité PME liés à l'infestation. De la même façon, les analyses FT-IR ont montré que le contenu en liaisons methylesters ne semble pas être affecté significativement dans les feuilles infestées 35S:PMEI4::GFP, même s'il y en avait davantage dans les feuilles non infestées. Ceci suggère que l'infestation aphidienne provoque une augmentation du DM dans ces plants surexpresseurs, qui n'est pas décelée dans les plants sauvages. Par ailleurs, les feuilles *pmei4* infestées contiennent plus de liaisons glycosidiques (de 1083 à 1041 cm^{-1}) que celles non infestées, suggérant une teneur plus importante en polysaccharides dans les parois foliaires du mutant.

PMEI4 a un effet sur les variations d'activité PG observées suite à une infestation aphidienne

Suite à l'infestation par *M. persicae*, l'activité PG augmente de la même façon que l'activité PME dans les feuilles des plants transgéniques 35S:PMEI4::GFP, *pmei4* et sauvage Col. En effet, elle augmente fortement dans les feuilles Col et plus faiblement dans celles de 35S:PMEI4::GFP et *pmei4*.

PMEI4 n'a pas d'effet sur les variations du contenu en pectines observées suite à l'infestation aphidienne

En revanche, l'infestation par *M. persicae* n'engendre aucune variation significative de la teneur en monosaccharides dans les feuilles des mutants *pmei4* ou 35S:PMEI4::GFP par rapport aux plants transgéniques non infestés. Cependant, dans les feuilles Col, le contenu en ARA est plus important suite à l'infestation.

PMEI4 (et/ou les effets engendrés par son absence ou sa surexpression) change l'expression de gènes de défense en réponse à l'infestation aphidienne

Suite à l'infestation aphidienne l'expression du gène *PMEI4* mesurée par qRT-PCR baisse fortement dans les feuilles du surexpresseur alors que son expression est trop faible chez le sauvage Col. En revanche les données d'expression publiques indiquent une légère surexpression du gène chez Col suite à une infestation de 8 h par *M. persicae*. Déjà dans des plants non

infestés, nos résultats ont montré des différences d'expression de gènes entre les feuilles Col et les feuilles 35S:PMEI4::GFP, ce qui expliquerait la variation d'expression du gène *PMEI4*. Par ailleurs, le gène *PME17*, qui normalement est surexprimé chez Col après une infestation par *M. persicae* (x 5), apparaît ici sous-exprimé dans les feuilles de plants *pmei4* suite à l'infestation (x 4) et légèrement surexprimé dans celles 35S:PMEI4::GFP. Cet effet sur l'expression de *PME17* suggère que le PMEI4 interagit avec la PME17, sachant que des résultats complémentaires ont montré que dans des tests *in-vitro* l'inhibiteur régulerait l'activité de l'enzyme (communication personnelle de F. Sénéchal).
Après l'infestation par *M. persicae*, l'ensemble des gènes de défense sont moins exprimés chez *pmei4* par rapport à Col et encore moins chez 35S:PMEI4::GFP. Globalement, les gènes de la voie du JA (*LOX2*, *OPR1* et *PDF1.2*) semblent particulièrement affectés dans les feuilles infestées *pmei4* et 35S:PMEI4::GFP.

Le gène *PMEI4* semble donc impliqué dans la régulation du DM lors d'une infestation aphidienne et semble avoir une influence sur les voies hormonales SA et plus particulièrement la voie du JA. Comme la PME17 et la PME3, les rôles du PMEI4 ne sont pas vraiment directs mais plutôt indirects, en affectant par exemple des voies de défense. Il semblerait en fait que ce ne soit pas l'activité PME totale en elle-même qui modifie l'immunité de la plante mais plutôt les effets engendrés par ces variations d'activité, comme le patron de méthylestérification ou des perturbations de l'homéostasie hormonale (voie du JA, Bethke *et al.* 2013). Le rôle exact de PMEI4 reste encore à être déterminé pour expliquer davantage comment le PMEI4 peut être considéré comme un facteur de susceptibilité dans l'infestation par *M. persicae*. La PME17, la PME3 et le PMEI4 présentent des effets pléïotropiques, ne constituant qu'un maillon d'un réseau complexe. Ces effets se sont aussi manifestés par des variations d'acceptabilité par le puceron *M. persicae*, les mutations *PME17* et *PME3* étant respectivement néfaste et bénéfique pour son alimentation. Concernant le PMEI4, qui inhibe au moins la PME17, il était probable que l'acceptabilité de la plante par *M. persicae* soit la même qu'en l'absence de la PME17 (néfaste) mais de façon surprenante l'effet est opposé (bénéfique).
L'ensemble des résultats obtenus montre que l'acceptabilité de *M. persicae* diffère aussi entre les écotypes *A. thaliana* WS et Col, qui présentent des parois constitutivement différentes et des réponses différentes à l'infestation aphidienne.

3. Impact de la variation naturelle d'*A. thaliana* sur les feuilles

La faible activité PME observée dans les extraits enrichis en protéines pariétales des cellules foliaires de l'écotype Col par rapport à celles de WS (seulement suite à l'extraction NaCl-pH 7) suggère que le DM est plus important. Cependant les analyses de spectrométrie infra-rouge (FT-IR) n'ont pas permis de détecter une différence dans la teneur en liaisons methylesters entre les extraits de parois des plants WS et Col. Ceci pourrait être dû à la nature différente des extraits utilisés pour ces deux expériences. Tout comme l'activité PME, l'activité des PG, enzyme ayant une préférence pour les HG avec un faible DM (Limberg *et al.* 2000), est

plus faible chez Col, pouvant éventuellement ainsi modifier la porosité pectique (Baron-Epel *et al.* 1988).

Par ailleurs, des différences de teneur en monosaccharides ont été révélées entre les extraits de paroi Col et WS par HPAEC-PAD. Les cellules foliaires d'*A. thaliana* sont riches en polysaccharides pectiques, qui représentent jusqu'à 42 % du contenu total en polysaccharides, dont 23 % de HG (Zablackis *et al.* 1995). Le contenu en GalA, monosaccharide représentant environ 70 % des pectines (Mohnen 2008), est plus faible dans les feuilles Col que celles de WS. Cela suggère que les parois de cellules foliaires de Col contiennent moins de HG. L'augmentation du contenu en Fuc observée dans ces dernières pourrait être corrélée avec des modifications des chaînes latérales des RGII et/ou des xyluglucanes (XG). Enfin, l'augmentation du contenu en Ara dans les feuilles Col indique probablement une teneur plus importante en chaînes latérales des RGI (arabinanes) que dans les feuilles WS. Avec ces variations de contenu en HG et en chaînes latérales, la rhéologie de la paroi pourrait être différente entre les deux écotypes.

Les analyses transcriptomiques ont montré d'une façon plus générale que le gène *PR1* est constitutivement plus exprimé dans les broyats foliaires de l'écotype WS que dans ceux de Col. Cependant cette augmentation des transcrits *PR1* n'intervient pas dans les phénomènes de résistance des plants d'*A. thaliana* à *M. persicae* (Moran & Thompson 2001 ; Moran *et al.* 2002). Cette variation naturelle entre WS et Col a t-elle un effet sur les pucerons ?

4. Impact de la variation naturelle d'*A. thaliana* sur les interactions plante-puceron

Le comportement du puceron et plus particulièrement la composante trophique, peut être modifié par les défenses constitutives présentes chez une plante comme *A. thaliana* avec d'éventuelles différences de réponses entre les différents écotypes naturels. Les différences constitutives mises en évidence précédemment au niveau de la paroi végétale et des pectines pourraient modifier le comportement du puceron qui insère ses stylets au sein des parois primaires. De nombreuses variations anatomiques comme l'épaisseur de la cuticule ou la répartition des trichomes, entre écotypes sauvages d'*A. thaliana* (famille des Brassicaceae) ont déjà été mises en évidence (Rashotte *et al.* 1997 ; Mouille 2006 ; Passardi *et al.* 2007). D'autres variations métaboliques telles qu'une différence de teneur en glucosinolates peut négativement affecter les traits d'histoire de vie du puceron *Brevicoryne brassicae*, spécialiste de la famille des Brassicaceae, sans affecter ceux du puceron généraliste *M. persicae* (Kuśnierczyk *et al.* 2007). Cependant, dans tous les exemples répertoriés, aucune information n'a été apportée sur l'effet de la variation naturelle des plants d'*A. thaliana* l'acceptabilité alimentaire par les pucerons. En effet, dans les études des interactions plante-puceron, il est impératif de discerner expérimentalement les résistances d'antibiose et d'antixénose pour permettre de mieux appréhender les mécanismes qui régissent la virulence de l'un (puceron) et la défense de l'autre (plante).

4.1. Impact de la variation naturelle d'*A. thaliana* sur le comportement trophique et le développement de *M. persicae*

4.1.1. Résistance antixénose de l'écotype Col contre *M. persicae*

L'analyse du comportement trophique en utilisant la technique de l'EPG montre que les stylets de *M. persicae* passent globalement moins de temps au sein des tissus foliaires de Col que ceux de WS. De nombreuses différences entre les écotypes d'*A. thaliana* sauvages Col et WS au niveau de la surface des feuilles ont été mises en évidence, telles que des barrières chimiques (VOC) et/ou physiques (nombre/densité/structure/répartition des trichomes, épaisseur de la cuticule…) (Rashotte *et al.* 1997 ; Passardi *et al.* 2007). Ces structures chimiques et physiques peuvent être responsables de la faible durée totale d'insertion des stylets dans les feuilles des plants Col. Dans le mésophylle, les stylets de *M. persicae* mettent en moyenne plus de temps sur des feuilles Col que sur WS pour rechercher le phloème. Ce retard pour atteindre les tubes criblés suggère un rôle de la paroi végétale qui entrave la progression des stylets au sein de l'apoplasme. De même, la durée moyenne d'une phase de recherche ou d'une piqûre intracellulaire étant plus importante sur Col que WS, il est possible que des modifications chimiques ou structurales *in-situ* affectent l'extrémité des stylets traversant la membrane plasmique ou leur retrait de la cellule (Tjallingii 2006).

En plus des phases de recherche dans le mésophylle, les phases phloémiennes sont aussi modifiées entre les deux écotypes. Avant d'initier des phases d'ingestion de sève élaborée, *M. persicae* initie des périodes de salivations qui diffèrent d'un écotype à l'autre. La salivation liquide d'un puceron dans les tubes criblés est composée de salivations simples et fractionnées (respectivement non suivie ou suivie d'une ingestion de sève élaborée). Ces deux types de salivation, bien discernables sur des électropénétrogrammes, seraient produits par le puceron lors de l'entrée des stylets dans le phloème pour prévenir l'obstruction des tubes criblés ou du canal alimentaire du puceron par des protéines (callose, etc.) (Tjallingii 2006). Les durées de salivations totales et fractionnées plus longues pour les pucerons s'alimentant sur Col laissent envisager une capacité réduite de *M. persicae* pour supprimer les réponses de défense engagées au niveau du phloème de Col (Garzo *et al.* 2002).

M. persicae ingère moins de sève élaborée dans les tubes criblés de Col que ceux de WS. Des composés secondaires toxiques (glucosinolates, protéines phloémiennes, etc.) pourraient être présents en plus grande quantité dans la sève élaborée des plants Col. Par ailleurs, *M. persicae* initie davantage de phases d'ingestion de sève brute chez Col que chez WS. Cette ingestion de sève brute aqueuse et riche en minéraux dans les feuilles de Col permet à M. persicae de s'hydrater et compenser les fortes concentrations en métabolites présents dans le phloème. En effet, durant leur alimentation les pucerons peuvent être rapidement déshydratés si la concentration en molécules phloémiennes est trop importante. L'ingestion de sève brute permettrait alors de maintenir la balance hydrique de l'insecte et de réguler le potentiel osmotique de son hémolymphe (Spiller *et al.* 1990 ; Pompon *et al.* 2011).

De longues phases de recherche et de salivation et de courtes phases d'ingestion de sève élaborée sont des caractéristiques d'une résistance de type antixénose (non préférence alimentaire du puceron) de l'écotype *A. thaliana* Col vis-à-vis de *M. persicae*. Ces changements de comportement trophique observés à court terme sur ces deux écotypes ont-ils un impact sur le développement et la fécondité de *M. persicae* ?

4.1.2. Résistance antibiose de l'écotype Col contre *M. persicae*

Le développement et la fécondité de *M. persicae* sur *A. thaliana* sont dépendants de l'écotype. Même si aucune mortalité larvaire n'a été observée sur les deux écotypes *A. thaliana* Col et WS, les paramètres démographiques sont fortement modifiés sur Col après 3 semaines de suivi physiologique. Ces résultats démontrent que Col développe une résistance antibiose qui affecte significativement les traits d'histoire de vie de *M. persicae*. Même si une analyse à long terme (impact sur de nouvelles générations de pucerons) n'a pas été effectuée, il a été montré que dans certains cas l'antibiose peut résulter d'une limitation de la disponibilité en nutriments requis par le puceron (Pedigo 1998). Nos résultats confirment ceux de Kerchev et son équipe (2013) où il a été observé que, 15 jours après le dépôt de larves néonates de *M. persicae* sur les deux écotypes, la fécondité diminuait (40 %) sur Col-0 par rapport à WS-2. De plus, une résistance d'*A. thaliana* contre *M. persicae* a déjà été évaluée sur 82 écotypes différents, en comptant le nombre de larves produites par un adulte durant 24 h. Un coefficient de résistance a alors été calculé pour chaque écotype, WS-0 était considéré comme sensible alors que Col-0 n'était pas étudié (Cabrera y Poch *et al.* 1998).

Une sensibilité de l'écotype WS par rapport à Col vis-à-vis de différents organismes a déjà été mise en évidence : une croissance plus importante de la chenille *Spodoptera exigua*, de la bactérie biotrophe *P. syringae* et du champignon nécrotrophe *Plectosphaerella cucumerina* a été observée sur WS (Traw *et al.* 2003 ; Cipollini *et al.* 2004 ; Ahmad *et al.* 2011b). Cependant, aucune de ces études n'a mentionné une implication de la paroi végétale dans ces différences de sensibilité entre écotypes. En plus des différences constitutives observées précédemment entre les deux écotypes, des différences induites au niveau de la paroi des cellules foliaires par une infestation aphidienne pourraient aussi intervenir dans la préférence de *M. persicae* pour l'écotype WS.

4.2. Changements engendrés après une infestation par *M. persicae* sur les plants Col et WS

Après une infestation par 10 pucerons adultes *M. persicae* durant 24 h, l'activité PME au sein des feuilles Col est modifiée significativement dans les deux types d'extraits enrichis en protéines pariétales (LiCl-pH 5 et NaCl-pH 7) contrairement à WS (NaCl uniquement). L'augmentation d'activité PME observée dans les feuilles Col pourrait modifier l'élasticité pariétale et la disponibilité des HG aux enzymes dégradant les HG telles que les PG (Limberg *et al.* 2000 ; Peaucelle *et al.* 2008). Suite à l'infestation aphidienne, l'activité PG est significativement augmentée dans les feuilles Col et WS. Toutefois les PG pourraient être davantage actives sur les HG des pectines de Col que sur ceux de WS, puisqu'ils sont davantage déméthylés. De ce fait, des OG seraient produits en plus grande quantité, capables éventuellement d'activer des gènes de défense (Ferrari *et al.* 2013 ; Sénéchal *et al.* 2014b). D'après les résultats obtenus par qRT-PCR, les voies du SA et du JA sont induites dans les deux écotypes mais de façon plus importante dans les feuilles Col que WS. Le méthanol, co-produit de l'action des PME sur les HG, peut induire des gènes de défense comme *PR1* (Downie *et al.*

2004). La quantité plus importante de méthanol relâchée en même temps que l'activité PME plus importante dans les feuilles Col pourrait aussi contribuer à augmenter les défenses de la plante.

Les différences constitutives et induites mises en évidence entre les deux écotypes montrent que potentiellement la paroi végétale peut jouer un rôle dans les résistances antixénose et antibiose révélées contre *M. persicae*. Cette différence de sensibilité entre les deux écotypes WS et Col est-elle spécifique à *M. persicae* ? Des analyses EPG ont ainsi été réalisées sur deux autres espèces de puceron, une polyphage non habituée à s'alimenter sur *A. thaliana* (le petit puceron des céréales *Aphis fabae*) et une oligophage spécialiste de la famille des Brassicaceae (le puceron du chou *Brevicoryne brassicae*).

4.3. Impact de la variation naturelle d'*A. thaliana* sur le comportement trophique des pucerons *Brevicoryne brassicae* et *Aphis fabae*

Cette comparaison établie avec les deux autres espèces aphidiennes a mis en évidence d'importantes variations d'acceptation de la plante et de ses deux écotypes. Le temps important passé par le polyphage *A. fabae* avec les stylets hors de la plante et à saliver au sein des tubes criblés, ainsi que la très faible proportion de pucerons à ingérer de la sève élaborée, montrent un fort rejet d'*A. thaliana* WS. Même si ce puceron a une large gamme de plantes hôtes (200, Blackman & Eastop 2008), une forte résistance antixénose d'*A. thaliana* WS est observée contre *A. fabae*. En ce qui concerne l'oligophage *B. brassicae*, l'ingestion de sève élaborée est très réduite sur l'écotype WS par rapport à Col. Ceci traduit un fort rejet de WS, qui pourrait être relié à la composition spécifique de la sève élaborée ou à un problème d'accès à celle-ci.
Le polyphage *M. persicae* semble être l'espèce possédant les meilleures performances sur les deux écotypes sauvages étudiés (en terme d'ingestion de sève élaborée), alors que l'oligophage *B. brassicae* a montré un fort rejet de l'écotype WS. Ce n'est cependant pas une résistance antixénose car les phases de salivation ou de recherche des tubes criblés ne sont pas affectés.
Les résultats issus de cette étude complémentaire montrent que le généraliste *M. persicae* semble avoir de meilleures performances que le spécialiste *B. brassicae* pour se développer sur les deux écotypes *A. thaliana* WS et Col. Lorsque de expérimentations nécessitent l'utilisation de plusieurs écotypes sauvages d'une plante, il est donc important de choisir une espèce de puceron capable de s'alimenter correctement sur ces derniers.

Chapitre 5. Conclusion et perspectives

Dans leur environnement naturel, les plantes sont continuellement confrontées à des stress biotiques, incluant notamment des brouteurs, des micro-organismes et des insectes herbivores. Elles se défendent alors en utilisant des mécanismes de résistance constitutifs et induits (Smith & Clement 2012). La résistance constitutive contre les herbivores est représentée par des barrières physiques préexistantes (trichomes, épines, cuticule, paroi végétale) et la présence de composés chimiques volatiles (*β*-farnésène, etc.) ou de composés allélochimiques pouvant avoir un effet toxique, répulsif ou anti-appétant (glucosinolates, alcaloïdes, lectines, phytoalexines constitutives, etc.). Les pucerons, insectes phloémophages et ravageurs des cultures, sont plus ou moins affectés par ces différents éléments, en fonction des mécanismes d'adaptation évolutive qu'il a développé au préalable. En effet, des pucerons généralistes se développant sur une large gamme de plantes hôtes (polyphages), comme le puceron du pêcher *Myzus persicae* s'alimentant sur plus de 400 espèces (Blackman & Eastop 2000), sont capables de tolérer de grandes variations de la morphologie de la plante et de la composition de sa sève phloémienne. A l'inverse, des pucerons spécialistes d'une famille (oligophages) ou d'une espèce (monophages) peuvent être plus sensibles à des variations de ces paramètres mais ont aussi parfois développé des mécanismes pour s'adapter spécifiquement à leur(s) plante(s) hôte(s). Le puceron du chou *Brevicoryne brassicae*, spécialiste de la famille des Brassicaceae dont l'espèce *A. thaliana*, a par exemple développé un mécanisme lui permettant de tolérer et même de tirer profit des glucosinolates, composés présents spécifiquement dans les feuilles et le phloème des plantes de l'ordre des *Brassicales* (Francis *et al*. 2002). En effet, lorsqu'un individu est attaqué par un prédateur comme une coccinelle, il peut dégrader, grâce à une enzyme qu'il a spécialement développée (myrosinase), des glucosinolates qu'il aura préalablement accumulés dans son corps au niveau de cellules spécialisées. Les isothiocyanates formés étant toxiques pour les pucerons (Kazana *et al*. 2007 ; Kim & Jander 2007), ils vont alors alerter les autres individus de la présence du prédateur. Les équipements spécifiques développés par un puceron vont donc lui conférer un certain degré d'acceptabilité d'une plante, qui peut être estimé en étudiant son comportement trophique par électropénétrographie (EPG).

Les résultats issus de l'EPG ont montré que le polyphage *M. persicae* accepte davantage la variation naturelle observée entre deux écotypes d'*A. thaliana* (WS et Col) que le spécialiste *B. brassicae* sensé être davantage adapté à cette espèce. En effet, ce dernier montre un rejet de l'écotype WS, en ne s'y alimentant que très peu. Cette capacité que possède *B. brassicae* à distinguer deux écotypes de cette espèce modèle fréquemment utilisée pour étudier l'interaction plante-puceron doit donc être prise en compte lorsqu'il s'agit par exemple d'étudier l'effet de mutations de gènes sur l'interaction *A. thaliana-B. brassicae*. La préférence de cette espèce de puceron pour l'écotype Col ne semble pas faire intervenir les glucosinolates, puisque la littérature a montré que Col en possède deux fois plus que WS (Cipollini *et al*. 2004).

L'étude menée sur ces deux espèces de pucerons laisse donc percevoir des perspectives intéressantes quant à la découverte de cette différence d'acceptation, qui pourrait provenir par exemple d'un effet plus toxique pour *B. brassicae* que pour *M. persicae* d'autres métabolites secondaires comme la camalexine, ou encore d'une teneur trop importante en sucrose pouvant

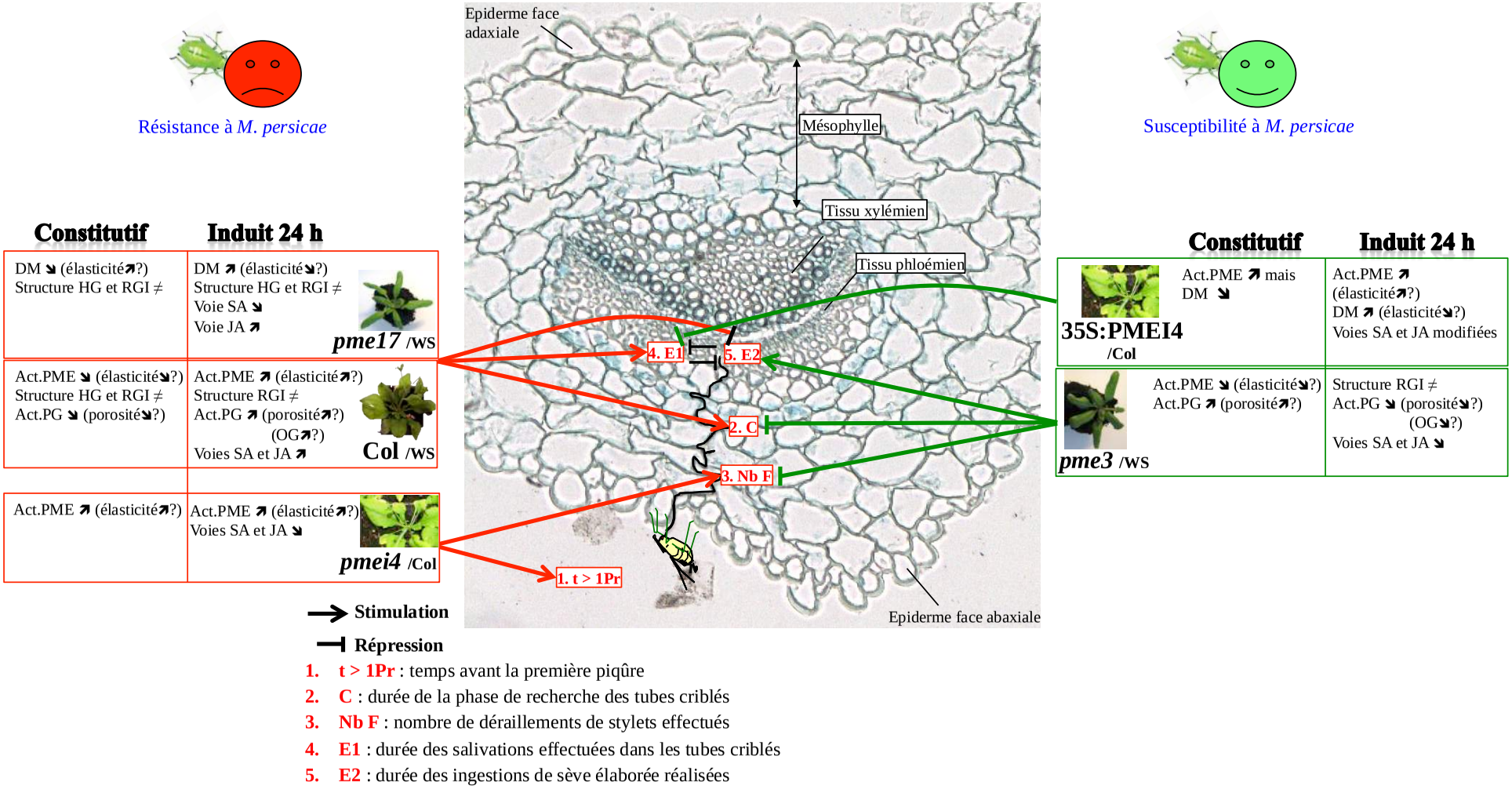


Figure 72 Synthèse des éléments intervenant dans l'acceptation des deux écotypes *A. thaliana* WS et Col et des plants mutants ou surexpresseurs étudiés.

Photographie d'une coupe transversale (10 µm) d'une feuille d'*A. thaliana* (PME3 :GUS) montrant les stylets d'un puceron *M. persicae* schématisés par un trait noir passant dans entre les cellules au sein des parois. Les différentes plantes utilisées dans le projet de thèse montrent soit un effet néfaste sur son comportement alimentaire (gauche de la photo, en rouge), soit un effet bénéfique (droite de la photo, en vert). Pour chaque plante, les résultats principaux sont indiqués (par comparaison avec l'écotype sauvage respectif), au niveau constitutif (caractéristiques des plants sans infestation) ou induit (après infestation par 10 ou 60 pucerons pendant 24 h). Ces deux niveaux d'étude peuvent donc participer aux effets observés sur le comportement trophique de *M. persicae*. Photographie réalisée par F. Fournet.

aboutir à une importante pression osmotique dans l'hémolymphe (Kettles *et* al. 2013 ; Zhang *et al*. 2011). La teneur en métabolites secondaires peut être par exemple mesurée par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et spectrométrie de masse. De plus, en complément de cette étude du comportement trophique de *B. brassicae*, une étude de sa physiologie nous permettrait de détecter un éventuel effet à plus long terme de cette différence d'acceptabilité, en estimant ses paramètres démographiques sur WS où il ingère très peu de sève élaborée. Enfin, des différences de structure pariétale entre les deux écotypes pourraient être différemment tolérées par le puceron oligophage.

En dehors de son rôle de barrière physique constitutive, la paroi constitue aussi une importante composante sensorielle pour l'activation de défenses de la plante contre les pucerons (Walling 2009). Ces derniers libèrent des éliciteurs (exogènes) lors des sécrétions de salives solide et liquide dans l'apoplasme ou dans les cellules végétales (Harmel *et al* 2008 ; Harmel 2010), comme des protéases ou des pectinases (PME et PG), dont les produits peuvent être reconnus au niveau de la membrane cellulaire. Conjointement avec les éliciteurs endogènes (OG) produits par la plante suite à la perception des dommages associés à l'infestation aphidienne, la résistance basale de la plante va être déclenchée au niveau de la paroi suite à leur reconnaissance par des récepteurs spécifiques (par exemple WAK1) (Ferrari *et al*. 2013). En contrôlant l'intégrité de sa paroi, faisant intervenir notamment les pectines (Wolf *et al*. 2011), la cellule végétale peut alors rapidement activer des voies de défense pour limiter la progression des stylets et leurs dommages. Le temps de mise en place de modifications pariétales de la plante suite à une infestation aphidienne peut être assez rapide, un gène codant une protéine de structure et de signalisation (AGP) ayant déjà été surexprimé suite à une infestation de 2 h par *M. persicae* (Couldridge *et al.* 2007). Concernant les pectines, des transcrits PME, PG et PLL sont induits dès 6 h d'infestation par *M. persicae* (Kusnierczyk *et al*. 2008).

L'approche multidisciplinaire adoptée pour appréhender l'implication de la paroi dans la résistance de l'écotype Col à *M. persicae* nous a aussi permis de mieux comprendre le rôle des PME dans l'interaction *A. thaliana-M. persicae*, en étudiant à la fois la biologie du puceron sur les mutants *pme17* et *pme3* et le rôle des PME végétales dans l'interaction plante mutante-puceron. Les analyses portées sur le comportement trophique du puceron ont montré que la PME17 est une PME plutôt bénéfique pour le puceron (résistance antixénose du mutant *pme17* impliquant des phases de recherche des tubes criblés et de salivation plus longues et une phase d'ingestion de sève élaborée plus courte), contrairement à la PME3 (effet bénéfique du mutant *pme3* par une meilleure ingestion de sève élaborée, une phase de recherche plus courte et moins de déraillements de stylets engagés) (**Figure 72**). Dans quelles mesures les PME et les pectines peuvent-elles être impliquées dans ces changements d'acceptabilité de la plante ?
Au niveau constitutif, en dehors d'un possible changement de DM des parois des cellules foliaires ***pme17*** (**Figure 72**), les résultats issus des puces à ADN montrent une intervention de régulateurs physiologiques impliqués dans la défense. En effet, de façon constitutive de nombreux gènes codant des facteurs de transcription et des calmodulines intervenant dans la signalisation des défenses sont surexprimés. De plus, les extensines ou les AGP montrent plutôt un relâchement pariétal. Cependant, les défenses induites par une infestation aphidienne montrent une forte implication de la structure de la paroi (PG, PL, EXT, expansines et AGP

suggérant une rigidification) et une contribution accrue des facteurs physiologiques de défense (voie du JA activée et celle du SA inhibée, facteurs de transcription MYB sous-exprimés). Contrairement à ce qui a été observé sur *pme17*, le comportement trophique de *M. persicae* est affecté de façon positive sur *pme3* et cette susceptibilité du mutant pourrait faire intervenir de façon constitutive une paroi moins élastique et plus poreuse et de façon induite une faible production d'OG et des voies hormonales moins induites (**Figure 72**). L'absence de cette PME phloémienne (et les effets engendrés par son absence) semble donc limiter l'ingestion de sève élaborée. En dehors d'un rôle direct sur la rigidification et les modifications de la structure de la paroi qui pourraient gêner les stylets pour accéder aux tubes criblés, la PME3 pourrait par exemple favoriser de façon indirecte le transport vers les tubes criblés de composés phloémiens néfastes pour le puceron. Une analyse de la sève élaborée (par stylectomie) pourrait nous renseigner sur la composition de la sève élaborée dans les feuilles *pme3*.

Par ailleurs, l'étude du PMEI4 suggère qu'une régulation des PME peut engendrer des modifications pariétales ayant un effet (bénéfique) sur le comportement trophique du puceron. Seules des modifications d'activité PME voire du DM dans les feuilles pmei4 et 35S:PMEI4::GFP semblent être observées au niveau constitutif et induit, avec aussi des perturbations de l'homéostasie hormonale (voie SA et JA). L'étude d'autres PMEI, notamment PMEI1 et PMEI2 pourrait peut-être aboutir plutôt à une résistance contre *M. persicae*, puisqu'ils augmentent la résistance aux pathogènes (Raiola *et al*. 2011).

L'ensemble de nos résultats suggère donc une nouvelle fonction des PME et de leur inhibition par les PMEI, probablement en participant directement au niveau moléculaire à la modulation du degré de résistance/susceptibilité d'une plante aux pucerons. Afin d'en savoir plus sur l'interaction des PME avec les autres protéines pariétales ou avec les polysaccharides, il serait intéressant de suivre la méthode proposée par Albenne *et al.* (2013). Suite à une extraction des protéines pariétales et une séparation par chromatographie ou par électrophorèse 1D ou 2D et une digestion à la trypsine, une analyse du contenu pariétal par MALDI-TOF MS, LC MS/MS peut permettre d'identifier précisément les protéines du contenu, prédire leur domaine fonctionnel… L'Unité de recherche BIOPI a déjà initié ce travail d'identification des protéines présentes dans des extraits de protéines pariétales de racines ou d'hypocotyles par spectrométrie de masse avec la plateforme de l'UPJV Ingénierie cellulaire & analyses des protéines (ICAP). Ces analyses ont par exemple montré que dans des extraits de protéines pariétales (LiCl 1M pH 5) de racines d'*A. thaliana* Col, la PME3, PME17, ainsi qu'une PG, un PGIP et 4 SBT sont présentes. Il serait intéressant de réaliser ce travail sur des feuilles de 3 semaines infestées ou non par des pucerons afin d'estimer la présence/absence des protéines et les interactions possibles entre celles-ci. Un témoin négatif pourrait aussi être utilisé en réalisant des piqûres physiques (aiguille) sur les feuilles. Ce travail pourrait aussi être réalisé sur des plantes d'intérêt économique comme la pomme de terre, des PME de *Solanum tuberosum* pouvant être impliquées dans des stress biotiques comme les pucerons. Même si l'implication des pectines dans la réponse au stress aphidien n'a pas encore été abordée sur cette espèce végétale, leur implication dans la réponse à un stress bactérien a déjà été constatée. En effet une variété résistante de *Solanum tuberosum* (ADG) à la bactérie *Pectobacterium carotovorum* contient des pectines avec un plus haut DM qu'une variété sensible (Bintje, Marty *et al.* 1997). Par ailleurs, il

aurait été intéressant d'estimer le DM dans nos échantillons, soit par dosage colorimétrique, par utilisation d'anticorps anti-pectine, les Ac JIM5 et JIM7 détectant respectivement les HG faiblement ou hautement méthylestérifiés (Willats *et al.* 2001b) ou par Résonance Magnétique Nucléaire, en partant d'une extraction spécifique des pectines.

Nos résultats montrent aussi un impact de la variation naturelle d'*A. thaliana* sur les interactions avec les *M. persicae* et *B. brassicae*. En effet, les individus s'alimentant sur l'écotype Col présentent plus de difficulté à faire progresser leurs stylets dans l'apoplasme des cellules mésophylliennes avant d'atteindre les tubes criblés, ainsi qu'une salivation phloémienne plus importantes et une ingestion de sève élaborée réduite par rapport à WS (**Figure 72**). Cela suggère que malgré sa plus grande capacité à tolérer (en terme d'ingestion de sève élaborée) les deux écotypes d'*A. thaliana* étudiés, *M. persicae* présente, contrairement à *B. brassicae*, une préférence alimentaire pour l'écotype WS (résistance antixénose de Col). Cette préférence pour WS a aussi été confirmée au niveau de sa physiologie, sa fécondité journalière étant significativement améliorés sur cet écotype (résistance antibiose de Col). Les résultats portant sur l'étude de l'interaction *A. thaliana- M. persicae* nous ont permis de supposer que la paroi végétale peut être impliquée dans la résistance de l'écotype Col observée contre *M. persicae*.
En effet, les pectines et plus particulièrement les enzymes modifiant les homogalacturonanes (HGME) semblent impliquées dans les défenses mises en place, aussi bien au niveau constitutif qu'au niveau induit (10 adultes *M. persicae* pendant 24 h) (**Figure 72**). Les PME et les PG semblent intervenir dans la résistance antixénose observée sur l'écotype Col contre *M. persicae*, de façon directe ou indirecte, en pouvant modifier la structure de la paroi ou produire des OG. Au niveau constitutif la résistance est plutôt liée à des changements au niveau de la structure de la paroi (élasticité et porosité pariétale), alors que la résistance induite par l'infestation aphidienne semble davantage due à des défenses plus importantes (OG, voies hormonales du JA). Une faible activité PME (haut DM) et une faible activité PG pourraient engendrer au niveau des parois foliaires de l'écotype Col respectivement une faible élasticité et une faible porosité du réseau pectique, contribuant à une certaine rigidification pariétale. A l'inverse, les défenses induites auraient plutôt tendance à faire augmenter l'élasticité et la porosité. En parallèle de ces modifications affectant les HG, les résultats ont mis en évidence des modifications pouvant aussi changer la structure de la paroi, grâce à des variations de structure d'un autre domaine pectique, le rhamnogalacturonane I (RGI). En effet, la quantité et la nature des chaînes latérales des RGI (arabinanes, galactanes, arabinogalactanes) peut modifier la rigidité et la porosité pariétales en contrôlant l'abondance des liaisons effectuées avec d'autres polysaccharides comme les xyloglucanes (XG, rigidification, Thompson *et al.* 2000) ou avec des protéines structurales comme les extensines (EXT, rigidification, Qi *et al.* 1995) ou les arabinogalactanes protéines (AGP, relâchement, Lamport & Kieliszewski 2005). Des changements de rigidification par des liaisons des RGI avec les XG sont supposés chez Col aussi bien au niveau constitutif qu'induit. En dehors de ces modifications de structure, parmi les défenses induites par l'infestation aphidienne, une forte activité des PG permettrait une plus forte production d'OG potentiellement éliciteurs chez Col. S'ils ont des DM, des degrès d'acétylation et de polymérisation adéquats, ils peuvent conduire notamment à la production de protéines de défense par la surexpression de certains gènes de défense. Les analyses d'expression de gènes ont d'ailleurs montré que les voies du SA et surtout du JA étaient davantage activées chez Col que chez WS, peut-être en lien avec

les OG. Afin d'estimer la part des défenses activées par les OG, il aurait été intéressant d'étudier l'expression des transcrits de quelques gènes spécifiquement activés par ces derniers, comme les gènes *PAL*, *PAD3*, *CYP81F2* ou *WRKY40* (Ferrari *et al*. 2013).

En dehors de l'étude des défenses de la plante face à une infestation aphidienne, de plus en plus d'études sont menées afin d'en savoir plus sur l'arsenal dont dispose un puceron pour interagir avec la plante (Hogenhout & Bos 2011 ; Carolan *et al*. 2011 ; Bos *et al* 2010). Le développement récent des approches d'inactivation de gènes (par ARN interférence) du puceron pourrait désormais faciliter l'identification et la caractérisation de nouveaux effecteurs (permettant de contourner les défenses de la plante) ou éliciteurs de défense de la plante et d'évaluer la fonction de certains gènes de *M. persicae* impliqués dans l'interaction (Louis *et al*. 2013), notamment les PG et PME dont l'activité a déjà été détectée dans sa salive au laboratoire (Cherqui & Tjallingii 2000). En effet il serait intéressant de pouvoir mesurer l'impact de ces enzymes sécrétées par le puceron sur la paroi de la plante. En dehors d'une éventuelle production d'OG, les PG et PME salivaires peuvent contribuer à des changements d'élasticité et de rigidité de la paroi. Lors des phases de salivation et d'ingestion de sève élaborée, le puceron peut aussi transmettre des virus phytopathogènes dans les tissus végétaux. De plus, les PME végétales, en plus de représenter un facteur de susceptibilité, par leur fixation à la protéine de mouvement (MP) du Tobacco Mosaic Virus TMV (Chen *et al.* 2000), pourraient être indirectement impliquées (tout comme les PMEI) dans des changements de propriétés rhéologiques de la paroi qui seraient néfastes pour la transmission de cellule à cellule. L'étude de la transmission de virus chez les deux écotypes WS et Col mais aussi chez *pme17* ou 35S:PMEI4::GFP (où les phases de salivations de *M. persicae* sont modifiées) laisse envisager des perspectives intéressantes au niveau de l'implication de la paroi dans la propagation des virus.

Au niveau des perspectives à court terme, nous savons que l'état de la paroi, rigide ou relâché, influence l'acceptabilité d'une plante par le puceron. Des études menées par microscopie à force atomique (AFM) pourraient par exemple être envisagées en collaboration avec l'INRA de Versailles, afin de tester d'éventuelles variations de rigidités. Les résultats obtenus, notamment sur *pme17*, suggèrent des modifications de l'ensemble des composés pariétaux lors d'une infestation aphidienne. Des études de cytologie pourraient être envisagées, avec des Ac spécifiques à chaque composé (PME, AGP, etc.). Par ailleurs, il faut vérifier les données obtenues par l'expérimentation des puces à ADN par qRT-PCR, en vérifiant l'expression des 10 gènes les plus induits nous intéressant.
Les analyses de la composition en monosaccharides de la paroi végétale réalisées par HPAEC-PAD ont permis de mettre en évidence des différences au niveau du contenu en sucres neutres ou acides. Une troisième répétition biologique aurait pu permettre d'affiner les variations mises en évidence, surtout lorsque les résultats montraient de grandes variations entre les deux répétitions effectuées. De plus afin de valider nos hypothèses émises quant à l'origine des monosaccharides étudiés, il serait intéressant d'effectuer une dérivatisation de ces derniers (*i.e*. rendre volatiles les composés en leur fixant un groupement méthyle).

En plus des analyses effectuées à court terme (8 h) et à moyen terme par l'étude des paramètres démographiques au sein d'une génération de pucerons, des analyses à long terme,

pour étudier l'impact d'un écotype ou de modifications d'un gène sur plusieurs générations, pourraient être envisagées. A plus long terme, il serait aussi intéressant de travailler sur d'autres mutants *pme17*, *pme3* et *pmei4* et sur-expresseurs 35S:PMEI4::GFP. Puisque les résultats ont montré un effet pléïotropique des PME, non limité à la paroi et aux défenses, il conviendrait d'exploiter plus en détail la base de données fournie. Notamment les puces à ADN PME17 et voire en réaliser aussi pour PME3 dans les mêmes conditions. D'un point de vue fondamental, ceci permettrait d'utiliser ces données pour faire apparaître des voies physiologiques de la plante en lien avec l'état de la paroi, état influencé par les conditions environnementales telles qu'une infestation aphidienne. Du point de vue appliqué, en l'état, ces travaux ne permettent pas d'envisager une application directe. En revanche, ils permettent de dévoiler de nouvelles pistes. Par exemple, la base de données peut constituer le point de départ de collaborations avec des équipes travaillant sur la propagation virale, puisqu'il a été montré que la mutation d'une PME engendre un retard de cette propagation.

A. thaliana est utilisée depuis une dizaine d'années pour étudier les interactions avec les insectes phloémophages. L'interaction compatible entre *A. thaliana* et *M. persicae* a apporté de nouvelles perspectives concernant les aspects moléculaires et biochimiques et génétiques qui contribuent à contrôler la sévérité de l'infestation. La paroi représente une des premières lignes de défense de la plante contre l'infestation aphidienne, après une possible émission de VOC. Les études portées sur les réponses de défense de la plante déclenchée par la paroi végétale et les pectine méthylestérases peuvent donc offrir des outils permettant de promouvoir les techniques de résistance aux insectes phloémophages ravageurs des cultures et aux éventuels phytovirus qu'ils transportent, notamment dans le cadre de la méthode de stimulation des défenses naturelles de la plante.

Références bibliographiques

Adams JB, McAllan JW. **1956**. Pectinase in the saliva of *Myzus persicae* (Sulz.) (Homoptera: Aphididae). *Canadian Journal of Zoology* **34**: 541–543.

Adie B, Chico JM, Rubio-Somoza I, Solano R. **2007**. Modulation of Plant Defenses by Ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**: 160–177.

Adio AM, Casteel CL, De Vos M, Kim JH, Joshi V, Li B, Juéry C, Daron J, Kliebenstein DJ, Jander G. 2011. Biosynthesis and defensive function of Nδ-acetylornithine, a jasmonate-induced Arabidopsis metabolite. *The Plant Cell* **23**: 3303–3318.

Ahmad S, Van Hulten M, Martin J, Pieterse CMJ, van Wees SCM, Ton J. **2011**. Genetic dissection of basal defence responsiveness in accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* **34**: 1191–1206.

Ahmad S, Veyrat N, Gordon-Weeks R, et al. 2011b. Benzoxazinoid metabolites regulate innate immunity against aphids and fungi in maize. *Plant Physiology* **157**: 317–327.

Ahuja I, Kissen R, Bones AM. **2012**. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* **17**: 73–90.

Albenne C, Canut H, Jamet E. **2013**. Plant cell wall proteomics: the leadership of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **4**: 111.

Albenne C, Canut H, Boudart G, Zhang Y, San Clemente H, Pont-Lezica R, Jamet E. **2009**. Plant cell wall proteomics: mass spectrometry data, a trove for research on protein structure/function relationships. *Molecular Plant* **2**: 977–989.

Albersheim P, Anderson AJ. **1971**. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**: 1–5.

Albersheim P, Darvill AG, O'Neill MA, Schols HA, Voragen AGJ. **1996**. An hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants.Visser J, Voragen AGJ eds. Progress in Biotechnology 14: Pectins and Pectinases. Elsevier, 47–55.

Alexandersson E, Becker J, Jacobson D, Nguema-Ona E, Steyn C, Denby K, Vivier M. **2011**. Constitutive expression of a grapevine polygalacturonase-inhibiting protein affects gene expression and cell wall properties in uninfected tobacco. *BMC Research Notes* **4**: 493.

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, *et al.* 2003a. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science Signaling* **301**: 653–656.

Alonso JS, Canet W, Howell N, Alique R. **2003b**. Purification and characterisation of carrot (*Daucus carota* L) pectinesterase. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**: 1600–1606.

Alonso-Blanco C, Koornneef M. **2000**. Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends in Plant Science* **5**: 22–29.

Altenbach D, Robatzek S. **2007**. Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 1031–1039.

Alvarez ME. **2000**. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance - Springer. *Plant Molecular Biology* **44**: 429–442.

Alvarez AE, Tjallingii WF, Garzo E, Vleeshouwers V, Dicke M, Vosman B. 2006. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing Solanum species to the aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **121**: 145–157.

An SH, Sohn KH, Choi HW, Hwang IS, Lee SC, Hwang BK. **2008**. Pepper pectin methylesterase inhibitor protein CaPMEI1 is required for antifungal activity, basal disease resistance and abiotic stress tolerance. *Planta* **228**: 61–78.

Anderson C, Wagner T, Perret M, He Z, He D, Kohorn B. **2001**. WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Molecular Biology* **47**: 197–206.

Antosiewicz DM, Purugganan MM, Polisensky DH, Braam J. **1997**. Cellular localization of Arabidopsis xyloglucan endotransglycosylase-related proteins during development and after wind stimulation. *Plant Physiology* **115**: 1319–1328.

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

Arias CR, Burns JK. **2002**. A pectinmethylesterase gene associated with a heat-stable extract from Citrus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 3465–3472.

Asai S, Yoshioka H. **2009**. Nitric Oxide as a Partner of Reactive Oxygen Species Participates in Disease Resistance to Necrotrophic Pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 619–629.

Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. **2002**. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**: 977–983.

Atmodjo MA, Hao Z, Mohnen D. **2013**. Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 747–779.

Auclair JL. **1963**. Aphid feeding and nutrition. *Annual Review of Entomology* **8**: 439–490.

Baebler Š, Krecic Stres H, Rotter A, Kogovsek P, Cankar K, Kok EJ, Gruden K, Kovac M, ŽEL J, Pompe Novak M. **2009**. PVYNTN elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Molecular Plant Pathology* **10**: 263–275.

Baldwin L, Domon JM, Klimek JF, Fournet F, Sellier H, Gillet F, Pelloux J, I L-H, Carpita N, Rayon C. 2014. Structural alteration of cell wall pectins acompanies pea development in response to cold. *Phytochemistry* **104**: 37-47.

Balestrieri C, castaldo D, Giovane A, Quagliuolo L, Servillo L. **1990**. A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *Physiologia Plantarum* **193**: 183–187.

Banoub JH, Hodder HJ. **1985**. Structural investigation of the lipopolysaccharide core isolated from a virulent strain of *Vibrio ordalii*. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* **63**: 1199–1205.

Barah P, Winge P, Kuśnierczyk A, Tran DH, Bones AM. 2013. Molecular signatures in Ar*abidopsis thaliana* in response to insect attack and bacterial infection. PLoS ONE **8**: e58987.

Baron-Epel O, Gharyal PK, Schindler M. **1988**. Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* **175**: 389–395.

Beale MH, Birkett MA, Bruce TJA, Chamberlain K, Field LM, Huttly AK, Martin JL, Parker R, Phillips AL, Pickett JA, *et al.* 2006. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 10509–10513.

Bechinger C. **1999**. Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science Signaling* **285**: 1896–1899.

Beckman CH. 1971. The plasticizing of plant cell walls and tylose formation—a model. *Physiological Plant Pathology* **1**: 1–10.

Beldman G, Mutter M, Searle-van Leeuwen MJF, van den Broek LAM, Schols HA, Voragen AGJ. **1996**. New enzymes active towards pectic structures. Progress in biotechnology: Pectins and Pectinases. Elsevier, 231–245.

Belefant-Miller H, Porter D, Pierce M, Mort A. **1994**. An early indicator of resistance in barley to Russian wheat aphid. *Plant Physiology* **105**: 1289–1294.

Bellincampi D, Camardella L, Delcour JA, Desseaux V, D'Ovidio R, Durand A, Elliot G, Gebruers K, Giovane A, Juge N. **2004**. Potential physiological role of plant glycosidase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1696**: 265–274.

Beneteau J, Renard D, Marche L, Douville E, Lavenant L, Rahbe Y, Dupont D, Vilaine F, Dinant S. **2010**. Binding properties of the *N*-acetylglucosamine and high-mannose *N*-glycan PP2-A1 phloem lectin in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **153**: 1345–1361.

Benjamini Y, Hochberg Y. **1995**. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society*. **57**: 289–300.

Bernays EA, Chapman RF. **1994**. Host-Plant Selection by Phytophagous Insects. New York NY: Chapman & Hall.

Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R. **2002**. Constitutive expression of *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal* **29**: 23–32.

Bethke G, Grundman RE, Sreekanta S, Truman W, Katagiri F, Glazebrook J. 2014. *Arabidopsis* PECTIN METHYLESTERASES contribute to immunity against *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology* **164**: 1093-1107

Blackman RL, Eastop VF. **1984**. *Aphids on the world's crops. An identification and information guide.* (J Wiley and Sons, Eds.). Chichester: John Wiley & Sons.

Blackman RL, Eastop VF. **2000**. *Aphids on the world's crops* (J Wiley and Sons, Eds.). Chichester: John Wiley & Sons.

Blackman RL, Eastop VF. 2008. Aphids on the world's herbaceous plants and shrubs (J Wiley and Sons, Eds.). Chichester: The Natural History Museum.

Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* **54**: 484–489.

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.

Bolwell G, Bindschedler L, Blee K, Butt V, Davies D, Gardner S, Gerrish C, Minibayeva F. **2002**. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1367–1376.

Bolwell GP, Wojtaszek P. **1997**. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence–a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**: 347–366.

Bones AM, Rossiter JT. **1996**. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum* **97**: 194–208.

Bonnemain J-L. **2010**. Aphids as biological models and agricultural pests. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 461–463.

Bonnin E, Le Goff A, Körner R, Vigouroux J, Roepstorff P, Thibault JF. 2002. Hydrolysis of pectins with different degrees and patterns of methylation by the endopolygalacturonase of Fusarium moniliforme. *Biochimica et Biophysica Acta* **1596**: 83–94.

Bonnin E, Garnier C, Ralet M-C. **2013**. Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: applications and impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Bordenave M, Breton C, Goldberg R, Huet JC, Pérez S, Pernollet JC. **1996**. Pectinmethylesterase isoforms from *Vigna radiata* hypocotyl cell walls: kinetic properties and molecular cloning of a cDNA encoding the most alkaline isoform. *Plant Molecular Biology* **31**: 1039–1049.

Bos JIB, Prince D, Pitino M, Maffei ME, Win J, Hogenhout SA. **2010**. A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (Green peach aphid). *PLoS Genetics* **6**: e1001216.

Boyko E, Smith C, Thara V, Bruno J, Deng Y, Starkey S, Klaahsen D. **2006**. Molecular basis of plant gene expression during aphid invasion: wheat Pto-and Pti-like sequences are involved in interactions between wheat and Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* **99**: 1430–1445.

Braccini I, Pérez S. 2001. Molecular basis of Ca^{2+}-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules* **2**: 1089–1096.

Brault V, Uzest M, Monsion B, Jacquot E, Blanc S. **2010**. Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 524–538.

Braybrook S, Hofte H. 2012. Probing the mechanical contributions of the pectin matrix: Insights for cell growth. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 0–1.

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

Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW. **1995**. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology* **108**: 1353–1358.

Browse J. 2009. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 183–205**.**

Bugbee WM. **1993**. A pectin lyase inhibitor protein from cell walls of sugar beet. *Physiologia Plantarum* **83**: 63–67.

Burow M, Losansky A, Müller R, Plock A, Kliebenstein DJ, Wittstock U. 2009. The genetic basis of constitutive and herbivore-induced ESP-independent nitrile formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **149**: 561–574**.**

Buttner D, He SY. 2009. Type III rotein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology* **150**: 1656–1664.

Cabrera y Poch HL, Ponz F, Fereres A. **1998**. Searching for resistance in *Arabidopsis thaliana* to the green peach aphid M*yzus persicae*. *Plant Science* **138**: 209–216.

Cabrera JC, Boland A, Messiaen J, Cambier P, van Cutsem P. **2008**. Egg box conformation of oligogalacturonides: the time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiology* **18**: 473–482.

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

Cai X. **2006**. Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2563–2569.

Caillaud MC, Via S. 2000. Specialized feeding behavior influences both ecological specialization and assortative mating in sympatric host races of Pea aphids. *The American Society of Naturalists* **156**: 606–621.

Camardella L, Carratore V, Ciardiello MA, Servillo L, Balestrieri C, Giovane A. **2000**. Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase amino-acid sequence and structural importance of two disulfide bridges. *European Journal of Biochemistry* **267**: 4561–4565.

Campbell BC, Dreyer DL. 1985. Host-plant resistance of sorghum: Differential hydrolysis of sorghum pectic substances by polysaccharases of greenbug biotypes (*Schizaphis graminum*, homoptera: Aphididae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **2**: 203–215.

Cannon MC, Terneus K, Hall Q, Tan L, Wang Y, Wegenhart BL, Chen L, Lamport DTA, Chen Y, Kieliszewski MJ. **2008**. Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 2226–2231.

Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S, AmiGO Hub, Web Presence Working Group. **2009**. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **25**: 288–289.

Carlini CR, Grossi-de-Sá MF. **2002**. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **40**: 1515–1539.

Carolan JC, Fitzroy CIJ, Ashton PD, Douglas AE, Wilkinson TL. **2009**. The secreted salivary proteome of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* characterised by mass spectrometry. *Proteomics* **9**: 2457–2467.

Carpita N, Defernez M, Findlay K, Wells B, Shoue D, Catchpole G, Wilson R, McCann M. **2001**. Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiology* **127**: 551.

Carpita N, Sabularse D, Montezinos D, Delmer DP. **1979**. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science Signaling* **205**: 1144–1147.

Carpita NC. **1996**. Structure and biogenesis of the cell wall of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 445–476.

Carpita NC, Gibeaut DM. **1993**. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* **3**: 1–30.

Carrington JC, Dougherty WG. **1987**. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *Journal of Virology* **61**: 2540–2548.

Casteel CL, Walling LL, Paine TD. **2006**. Behavior and biology of the tomato psyllid, *Bactericerca cockerelli*, in response to the *Mi-1.2* gene. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **121**: 67–72.

Celio GJ, Mims CW, Richardson EA. **2004**. Ultrastructure and immunocytochemistry of the host pathogen interface in poinsettia leaves infected with powdery mildew. *Canadian Journal of Botany* **82**: 421–429.

Cevik V, King GJ. **2002**. Resolving the aphid resistance locus *Sd-1* on a BAC contig within a sub-telomeric region of *Malus* linkage group 7. *Genome / National Research Council Canada* **45**: 939–945.

Chen L, Carpita NC, Reiter WD, Wilson RH, Jeffries C, McCann MC. **1998**. A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. *The Plant Journal* **16**: 385–392.

Chen M, Citovsky V. **2003**. Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *The Plant Journal* **35**: 386–392.

Chen MH, Sheng J, Hind G, Handa AK, Citovsky V. **2000**. Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *The EMBO Journal* **19**: 913–920.

Cherqui A, Tjallingii W. **2000**. Salivary proteins of aphids, a pilot study on identification, separation and immunolocalisation. *Journal of Insect Physiology* **46**: 1177–1186.

Choi J, Huh SU, Kojima M, Sakakibara H, Paek K-H, Hwang I. **2010**. The cytokinin-activated transcription factor ARR2 Promotes Plant Immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Developmental cell* **19**: 284–295.

Chotigeat W, Duangchu S, Wititsuwannakun R, Phongdara A. **2009**. Cloning and characterization of pectate lyase from *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 243–247.

Christensen TMIE, Nielsen JE, Mikkelsen JD. **1996**. Isolation, characterization and immuno localization of orange fruit acetyl esterase. Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases. Elsevier, 723–730.

Chun J-P, Huber DJ. **1998**. Polygalacturonase-mediated solubilization and depolymerization of pectic polymers in tomato fruit cell walls - Regulation by pH and ionic conditions. *Plant Physiology* **117**: 1293–1299.

Cipollini D, Enright S, Traw MB, Bergelson J. 2004. Salicylic acid inhibits jasmonic acid-induced resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Spodoptera exigua*. *Molecular Ecology* **13**: 1643–1653.

Comeau A. **1992**. *La lutte biologique* (G Morin, Ed.). Lavoisier.

Consortium TIAG. **2010**. Genome sequence of the Pea Aphid *Acyrthosiphon pisum*. *PLoS Biology* **8**: e1000313.

Coquoz J, Buchala A, Metraux J. **1998**. The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiology* **117**: 1095–1101.

Corredig M, Kerr W, Wicker L. **2000**. Separation of thermostable pectinmethylesterase from marsh grapefruit pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 4918–4923.

Cosgrove D. **2000**. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**: 321–326.

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

Côté F, Hahn MG. 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology* **26**: 1379–1411.

Couldridge C, Newbury HJ, Ford-Lloyd B, Bale J, Pritchard J. **2007**. Exploring plant responses to aphid feeding using a full *Arabidopsis* microarray reveals a small number of genes with significantly altered expression. *Bulletin of Entomological Research* **97**: 523–532.

D'Avino R, Camardella L, Christensen TMIE, Giovane A, Servillo L. **2003**. Tomato pectin methylesterase: modeling, fluorescence, and inhibitor interaction studies-comparison with the bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) enzyme. *Proteins* **53**: 830–839.

D'Ovidio R, Raiola A, Capodicasa C, Devoto A, Pontiggia D, Roberti S, Galletti R, Conti E, O'Sullivan D, De Lorenzo G. **2004**. Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. *Plant Physiology* **135**: 2424–2435.

Dannenhoffer JM, Schulz A, Skaggs MI, Bostwick DE, Thompson GA. **1997**. Expression of the phloem lectin is developmentally linked to vascular differentiation in cucurbits. *Planta* **201**: 405–414.

Darvill AG, Albersheim P. **1984**. Phytoalexins and their elicitors-a defense against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology* **35**: 243–275.

De Caroli M, Lenucci MS, Di Sansebastiano G-P, Dalessandro G, De Lorenzo G, Piro G. **2011**. Protein trafficking to the cell wall occurs through mechanisms distinguishable from default sorting in tobacco. *The Plant Journal* **65**: 295–308.

De Ilarduya OM, Xie Q, Kaloshian I. **2003**. Aphid-induced defense responses in Mi-1-mediated compatible and incompatible tomato interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 699–708.

De Lorenzo G, Brutus A, Savatin DV, Sicilia F, Cervone F. **2011**. Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). *Federation of European Biochemical Societies letters* **585**: 1521–1528.

De Lorenzo G, D'ovidio R, Cervone F. **2001**. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 313–335.

De Veer MJ, Kemp JM, Meeusen ENT. **2007**. The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunology* **29**: 1–9.

De Vos M, Jander G. **2009**. *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary components induce defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* **32**: 1548–1560.

De Vos M, Jander G. **2010**. Volatile communication in plant-aphid interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 1–6.

De Vos M, Kim JH, Jander G. **2007**. Biochemistry and molecular biology of *Arabidopsis*–aphid interactions. *BioEssays* **29**: 871–883.

Dedryver C-A, Le Ralec A, Fabre F. **2010**. The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 539–553.

Deeken R, Ache P, Kajahn I, Klinkenberg J, Bringmann G, Hedrich R. **2008**. Identification of *Arabidopsis thaliana* phloem RNAs provides a search criterion for phloem-based transcripts hidden in complex datasets of microarray experiments. *The Plant Journal* **55**: 746–759.

del Río L, Javier Corpas F, Barroso J. **2004**. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**: 783–792.

Demont-Caulet N, Lapierre C, Jouanin L, Baumberger S, Méchin V. **2010**. *Arabidopsis* peroxidase-catalyzed copolymerization of coniferyl and sinapyl alcohols: kinetics of an endwise process. *Phytochemistry* **71**: 1673–1683.

Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J. **2008**. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Molecular Plant* **1**: 423–445.

Di Matteo A, Bonivento D, Tsernoglou D, Federici L, Cervone F. **2006**. Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in plant defence: a structural view. *Phytochemistry* **67**: 528–533.

Di Matteo A, Giovane A, Raiola A, Camardella L, Bonivento D, De Lorenzo G, Cervone F, Bellincampi D, Tsernoglou D. **2005**. Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. *Plant Cell* **17**: 849-858.

Dick-Perez M, Zhang Y, Hayes J, Salazar A, Zabotina O, Hong M. **2011**. Structure and interactions of plant cell wall polysaccharides by 2D and 3D magic-angle-spinning solid-state NMR. *Biochemistry* **50**: 989–1000.

Dinant S, Clark AM, Zhu Y, Vilaine F, Palauqui J-C, Kusiak C, Thompson GA. **2003**. Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in Angiosperms. *Plant Physiology* **131**: 114–128.

Divol F, Vilaine F, Thibivilliers S, Amselem J, Palauqui J-C, Kusiak C, Dinant S. **2005**. Systemic response to aphid infestation by *Myzus persicae* in the phloem of *Apium graveolens*. *Plant Molecular Biology* **57**: 517–540.

Divol F, Vilaine F, Thibivilliers S, Kusiak C, Sauge MH, Dinant S. 2007. Involvement of the xyloglucan endotransglycosylase/hydrolases encoded by celery *XTH1* and Arabidopsis *XTH33* in the phloem response to aphids. *Plant Cell and Environment* **30**: 187–201.

Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I, Hirt H. **2007**. Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science Signaling* **318**: 453–456.

Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D, Delmer DP. **2002**. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant and Cell Physiology* **43**: 1407–1420.

Dogimont C, Bendahmane A, Chovelon V, Boissot N. **2010**. Host plant resistance to aphids in cultivated crops: genetic and molecular bases, and interactions with aphid populations. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 566–573.

Dohlen von C, Moran NA. **2000**. Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biological Journal of the Linnean Society* **71**: 689–717.

Dong X. **2004**. NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 547–552.

Dorokhov Y, Komarova T, Petrunia I. **2012**. Airborne signals from a wounded leaf facilitate viral spreading and induce antibacterial resistance in neighboring plants. *PLoS Pathogens* **8**: e1002640.

Dorokhov Y, Mäkinen K, Frolova O, Merits A, Saarinen J, Kalkkinen N, Atabekov J, Saarma M. **1999**. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *Federation of European Biochemical Societies letters* **461**: 223–228.

Douglas AE. **1998**. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology* **43**: 17–37.

Douglas AE. **2003**. The nutritional physiology of aphids. *Advances in Insect Physiology* **31**: 73–140.

Downie A, Miyazaki S, Bohnert H, John P, Coleman J, Parry M, Haslam R. 2004. Expression profiling of the response of *Arabidopsis thaliana* to methanol stimulation. *Phytochemistry* **65**: 2305–2316.

Dreyer D, Campbell B. **1984**. Association of the degree of methylation of intercellular pectin with plant resistance to aphids and with induction of aphid biotypes. *Experientia* **40**: 224–226.

Dreyer DL, Campbell BC. **1987**. Chemical basis of host-plant resistance to aphids. *Plant Cell and Environment* **10**: 353–361.

Driouich A, Follet-Gueye M-L, Bernard S, Kousar S, Chevalier L, Vicré-Gibouin M, Lerouxel O. **2012**. Golgi-mediated synthesis and secretion of matrix polysaccharides of the primary cell wall of higher plants. *Frontiers in Plant Science* **3**.

Ebringerova A, Hromadkova Z, Heinze T. **2005**. Hemicellulose. *Advances in Polymer Science* **186**: 1–67.

Edwardson JR, Christie RG. **1997**. Viruses infecting peppers and other solanaceous crops. *University of Florida* **2**: 190.

Ehwald R, Woehlecke H, Titel C. **1992**. Cell wall microcapsules with different porosity from suspension cultured *Chenopodium album*. *Phytochemistry* **31**: 3033–3038.

Eichenseer H, Mathews M, Bi J, Murphy J, Felton G. **1999**. Salivary glucose oxidase: multifunctional roles for *Helicoverpa zea*? *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **42**: 99–109.

Ellis C, Karafyllidis I, Turner JG. 2002. Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 1025–1030.

Ellis C, Karafyllidis I, Wasternack C, Turner JG. **2002b**. The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**: 1557–1566.

Erb M, Glauser G, Robert CA. **2012**. Induced immunity against belowground insect herbivores-activation of defenses in the absence of a jasmonate burst. *Journal of Chemical Ecology* **38**: 629–640.

Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. **2001**. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**: 5–51.

Falk A, Feys BJ, Frost LN, Jones JD, Daniels MJ, Parker JE. **1999**. EDS1, an essential component of *R* gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 3292–3297.

Federici L, Caprari C, Mattei B, Savino C, Di Matteo A, De Lorenzo G, Cervone F, Tsernoglou D. **2001**. Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 13425.

Felle HH, Herrmann A, Hanstein S, Hückelhoven R, Kogel K-H. **2004**. Apoplastic ph signaling in barley leaves attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 118–123.

Felton GW, Tumlinson JH. **2008**. Plant–insect dialogs: complex interactions at the plant–insect interface. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 457–463.

Ferrari S, Galletti R, Vairo D, Cervone F, De Lorenzo G. **2006**. Antisense expression of the *Arabidopsis thaliana AtPGIP1* gene reduces polygalacturonase-inhibiting protein accumulation and enhances susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 931–936.

Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, Lorenzo GD. 2013. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1–9.

Fleischer A, O'Neill M, Ehwald R. **1999**. The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiology* **121**: 1–10.

Fleming AJ. **2005**. The co-ordination of cell division, differentiation and morphogenesis in the shoot apical meristem: a perspective. *Journal of Experimental Botany* **57**: 25–32.

Fontaine J, Molinié R, Tercé-Laforgue T, Cailleu D, Hirel B, Dubois F, Mesnard F. **2010**. Use of 1H-NMR metabolomics to precise the function of the third glutamate dehydrogenase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Comptes Rendus Chimie* **13**: 453–458.

Forbes AR. **1969**. The stylets of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera:Aphididae). *The Canadian Entomologist* **101**: 31–41.

Francis F, Lognay G, Wathelet J-P, Haubruge E. **2001**. Effects of allelochemicals from first (Brassicaceae) and second (*Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae*) trophic levels on *Adalia bipunctata*. *Journal of Chemical Ecology* **27**: 243–256.

Francis F, Lognay G, Wathelet J-P, Haubruge E. **2002**. Characterisation of aphid myrosinase and degradation studies of glucosinolates. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **50**: 173–182.

Francis KE, Lam SY, Copenhaver GP. 2006. Separation of *Arabidopsis* pollen tetrads is regulated by *QUARTET1*, a pectin methylesterase gene. *Plant Physiology* **142**: 1004–1013.

Friis EM, Pedersen KR, Crane PR. **2006**. Cretaceous angiosperm flowers: innovation and evolution in plant reproduction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **232**: 251–293.

Fry SC. **1988**. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Harlow: Longman Group Limited.

Fry SC. **1998**. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *The Biochemical Journal* **332**: 507–515.

Fry SC. **2004**. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist* **161**: 641–675.

Fry SC, York WS, Albersheim P, Darvill A, Hayashi T, Joseleau J-P, Kato Y, Lorences EP, Maclachlan GA, McNeil M, *et al.* 1993. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiologia Plantarum* **89**: 1–3.

Funk CJ. 2001. Alkaline phosphatase activity in whitefly salivary glands and saliva. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **46**: 165–174.

Gamauf C, Metz B, Seiboth B. 2007. Degradation of plant cell wall polymers by fungi.Kubicek CP, Druzhinina IS eds. Environmental and Microbial Relationship. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 325-338.

Garzo E, Soria C, Gomez-Guillamon ML, Fereres A. 2002. Feeding behavior of *Aphis gossypii* on resistant accessions of different melon genotypes (*Cucumis melo*). *Phytoparasitica* **30**: 129–140.

Gao M, Liu J, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S, Zhang Y. **2008**. MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell research* **18**: 1190–1198.

Gehrig HH, Winter K, Cushman J, Borland A, Taybi T. **2000**. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter* **18**: 369–376.

Giordanengo P 2009. DEMP 1.5, a php program to calculate demographic parameters (life table) URL http://www2.sophia.inra.fr/ID/SOFTS/demp/demp.php

Giordanengo P. 2014. EPG-Calc: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod-Plant Interactions* **8**: 163–169.

Giovane A, Servillo L, Balestrieri C, Raiola A, D'Avino R, Tamburrini M, Ciardiello MA, Camardella L. **2004**. Pectin methylesterase inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta* **1696**: 245–252.

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

Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang H-S, Nawrath C, Métraux J-P, Zhu T, Katagiri F. **2003**. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal* **34**: 217–228.

Gosset V, Harmel N, Göbel C, Francis F, Haubruge E, Wathelet J-P, Jardin du P, Feussner I, Fauconnier M-L. **2009**. Attacks by a piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1231–1240.

Gou JY, Yu XH, Chen XY, Liu CJ. **2012**. Acetylesterase-mediated deacetylation of pectin impairs cell elongation, pollen germination, and plant reproduction. *Plant Cell* **24**: 50–65.

Gómez-Gómez L, Boller T. **2000**. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* **5**: 1003–1011.

Grant M, Mansfield J. **1999**. Early events in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 312–319.

Green F, Clausen CA, Highley TL. **1989**. Adaptation of the Nelson-Somogyi reducing-sugar assay to a microassay using microtiter plates. *Analytical Biochemistry* **182**: 197–199.

Gregor JW, Davey V, Lang J. **1936**. Experimental taxonomy I. Experimental garden technique in relation to the recognition of the small taxonomic units. *New Phytologist* **35**: 323–350.

Grubb CD, Abel S. **2006**. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* **11**: 89–100.

Guénin S, Mareck A, Rayon C, Lamour R, Assoumou Ndong Y, Domon J-M, Sénéchal F, Fournet F, Jamet E, Canut H, *et al.* **2011**. Identification of pectin methylesterase 3 as a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **192**: 114–126.

Gummadi SN, Panda T. **2003**. Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. *Process Biochemistry* **38**: 987–996.

Guo F-Q, Okamoto M, Crawford NM. **2003**. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science Signaling* **302**: 100–103.

Guo G, Liu Y, Yang J, Ma X. **2006**. Identification, activity and function determination of several salivary enzymes secreted by *Macrosiphum avenae*. *Acta Entomologica Sinica* **49**: 768–774.

Habibi J, Backus EA, Coudron TA, Brandt SL. **2001**. Effect of different host substrates on hemipteran salivary protein profiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **98**: 369–375.

Hahn M, Darvill A, Albersheim P. **1981**. Host-pathogen interactions: XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiology* **68**: 1161.

Halkier BA, Gershenzon J. **2006**. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 303–333.

Hamann T. **2012**. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Frontiers in Plant Science* **3**: 1–5.

Hardham A, Jones D, Takemoto D. **2007**. Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 342.

Harmel N, Haubruge É, Francis F. **2010**. Étude des salives de pucerons: un préalable au développement de nouveaux bio-insecticides. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **14**: 369–378.

Harmel N, Létocart E, Cherqui A, Giordanengo P, Mazzucchelli G, Guillonneau F, De Pauw E, Haubruge E, Francis F. **2008**. Identification of aphid salivary proteins: a proteomic investigation of *Myzus persicae*. *Insect Molecular Biology* **17**: 165–174.

Harrewijn P, Minks AK. **1989**. Integrated aphid management: General aspects. *Aphids: Their biology, natural enemies, and control* **100**: 267–272.

He ZH, Cheeseman I, He D, Kohorn BD. **1999**. A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, *Wak1-5*, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **39**: 1189–1196.

Heathcote GD. **1957**. The comparison of yellow cylindrical, flat and water traps, and of johnson suction traps, for sampling aphids. *Annals of Applied Biology* **45**: 133–139.

Hegi G. **1986**. Illustrated flora of Central Europe. V.4, pt.1: Angiospermae Dicotyledoneae. Silvae Genetica.

Hématy K, Cherk C, Somerville S. 2009. Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 406–413.

Hewezi T, Howe P, Maier TR, Hussey RS, Mitchum MG, Davis EL, Baum TJ. **2008**. Cellulose binding protein from the parasitic nematode *Heterodera schachtii* interacts with *Arabidopsis* pectin methylesterase: cooperative cell wall modification during parasitism. *Plant Cell* **20**: 3080–3093.

Hinde R. **1971**. The control of the mycetome symbiotes of the aphids *Brevicoryne brassicae*, *Myzus persicae*, and *Macrosiphum rosae*. *Journal of Insect Physiology* **17**: 1791–1800.

Hogenhout SA, Ammar E-D, Whitfield AE, Redinbaugh MG. **2008**. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 327–359.

Hogenhout SA, Bos JIB. 2011. Effector proteins that modulate plant-insect interactions. Current Opinion in Plant Biology **14**: 422–428.

Hong MJ, Kim DY, Lee TG, Jeon WB, Seo YW. **2010**. Functional characterization of pectin methylesterase inhibitor (PMEI) in wheat. *Genes & genetic systems* **85**: 97–106.

Hongo S, Sato K, Yokoyama R, Nishitani K. 2012. Demethylesterification of the primary wall by PECTIN METHYLESTERASE35 provides mechanical support to the *Arabidopsis* stem. *Plant Cell* **24**: 2624–2634.

Hothorn M, Wolf S, Aloy P, Greiner S, Scheffzek K. **2004**. Structural insights into the target specificity of plant invertase and pectin methylesterase inhibitory proteins. *Plant Cell* **16**: 3437–3447.

Hsieh YSY, Harris PJ. **2012**. Structures of xyloglucans in primary cell walls of gymnosperms, monilophytes (ferns *sensu lato*) and lycophytes. *Phytochemistry* **79**: 87–101.

Humphrey TV, Bonetta DT, Goring DR. 2007. Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. *New Phytologist* **176**: 7–21.

Hussain A, Forrest JMS, Dixon AFG. **1973**. Changes in growth regulator content of radish seedlings, *Raphanus sativus*, infested with the aphid *Myzus persicae*. *Annals of Applied Biology* **75**: 275–284.

Hussey RS, Mims CW, Westcott SW III. **1992**. Immunocytochemical localization of callose in root cortical cells parasitized by the ring nematode *Criconemella xenoplax*. *Protoplasma* **171**: 1–6.

Hückelhoven R. **2007**. Cell wall–associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* **45**: 101–127.

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. **2003**. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics (Oxford, England)* **4**: 249–264.

Ishii T. **1997**. *O*-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. *Plant Physiology* **113**: 1265–1272.

Iwai H, Masaoka N, Ishii T, Satoh S. **2002**. A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 16319–16324.

Jacquet M, Bongiovanni M, Martinez M, Verschave P, Wajnberg E, Castagnone-Sereno P. **2005**. Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the Mi gene. *Plant Pathology* **54**: 93–99.

Jamet E, Albenne C, Boudart G, Irshad M, Canut H, Pont-Lezica R. **2008**. Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics* **8**: 893–908.

Jamet E, Canut H, Boudart G, Pont-Lezica R. **2006**. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science* **11**: 33–39.

Jarvis M. **2011**. Plant cell walls: Supramolecular assemblies. *Food Hydrocolloids* **25**: 257–262.

Jarvis MC. **1984**. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell and Environment* **7**: 153–164.

Jarvis MC. **2009**. Plant cell walls: supramolecular assembly, signalling and stress. *Structural Chemistry* **20**: 245–253.

Jaubert S, Laffaire J-B, Abad P, Rosso M-N. **2002**. A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Federation of European Biochemical Societies letters* **522**: 109–112.

Jayani R, Saxena S, Gupta R. **2005**. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* **40**: 2931–2944.

Johnson B, Birks PR. **1960**. Studies on wing polymorphism in aphids I. the developmental process involved in the production of the different forms. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **3**: 327–339.

Jolie RP, Duvetter T, Van Loey AM, Hendrickx ME. **2010**. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research* **345**: 2583–2595.

Jones A, Bridges M, Bones A, Cole R, Rossiter J. **2001**. Purification and characterisation of a non-plant myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**: 1–5.

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

Joo S, Liu Y, Lueth A, Zhang S. **2008**. MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *The Plant Journal* **54**: 129–140.

Juge N. **2006**. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science* **11**: 359–367.

Kaloshian I, Kinsey MG, Williamson VM, Ullman DE. **2000**. Mi-mediated resistance against the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae) limits sieve element ingestion. *Environmental entomology* **29**: 690–695.

Kawano T. **2003**. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports* **21**: 829–837.

Kempema LA, Cui X, Holzer FM, Walling LL. **2007**. *Arabidopsis* transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology* **143**: 849–865.

Kennedy JS, Booth CO, Kershaw WJS. **1959**. Host finding by aphids in the field: gynoparae of *Myzus persicae* (Sulzer). *Annals of Applied Biology* **47**: 410–423.

Kerchev PI, Karpinska B, Morris JA, Hussain A, Verrall SR, Hedley PE, Fenton B, Foyer CH, Hancock RD. **2013**. Vitamin C and the abscisic acid-insensitive 4 (ABI4) transcription factor are important determinants of aphid resistance in *Arabidopsis*. *Antioxidants & Redox Signaling* **18**: 1–15.

Kerlan C. **1996**. La Pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. Rousselle P, Robert Y, Crosnier C eds. Maladies à virus. INRA Editions, 232–260.

Kessler A, Baldwin IT. **2002**. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 299–328.

Kester HC, Magaud D, Roy C, Anker D, Doutheau A, Shevchik V, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Benen JA, Visser J. **1999**. Performance of selected microbial pectinases on synthetic monomethyl-esterified di- and trigalacturonates. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 37053–37059.

Kettles GJ, Drurey C, Schoonbeek H-J, Maule AJ, Hogenhout SA. **2013**. Resistance of *Arabidopsis thaliana* to the green peach aphid, *Myzus persicae*, involves camalexin and is regulated by microRNAs. *New Phytologist* **198**: 1178–1190.

King D, Bergmann C, Orlando R, Benen JA, Kester HC, Visser J. **2002**. Use of amide exchange mass spectrometry to study conformational changes within the endopolygalacturonase II-homogalacturonan-polygalacturonase inhibiting protein system. *Biochemistry* **41**: 10225–10233.

King RW, Zeevaart JA. **1974**. Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiology* **53**: 96–103.

Klarzynski O, Fritig B. **2001**. Stimulation des défenses naturelles des plantes. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences* **324**: 953–963.

Klavons J, Bennett R. **1986**. Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **34**: 597–599.

Kliebenstein DJ, Kroymann J, Brown P, Figuth A, Pedersen D, Gershenzon J, Mitchell-Olds T. **2001**. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiology* **126**: 1–15.

Klingauf FA. **1987**. *Host plant finding and acceptance*. Aphids: their biology, natural ennemies and control.

Klingler J, Creasy R, Gao L, Nair R, Calix A, Jacob H, Edwards O, Singh K. **2005**. Aphid resistance in *Medicago truncatula* involves antixenosis and phloem-specific, inducible antibiosis, and maps to a single locus flanked by NBS-LRR resistance gene analogs. *Plant Physiology* **137**: 1445.

Klingler JP, Nair RM, Edwards OR, Singh KB. **2009**. A single gene, AIN, in *Medicago truncatula* mediates a hypersensitive response to both bluegreen aphid and pea aphid, but confers resistance only to bluegreen aphid. *Journal of Experimental Botany* **60**: 4115–4127.

Knoblauch M, van Bel A. **1998**. Sieve tubes in action. *Plant Cell* **10**: 35–50.

Kobayashi M, Matoh T, Azuma J. **1996**. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiology* **110**: 1017–1020.

Kogovsek P, Kladnik A, Mlakar J, Tušek Žnidarič M, Dermastia M, Ravnikar M, Pompe-Novak M. **2011**. Distribution of *Potato virus Y* in potato plant organs, tissues and cells. *Phytopathology* **101**: 1292–1300.

Kogovsek P, Pompe Novak M, Baebler Š, Rotter A, Gow L, Gruden K, Foster G, Boonham N, Ravnikar M. **2010**. Aggressive and mild *Potato virus Y* isolates trigger different specific responses in susceptible potato plants. *Plant Pathology* **59**: 1121–1132.

Kohorn BD, Johansen S, Shishido A, Todorova T, Martinez R, Defeo E, Obregon P. **2009**. Pectin activation of MAP kinase and gene expression is WAK2 dependent. *The Plant Journal* **60**: 974–982.

Kombrink E, Somssich IE. **1997**. Pathogenesis-related proteins and plant defense. The Mycota, 107–128.

Konno H, Yamasaki Y, Katoh K. **1989**. Extracellular exo-polygalacturonase secreted from carrot cell cultures. Its purification and involvement in pectic polymer degradation. *Physiologia Plantarum* **76**: 514–520.

Kramer M, Sanders R, Bolkan H, Waters C, Sheeny RE, Hiatt WR. 1992. Postharvest evaluation of transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: processing, firmness and disease resistance. *Postharvest Biology and Technology* **1**: 241–255.

Kramell R, Atzorn R, Schneider G, Miersch O, Brückner C, Schmidt J, Sembdner G, Parthier B. **1995**. Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *Journal of Plant Growth Regulation* **14**: 29–36.

Kramell R, Miersch O, Atzorn R, Parthier B, Wasternack C. **2000**. Octadecanoid-derived alteration

of gene expression and the 'oxylipin signature' in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiology* **123**: 177–188.

Kuśnierczyk A, Winge P, Jørstad TS, Troczyńska J, Rossiter JT, Bones AM. **2008**. Towards global understanding of plant defence against aphids-timing and dynamics of early *Arabidopsis* defence responses to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack. *Plant Cell and Environment* **31**: 1097–1115.

Kuśnierczyk A, Winge P, Midelfart H, Armbruster WS, Rossiter JT, Bones AM. **2007**. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous *Myzus persicae* and oligophagous *Brevicoryne brassicae*. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2537–2552.

Lagaert S, Beliën T, Volckaert G. **2009**. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Seminars in cell & developmental biology* **20**: 1064–1073.

Laluk K, Mengiste T. **2010**. Necrotroph attacks on plants: Wanton destruction or covert extortion? *The Arabidopsis Book* **8**: 1–34.

Lambrix V, Reichelt M, Mitchell-Olds T, Kliebenstein DJ, Gershenzon J. **2001**. The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *Plant Cell* **13**: 1–17.

Lamesch P, Berardini TZ, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander DL, Garcia-Hernandez M, *et al.* 2012. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research* **40**: D1202–10.

Lamport D, Kieliszewski MJ. **2005**. Stress upregulates periplasmic arabinogalactan-proteins. *Plant Biosystems* **139**: 60–64.

Lamport DTA, Kieliszewski MJ, Showalter AM. 2006. Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function. *New Phytologist* **169**: 479–492.

Lamport DTA, Kieliszewski MJ, Chen Y, Cannon MC. **2011**. Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiology* **156**: 11–19.

Langridge J. **1958**. An osmotic mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Australian Journal of Biological Sciences* **11**: 457–470.

Lara-Márquez A, Zavala-Páramo M, López-Romero E, Camacho H. **2011**. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. *Biotechnology Letters* **33**: 859–868.

Lepoivre P. **2003**. *Phytopathologie*. De Boeck.

Lê S, Josse J, Husson F. **2008**. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of statistical software* **25**: 1–18.

Lee HI, León J, Raskin I. 1995. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4076–4079.

Li P, Feng B, Wang H, Tooley PW, Zhang X. **2011**. Isolation of nine *Phytophthora capsici* pectin methylesterase genes which are differentially expressed in various plant species. *Journal of basic microbiology* **51**: 61–70.

Li R, Rimmer R, Yu M, Sharpe AG, Séguin-Swartz G, Lydiate D, Hegedus DD. **2003**. Two *Brassica napus* polygalacturonase inhibitory protein genes are expressed at different levels in response to biotic and abiotic stresses. *Planta* **217**: 299–308.

Liepman A, Wightman R, Geshi N, Turner S, Scheller H. **2010**. Arabidopsis–a powerful model system for plant cell wall research. *The Plant Journal* **61**: 1107–1121.

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

Lionetti V, Cervone F, Bellincampi D. **2012**. Methyl esterification of pectin plays a role during plant–

pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *Journal of Plant Physiology* **169**: 1623–1630.

Lionetti V, Francocci F, Ferrari S, Volpi C, Bellincampi D, Galletti R, D'Ovidio R, De Lorenzo G, Cervone F. **2010**. Engineering the cell wall by reducing de-methyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 616–621.

Lionetti V, Raiola A, Camardella L, Giovane A, Obel N, Pauly M, Favaron F, Cervone F, Bellincampi D. **2007**. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **143**: 1871–1880.

Liu R, Lü B, Wang X, Zhang C, Zhang S, Qian J, Chen L, Shi H, Dong H. 2010. Thirty-seven transcription factor genes differentially respond to a harpin protein and affect resistance to the green peach aphid in *Arabidopsis*. *Journal of Biosciences* **35**: 435–450.

Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. **2003**. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165–178.

Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, Devera ME, Liang X, Tör M, Billiar T. **2007**. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological reviews* **220**: 60–81.

Louis J. **2012**. *Arabidopsis thaliana*—Aphid Interaction. *The Arabidopsis Book* **10**: 1–19.

Louis J, Shah J. **2013**. *Arabidopsis thaliana—Myzus persicae* interaction: shaping the understanding of plant defense against phloem-feeding aphids. *Frontiers in Plant Science* **4 (13)**:1-18.

Lowry DB. **2012**. Ecotypes and the controversy over stages in the formation of new species. *Biological Journal of the Linnean Society* **106**: 241–257.

Ly-Nguyen B, Van Loey AM, Smout C, Verlent I, Duvetter T, Hendrickx ME. **2004**. Effect of intrinsic and extrinsic factors on the interaction of plant pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor from kiwi fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 8144–8150.

Lyth M. **1985**. Hypersensitivity in apple to feeding by *Dysaphis plantaginea*: effects on aphid biology. *Annals of Applied Biology* **107**: 155–161.

Ma R, Reese JC, Black WC IV, Bramel-Cox P. **1990**. Detection of pectinesterase and polygalacturonase from salivary secretions of living greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Insect Physiology* **36**: 507–512.

Macdonald HM, Evans R. **1996**. Purification and properties of apple pectinesterase. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **70**: 321–326.

Madhusudhan VV, Miles PW. 1998. Mobility of salivary components as a possible reason for differences in the responses of alfalfa to the spotted alfalfa aphid and pea aphid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **86**: 25–39.

Maffei M, Bossi S, Spiteller D, Mithöfer A, Boland W. **2004**. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. I. Membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components. *Plant Physiology* **134**: 1752–1762.

Manabe Y, Verhertbruggen Y, Gille S, Harholt J, Chong SL, Pawar PM, Mellerowicz EJ, Tenkanen M, Cheng K, Pauly M, Scheller HV. 2013. Reduced wall acetylation proteins play vital and distinct roles in cell wall *O*-acetylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **163**, 1107–1117.

Mangeon A, Junqueira RM, Sachetto-Martins G. **2010**. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 99–104.

MAPK Group. **2002**. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**: 301–308.

Markovic O, Janecek S. **2004**. Pectin methylesterases: sequence-structural features and phylogenetic relationships. *Carbohydrate Research* **339**: 2281–2295.

Martens-Uzunova ES, Schaap PJ. **2009**. Assessment of the pectin degrading enzyme network of *Aspergillus niger* by functional genomics. *Fungal genetics and biology* **46**: 170–179.

Marty P, Jouan B, Bertheau Y, Vian B, Goldberg R. **1997**. Charge density in stem cell walls of *Solanum tuberosum* genotypes and susceptibility to blackleg. *Phytochemistry* **44**: 1435–1441.

Maulik A, Sarkar AI, Devi S, Basu S. **2012**. Polygalacturonase‐inhibiting proteins–leucine‐rich repeat proteins in plant defence. *Plant Biology* **14**: 22–30.

Mayans O, Scott M, Connerton I, Gravesen T, Benen J, Visser J, Pickersgill R, Jenkins J. **1997**. Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure* **5**: 677–689.

Mazid M, Khan TA, Mohammad F. **2011**. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* **3**: 232–249.

McAllan JW, Adams JB. **1961**. The significance of pectinase in plant penetration by aphids. *Canadian Journal of Zoology* **39**: 305–310.

McCann MC, Carpita NC. **2008**. Designing the deconstruction of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 314–320.

McCann MC, Wells B, Roberts K. **1990**. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science* **96**: 323–334.

McCreight JD. **2008**. Potential sources of genetic resistance in *Lactuca* spp. to the lettuce aphid, *Nasanovia ribisnigri* (Mosely) (Homoptera: Aphididae). *HortScience* **43**: 1355–1358.

Mewis I, Appel H, Hom A, Raina R, Schultz J. **2005**. Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiology* **138**: 1149–1162.

Meyer JS, Ingersoll CG, McDonald LL, Boyce MS. **1986**. Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. bootstrap techniques. *Ecology* **67**: 1156–1166.

Micheli F. **2001**. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* **6**: 1–6.

Micheli F, Holliger C, Goldberg R, Richard L. 1998. Characterization of the pectin methylesterase-like gene *AtPME3*: a new member of a gene family comprising at least 12 genes in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **220**: 13–20.

Miles PW, Harrewijn P. 1991. Discharge by aphids of soluble secretions into dietary sources. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **59**: 123–134.

Miles PW, Peng Z. 1989. Studies on the salivary physiology of plant bugs: Detoxification of phytochemicals by the salivary peroxidase of aphids. *Journal of Insect Physiology* **35**: 865–872.

Miles P. **1999**. Aphid saliva. *Biological Reviews* **74**: 41–85.

Miller AR. **1986**. Oxidation of cell wall polysaccharides by hydrogen peroxide: a potential mechanism for cell wall breakdown in plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **141**: 238–244.

Mithofer A, Boland W. **2008**. Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiology* **146**: 825–831.

Mohnen D. **2008**. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 266–277.

Moloi M, van der Westhuizen A. **2006**. The reactive oxygen species are involved in resistance responses of wheat to the Russian wheat aphid. *Journal of Plant Physiology* **163**: 1118–1125.

Moore JP, Nguema-Ona EE, Vicré-Gibouin M, Sørensen I, Willats WG, Driouich A, Farrant JM. 2013. Arabinose-rich polymers as an evolutionary strategy to plasticize resurrection plant cell walls against desiccation. *Planta* **237**: 739–754.

Mopper K, Schultz CA, Chevolot L, Germain C, Revuelta R, Dawson R. **1992**. Determination of sugars in unconcentrated seawater and other natural waters by liquid chromatography and pulsed amperometric detection. *Environmental Science & Technology* **26**: 133–138.

Moran P, Thompson G. **2001**. Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiology* **125**: 1074–1085.

Moran P, Cheng Y, Cassell J, Thompson G. **2002**. Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **51**: 182–203.

Mouille G. **2006**. Quantitative trait loci analysis of primary cell wall composition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**: 1035–1044.

Mouille G, Robin S, Lecomte M, Pagant S, Höfte H. **2003**. Classification and identification of *Arabidopsis* cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *The Plant Journal* **35**: 393–404.

Müller K, Levesque-Tremblay G, Bartels S, Weitbrecht K, Wormit A, Usadel B, Haughn G, Kermode AR. 2013. Demethylesterification of cell wall pectins in *Arabidopsis* plays a role in seed germination. *Plant Physiology* **161**: 305–316.

Munson MA, Baumann P, Kinsey MG. **1991**. *Buchnera* gen. nov. and B*uchnera aphidicola* sp. nov., a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of aphids. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**: 566–568.

Murdock LL, Shade RE. **2002**. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 6605–6611.

Musser RO, Hum-Musser SM, Eichenseer H, Peiffer M, Ervin G, Murphy JB, Felton GW. **2002**. Herbivory: caterpillar saliva beats plant defences. *Nature* **416**: 599–600.

Mutti N, Louis J, Pappan L, Pappan K, Begum K, Chen M, Park Y, Dittmer N, Marshall J, Reese J. **2008**. A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 9965–9969.

Mutti NS, Park Y, Reese JC, Reeck GR. **2006**. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Journal of Insect Science* **6**: 1–7.

Mølhøj M, Pagant S, Höfte H. **2002**. Towards understanding the role of membrane-bound endo-β-1, 4-glucanases in cellulose biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* **43**: 1399–1406.

Narusaka Y, Narusaka M, Motoaki S, Ishida J, Shinozaki K, Nan Y, Park P, Shiraishi T, Kobayashi M. **2005**. Cytological and molecular analyses of non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Alternaria alternata*. *Molecular Plant Pathology* **6**: 615–627.

Narváez-Vásquez J, Pearce G, Ryan CA. **2005**. The plant cell wall matrix harbors a precursor of defense signaling peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 12974–12977.

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

Nelson N. **1944**. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry* **153**: 375–380.

Ni X, Quisenberry SS, Pornkulwat S, Figarola JL, Skoda SR, Foster JE. 2000. Hydrolase and oxido-reductase activities in *Diuraphis noxia* and *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **93**: 595–601.

Nishimura MT. **2003**. Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science Signaling* **301**: 969–972.

Nishimura MT, Dangl JL. **2010**. *Arabidopsis* and the plant immune system. *The Plant Journal* **61**: 1053–1066.

Nombela G, Williamson VM, Muñiz M. **2003**. The root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 645–649.

Nottingham SF, Hardie J, Dawson GW, Hick AJ, Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM. **1991**. Behavioral and electrophysiological responses of Aphids to host and nonhost plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology* **17**: 1231–1242.

Nühse TS. **2012**. Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants. *Frontiers in Plant Science* **3**: 280.

Nuñez A, Fishman ML, Fortis LL, Cooke PH, Hotchkiss AT Jr. 2009. Identification of extensin protein associated with Sugar beet pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 10951–10958.

O'Neill M, Albersheim P. **1990**. The pectic polysaccharides of primary cell walls.Dey P, Harborne J eds. Methods in Plant Biochemistry. Academic Press, 415–441.

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.

Ollivier M, Legeai F, Rispe C. **2010**. Comparative analysis of the *Acyrthosiphon pisum* genome and expressed sequence tag-based gene sets from other aphid species. *Insect Molecular Biology* **19**: 33–45.

Panagiotopoulos C, Sempéré R, Lafont R, Kerhervé P. **2001**. Sub-ambient temperature effects on the separation of monosaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection. Application to marine chemistry. *Journal of Chromatography. A* **920**: 13–22.

Parenicová L, Benen JA, Kester HC, Visser J. **2000**. *pga*A and *pga*B encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *The Biochemical Journal* **345**: 637–644.

Park S-J, Huang Y, Ayoubi P. **2006**. Identification of expression profiles of sorghum genes in response to greenbug phloem-feeding using cDNA subtraction and microarray analysis. *Planta* **223**: 932–947.

Passardi F, Dobias J, Valério L, Guimil S, Penel C, Dunand C. **2007**. Morphological and physiological traits of three major *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal of Plant Physiology* **164**: 980–992.

Payasi A, Sanwal GG. **2003**. Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. *Phytochemistry* **63**: 243–248.

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

Peaucelle A, Louvet R, Johansen JN, Höfte H, Laufs P, Pelloux J, Mouille G. 2008. *Arabidopsis* phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall pectins. *Current biology* **18**: 1943–1948.

Pedigo, L. P. 1998. Entomology and pest management. Prentice-Hall International.

Pedras MSC, Khan AQ, Taylor JL. **1998**. The phytoalexin camalexin is not metabolized by *Phoma lingam*, *Alternaria brassicae*, or phytopathogenic bacteria. *Plant Science* **139**: 1–8.

Pedrolli DB, Monteiro AC, Gomes E, Carmona EC. **2009**. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal* **3**: 9–18.

Pegadaraju V, Knepper C, Reese J, Shah J. **2005**. Premature leaf senescence modulated by the Arabidopsis *PHYTOALEXIN DEFICIENT4* gene is associated with defense against the phloem-feeding green peach aphid. *Plant Physiology* **139**: 1927–1934.

Pegadaraju V, Louis J, Singh V, Reese JC, Bautor J, Feys BJ, Cook G, Parker JE, Shah J. **2007**. Phloem-based resistance to green peach aphid is controlled by Arabidopsis *PHYTOALEXIN*

DEFICIENT4 without its signaling partner *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1*. *The Plant Journal* **52**: 332–341.

Pelletier S, Van Orden J, Wolf S, Vissenberg K, Delacourt J, Ndong YA, Pelloux J, Bischoff V, Urbain A, Mouille G, *et al.* 2010. A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *New Phytologist* **188**: 726–739.

Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz EJ. **2007**. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* **12**: 267–277.

Penninckx I, Thomma B, Buchala A, Métraux J, Broekaert W. **1998**. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 2103–2114.

Peng Z, Miles PW. 1991. Oxidases in the gut of an aphid, *Macrosiphum rosae* (L.) and their relation to dietary phenolics. *Journal of Insect Physiology* **37**: 779–787.

Persson S, Caffall KH, Freshour G, Hilley MT, Bauer S, Poindexter P, Hahn MG, Mohnen D, Somerville C. 2007. The *Arabidopsis* irregular *xylem8* mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity. *Plant Cell* **19**: 237–255.

Pesson P. **1990**. Protection des cultures de la Révolution à nos jours : de l'empirisme a l'organisation de la lutte integrée de l'Agriculture. ed. Paris: Lavoisier, 169–190.

Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, *et al.* 2000. *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111–1120.

Petterson J. **1973**. Olfactory reactions of *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hom.:Aph.). *Swedish Journal of Agricultural Research* **3**: 95–103.

Peumans WJ, Van Damme EJ. **1995**. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* **109**: 347.

Pickett JA, Griffiths DC. **1980**. Composition of aphid alarm pheromones. *Journal of Chemical Ecology* **6**: 349–360.

Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM, Hardie J. **1992**. The chemical ecology of aphids. *Annual Review of Entomology* **37**: 67–90.

Pien S, Wyrzykowska J, McQueen-Mason S, Smart C, Fleming A. **2001**. Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 11812–11817.

Pilling J, Willmitzer L, Fisahn J. **2000**. Expression of a *Petunia inflata* pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L. enhances stem elongation and modifies cation distribution. *Planta* **210**: 391–399.

Pollard DG. **1973**. Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera, Aphidoidea): a review. *Bulletin of Entomological Research* **62**: 631–714.

Pompon J, Quiring D, Goyer C, Giordanengo P, Pelletier Y. 2011. A phloem-sap feeder mixes phloem and xylem sap to regulate osmotic potential. *Journal of Insect Physiology* **57**: 1317–1322.

Popeijus H, Overmars H, Jones J, Blok V, Goverse A, Helder J, Schots A, Bakker J, Smant G. **2000**. Enzymology: degradation of plant cell walls by a nematode. *Nature* **406**: 36–37.

Powell G, Tosh CR, Hardie J. **2006**. Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary, and applied perspectives. *Annual Review of Entomology* **51**: 309–330.

Prado E, Tjallingii WF. **1997**. Effects of previous plant infestation on sieve element acceptance by two aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **82**: 189–200.

Pressey R, Avants JK. **1973**. Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. *Plant Physiology* **52**: 252–256.

Puri A, Solomos T, Kramer A. **1982**. Partial purification and characterisation of potato pectinesterase. *Food Chemistry* **8**: 203–213.

Puthoff D, Nettleton D, Rodermel S, Baum T. **2003**. *Arabidopsis* gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *The Plant Journal* **33**: 911–921.

Qi X, Behrens BX, West PR, Mort AJ. **1995**. Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell walls of cotton suspension cultures. Evidence for a covalent cross-link between extensin and pectin. *Plant Physiology* **108**: 1691–1701.

Qin L, Kudla U, Roze EHA, Goverse A, Popeijus H, Nieuwland J, Overmars H, Jones JT, Schots A, Smant G, *et al.* 2004. Plant degradation: a nematode expansin acting on plants. *Nature* **427**: 30.

Quaglia F, Rossi E, Petacchi R, Taylor CE. **1993**. Observations on an infestation by green peach aphids (Homoptera: Aphididae) on greenhouse tomatoes in Italy. *Journal of Economic Entomology* **86**: 1019–1025.

R Core Team 2013. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/

Raiola A, Camardella L, Giovane A, Mattei B, De Lorenzo G, Cervone F, Bellincampi D. **2004**. Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. *Federation of European Biochemical Societies letters* **557**: 199–203.

Raiola A, Lionetti V, Elmaghraby I, Immerzeel P, Mellerowicz E, Salvi G, Cervone F, Bellincampi D. **2011**. Pectin methylesterase is induced in *Arabidopsis* upon infection and is necessary for a successful colonization by necrotrophic pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 432–440.

Rashotte AM, Jenks MA, Nguyen TD, Feldmann KA. **1997**. Epicuticular wax variation in ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **45**: 251–255.

Rausch T, Greiner S. **2004**. Plant protein inhibitors of invertases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1696**: 253–261.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. **2000**. *Biologie végétale*. De Boeck.

Read SM, Northcote DH. **1983**. Chemical and immunological similarities between the phloem proteins of three genera of the Cucurbitaceae. *Planta* **158**: 119–127.

Reid JB, Ross JJ. **2011**. Regulation of tissue repair in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 17241–17242.

Reiter WD, Chapple C, Somerville CR. **1997**. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. *The Plant Journal* **12**: 335–345.

Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer E. **2000**. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 707–720.

Richard L, Qin LX, Goldberg R. 1996. Clustered genes within the genome of *Arabidopsis thaliana* encoding pectin methylesterase-like enzymes. *Gene* **170**: 207–211.

Rico A, Preston GM. **2008**. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 269–282.

Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. **2001**. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**: 929–967.

Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JD. **2011**. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 317–343.

Roberts PA, Thomason IJ. **1986**. Variability in reproduction of isolates of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* on resistant tomato genotypes. *Plant Disease* **70**: 547–551.

Röckel N, Wolf S, Kost B, Rausch T, Greiner S. 2008. Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PMEI at the pollen tube tip involves PMEI endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *The Plant Journal* **53**: 133–143.

Rossi M, Goggin FL, Milligan SB, Kaloshian I, Ullman DE, Williamson VM. **1998**. The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 9750–9754.

Rossing WAH. **1991**. Simulation of damage in winter wheat caused by the grain aphid *Sitobion avenae*. 3. Calculation of damage at various attainable yield levels. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **97**: 87–103.

Röckel N, Wolf S, Kost B, Rausch T, Greiner S. **2008**. Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PMEI at the pollen tube tip involves PMEI endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *The Plant Journal* **53**: 133–143.

Ryan CA. **1987**. Oligosaccharide Signalling in Plants. *Annual review of cell biology* **3**: 295–317.

Saez-Aguayo S, Ralet M-C, Berger A, Botran L, Ropartz D, Marion-Poll A, North HM. 2013. PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR6 promotes *Arabidopsis* mucilage release by limiting methylesterification of homogalacturonan in seed coat epidermal cells. *Plant Cell* **25**: 308–323.

Saheed SA, Cierlik I, Larsson KAE, Delp G, Bradley G, Jonsson LMV, Botha CEJ. 2009. Stronger induction of callose deposition in barley by Russian wheat aphid than bird cherry-oat aphid is not associated with differences in callose synthase or β-1,3-glucanase transcript abundance. *Physiologia Plantarum* **135**: 150–161.

Sakano K. **2001**. Metabolic regulation of pH in plant cells: role of cytoplasmic pH in defense reaction and secondary metabolism. *International Review of Cytology* **206**: 1–44.

Sasidharan R, Voesenek LA, Pierik R. **2011**. Cell wall modifying proteins mediate plant acclimatization to biotic and abiotic stresses. *Critical Reviews in Plant Sciences* **30**: 548–562.

Schacht T, Unger C, Pich A, Wydra K. **2011**. Endo- and exopolygalacturonases of *Ralstonia solanacearum* are inhibited by polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) activity in tomato stem extracts. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 377–387.

Schepers A. **1989**. Chemical control. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **2**: 89–122.

Scherrer B. **1984**. *Biostatistique*. Boucherville - Québec - Canada: Gaetan Morin.

Schols HA, Voragen AGJ. **1996**. Complex pectins: structure elucidation using enzymes. Progress in Biotechnology. Wageningen, The Netherlands: Elsevier, 3–19.

Schols HA, Bakx EJ, Schipper D, Voragen AG. **1995**. A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research* **279**: 265–279.

Scholthof KG, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn B, Hohn T, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, *et al.* 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **12**: 938–954.

Schweighofer A, Kazanaviciute V, Scheikl E, Teige M, Doczi R, Hirt H, Schwanninger M, Kant M, Schuurink R, Mauch F, *et al.* 2007. The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 2213–2224.

Scognamiglio MA, Ciardiello MA, Tamburrini M, Carratore V, Rausch T, Camardella L. **2003**. The plant invertase inhibitor shares structural properties and disulfide bridges arrangement with the pectin methylesterase inhibitor. *Journal of protein chemistry* **22**: 363–369.

Seifert GJ, Roberts K. **2007**. The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 137–161.

Sessions A, Weigel D, Yanofsky MF. **1999**. The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *The Plant Journal* **20**: 259–263.

Sénéchal F, Graff L, Surcouf O, Marcelo P, Rayon C, Bouton S, Mareck A, Mouille G, Stintzi A, Höfte H, Lerouge P, Schaller A, Pelloux J. 2014. *Arabidopsis PECTIN METHYLESTERASE17* is co-expressed with and processed by SBT3.5, a sutilisin-like serine protease. *Annals of Botany*. mcu035

Sénéchal F, Wattier C, Rustérucci C, Pelloux J. **2014b**. Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *Journal of Experimental Botany* **65**: 5125–5160.

Sheehy RE, Kramer M, Hiatt WR. 1988. Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 8805–8809.

Shen Z, Denton M, Mutti N, Pappan K, Kanost M, Reese J, Reeck G. 2003. Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: Possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. *Journal of Insect Science* **3**: 1–9.

Shen Z, Pappan K, Mutti NS, He Q-J, Denton M, Zhang Y, Kanost MR, Reese JC, Reeck GR. 2005. Pectinmethylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: cDNA isolation and sequencing, genetic origin, and expression of the recombinant enzyme. *Journal of Insect Science* **5**: 1–9.

Shevchik VE, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. **1997**. Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular microbiology* **24**: 1285–1301.

Shibuya N, Minami E. **2001**. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**: 223–233.

Shin Y-K, Yum H, Kim E-S, Cho H, Gothandam KM, Hyun J, Chung Y-Y. **2006**. BcXTH1, a *Brassica campestris* homologue of Arabidopsis XTH9, is associated with cell expansion. *Planta* **224**: 32–41.

Shukla DD, Ward CW, Brunt AA. **1994**. The Potyviridae. CAB International.

Sicilia F, Fernandez-Recio J, Caprari C, De Lorenzo G, Tsernoglou D, Cervone F, Federici L. **2005**. The polygalacturonase-inhibiting protein PGIP2 of *Phaseolus vulgaris* has evolved a mixed mode of inhibition of endopolygalacturonase PG1 of *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **139**: 1380–1388.

Simon A, Biot E. **2010**. ANAIS: analysis of NimbleGen arrays interface. *Bioinformatics* **26**: 2468–2469.

Simon A, Jaubert S, Rispe C, Tagu D. **2007**. La vie sexuée et asexuée des pucerons. *Biofutur* **279**: 53–57.

Sinitsyna OA, Fedorova EA, Semenova MV, Gusakov AV, Sokolova LM, Bubnova TM, Okunev ON, Chulkin AM, Vavilova EA, Vinetsky YP, *et al.* 2007. Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. *Biochemistry* **72**: 565–571.

Smith C, Boyko E. **2007**. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **122**: 1–16.

Smith C, Liu X, Wang L, Chen M, Starkey S, Bai J. **2010**. Aphid feeding activates expression of a transcriptome of oxylipin-based defense signals in wheat involved in resistance to herbivory. *Journal of Chemical Ecology* **36**: 260–276.

Smith CM, Clement SL. **2012**. Molecular bases of plant resistance to arthropods. *Annual Review of Entomology* **57**: 309–328.

Smith HG, Hallsworth PB. **1990**. The effects of yellowing viruses on yield of sugar beet in field trials, 1985 and 1987. *Annals of Applied Biology* **116**: 503–511.

Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T. **2004**. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science Signaling* **306**: 2206–2211.

Spiller NJ, Koenders L, Tjallingii WF. 1990. Xylem ingestion by aphids - a strategy for maintaining water balance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **55**: 101–104.

Staehelin LA, Moore I. **1995**. The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and

trafficking mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **46**: 261–288.

Staswick PE, Tiryaki I. **2004**. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2117–2127.

Statsoft Inc 2008. Statistica pour Windows, version 8.0. URL http://www.statsoft.com/

Sterling JD, Atmodjo MA, Inwood SE, Kolli VSK, Quigley HF, Hahn MG, Mohnen D. **2006**. Functional identification of an Arabidopsis pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 5236–5241.

Stewart SA, Hodge S, Ismail N, Mansfield JW, Feys BJ, Prospéri J-M, Huguet T, Ben C, Gentzbittel L, Powell G. **2009**. The *RAP1* gene confers effective, race-specific resistance to the pea aphid in *Medicago truncatula* independent of the hypersensitive reaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 1645–1655.

Sutherland ORW. **1969**. The role of the host plant in the production of winged forms by two strains of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology* **15**: 2179–2201.

Svensson B, Fukuda K, Nielsen PK, Bønsager BC. **2004**. Proteinaceous α-amylase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1696**: 145–156.

Tardy F, Nasser W, Robert-Baudouy J, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. **1997**. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *Journal of bacteriology* **179**: 2503–2511.

Thibault JF, Renard CMGC, Axelos MAV, Roger P, Crépeau MJ. **1993**. Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research* **238**: 271–286.

Thomma B, Cammue B, Thevissen K. **2002**. Plant defensins. *Planta* **216**: 193–202.

Thompson GA, Goggin FL. **2006**. Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany* **57**: 755–766.

Thompson JE, Fry SC. **2000**. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* **211**: 275–286.

Thompson MV. **2005**. Scaling phloem transport: Elasticity and pressure–concentration waves. *Journal of Theoretical Biology* **236**: 229–241.

Tian G-W, Chen M-H, Zaltsman A, Citovsky V. **2006**. Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Developmental biology* **294**: 83–91.

Tjallingii WF. **1978**. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **24**: 721–730.

Tjallingii WF. 1987. Stylet penetration activities by aphids: New correlations with electrical penetration graphs. Labeyrie V, Fabres G, Lachaise D eds. Proceedings of the 6th International Symposium on Insect-Plant Relationships. Pau, France: W. Junk Publishers, 301–306.

Tjallingii WF. 1990. Continuous recording of stylet penetration activities by aphids. In RK Campbell, RD Eikenbary, eds, Aphid-plant genotype interactions. Elsevier Science, Amsterdam, pp 89-99

Tjallingii WF. 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *Journal of Experimental Botany* **57**: 739–745.

Tjallingii WF, Esch TH. **1993**. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology* **18**: 317–328.

Tjallingii WF, Mayoral A. 1992. Criteria for host-plant acceptance by aphids.Visser H, Harrewijn P eds. Proceedings of the 8th International Symposium on Insect-Plant Relationships. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 280–282.

Traw MB, Kim J, Enright S, Cipollini DF, Bergelson J. 2003. Negative cross-talk between salicylate-

and jasmonate-mediated pathways in the Wassilewskija ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology* **12**: 1125–1135.

Underwood W. **2012**. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science* **3**: 85.

Urbanska A, Tjallingii W, Dixon A, Leszczynski B. 1998. Phenol oxidising enzymes in the grain aphid's saliva. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **86**: 197–203.

Uzest M, Gargani D, Dombrovsky A, Cazevieille C, Cot D, Blanc S. **2010**. The 'acrostyle': a newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Structure and Development* **39**: 221–229.

Uzest M, Gargani D, Drucker M, Hébrard E, Garzo E, Candresse T, Fereres A, Blanc S. **2007**. A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 17959–17964.

Van Damme EJ, Lannoo N, Peumans WJ. **2008**. Plant lectins. *Advances in Botanical Research* **48**: 107–209.

van de Ven WT, LeVesque CS, Perring TM, Walling LL. **2000**. Local and systemic changes in squash gene expression in response to silverleaf whitefly feeding. *Plant Cell* **12**: 1409–1423.

Van Emden HF, Harrington R. **2007**. *Aphids as Crop Pests*. Cabi.

Van Loon L, Rep M, Pieterse CMJ. **2006**. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135–162.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. **2002**. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**: 1–12.

Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. **2010**. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology* **153**: 895–905.

Verchot J, Herndon KL, Carrington JC. **1992**. Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology* **190**: 298–306.

Verwoerd TC, Dekker B, Hoekema A. **1989**. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research* **17**: 2362.

Villada ES, Gonzalez EG, Lopez-Sese AI, Castiel AF, Gomez-Guillamon ML. **2009**. Hypersensitive response to *Aphis gossypii* Glover in melon genotypes carrying the Vat gene. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3269–3277.

Vincken JP. **2003**. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology* **132**: 1781–1789.

Voelckel C, Weisser WW, Baldwin IT. **2004**. An analysis of plant-aphid interactions by different microarray hybridization strategies. *Molecular Ecology* **13**: 3187–3195.

Volpi C, Janni M, Lionetti V, Bellincampi D, Favaron F, D'Ovidio R. **2011**. The ectopic expression of a pectin methyl esterase inhibitor increases pectin methyl esterification and limits fungal diseases in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 1012–1019.

Voragen AGJ, Coenen G-J, Verhoef RP, Schols HA. **2009**. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* **20**: 263–275.

Wagner U, Edwards R, Dixon D, Mauch F. **2002**. Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Molecular Biology* **49**: 515–532.

Walling L. **2000**. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**: 195–216.

Walling LL. **2009**. Adaptive defense responses to pathogens and insects. *Advances in Botanical Research* **51**: 551–612.

Walton JD. **1994**. Deconstructing the cell wall. *Plant Physiology* **104**: 1113–1118.

Wang H, Guo Y, Lv F, Zhu H, Wu S, Jiang Y, Li F, Zhou B, Guo W, Zhang T. **2010**. The essential role of *GhPEL* gene, encoding a pectate lyase, in cell wall loosening by depolymerization of the de-esterified pectin during fiber elongation in cotton. *Plant Molecular Biology* **72**: 397–406.

Wang X-Q, Ullah H, Jones AM, Assmann SM. **2001**. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science Signaling* **292**: 2070–2023.

Warrilow AGS, Turner RJ, Jones MG. **1994**. A novel form of pectinesterase in tomato. *Phytochemistry* **35**: 863–868.

Wattad C, Dinoor A, Prusky D. **1994**. Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: a possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**: 293–297.

Weber G, Oswald S, Zoellner U. **1986**. Suitability of rape cultivars with a different glucosinolate content for *Brevicoryne brassicae* (L.) and *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae). *Journal of Plant Deseases and Protection* **93**: 113–124.

Weber M, Deinlein U, Fischer S, Rogowski M. 2013. A mutation in the *Arabidopsis thaliana* cell wall biosynthesis gene pectin methylesterase 3 as well as its aberrant expression cause hypersensitivity specifically to Zn. *The Plant Journal* **76**: 151–164.

Wei G, Shirsat AH. **2006**. Extensin over-expression in *Arabidopsis* limits pathogen invasiveness. *Molecular Plant Pathology* **7**: 579–592.

Weigel D. **2012**. Natural variation in *Arabidopsis*: from molecular genetics to ecological genomics. *Plant Physiology* **158**: 2–22.

Weigel D, Mott R. **2009**. The 1001 genomes project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology* **10**: 107.

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

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

Will T, van Bel AJE. **2006**. Physical and chemical interactions between aphids and plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 729–737.

Will T, Tjallingii W, Thönnessen A, van Bel A. **2007**. Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 10536.

Will T, Steckbauer K, Hardt M, van Bel AJE. 2012. Aphid gel saliva: sheath structure, protein composition and secretory dependence on stylet-tip milieu. *PLoS ONE* **7**: e46903.

Willats WG, McCartney L, Knox JP. **2001a**. In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **213**: 37–44.

Willats WGT, Knox JP, Mikkelsen JD. **2006**. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* **17**: 97–104.

Willats WGT, Orfila C, Limberg G, Buchholt H-C, van Alebeek G-JWM, Voragen AGJ, Marcus SE, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Murray BS, *et al.* 2001b. 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. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 19404–19413.

Williamson VM, Hussey RS. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* **8**: 1735–1745.

Wittstock U, Gershenzon J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 300–307.

Wojtaszek P. **1997**. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* **322**: 681.

Wolf S, Greiner S. **2012**. Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* **249 (2)**: 169–175.

Wolf S, Grsic-Rausch S, Rausch T, Greiner S. **2003**. Identification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis*. *Federation of European Biochemical Societies letters* **555**: 551–555.

Wolf S, Hématy K, Höfte H. **2012**. Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 381–407.

Wolf S, Mouille G, Pelloux J. **2009a**. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant* **2**: 851.

Wolf S, Rausch T, Greiner S. **2009b**. The N-terminal pro region mediates retention of unprocessed type-I PME in the Golgi apparatus. *The Plant Journal* **58**: 361–375.

Wydra K, Beri H. 2007. Immunohistochemical changes in methyl-ester distribution of homogalacturonan and side chain composition of rhamnogalacturonan I as possible components of basal resistance in tomato inoculated with Ralstonia solanacearum. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **70**: 13–24.

Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG. **1998**. COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science Signaling* **280**: 1091–1094.

Yadav S, Yadav P, Yadav D, Yadav K. **2009**. Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry* **44**: 1–10.

Yakoby N, Beno-Moualem D, Keen NT, Dinoor A, Pines O, Prusky D. **2001**. *Colletotrichum gloeosporioides pel*B is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 988–995.

Yamasaki H, Sakihama Y. **2000**. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *Federation of European Biochemical Societies letters* **468**: 89–92.

Yang S, Xie L, San Puah C, Zhang X, Yang W. 2005. VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the *Arabidopsis* style and transmitting tract. *Plant Cell* **17**: 584–596.

Yang C, Guo R, Jie F, Nettleton D, Peng J, Carr T, Yeakley J, Fan J, Whitham S. **2007**. Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to *Turnip mosaic virus* infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 358–370.

Zablackis E, Huang J, Muller B, Darvill A, Albersheim P. 1995. Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiology* **107**: 1129–1138.

Zandleven J, Sørensen SO, Harholt J, Beldman G, Schols HA, Scheller HV, Voragen AJ. **2007**. Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **68**: 1219–1226.

Zarate S, Kempema L, Walling L. **2007**. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiology* **143**: 866–875.

Zhang C, Shi H, Chen L, Wang X, Lü B, Zhang S, Liang Y, Liu R, Qian J, Sun W, *et al.* 2011. Harpin-induced expression and transgenic overexpression of the phloem protein gene *AtPP2-A1* in *Arabidopsis* repress phloem feeding of the green peach aphid *Myzus persicae*. *BMC Plant Biology* **11**: 11.

Zhang G, Gu C, Wang D. **2010a**. A novel locus for soybean aphid resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **120**: 1183–1191.

Zhang GF, Staehelin LA. **1992**. Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells. *Plant Physiology* **99**: 1070–1083.

Zhang GY, Feng J, Wu J, Wang XW. **2010b**. BoPMEI1, a pollen-specific pectin methylesterase inhibitor, has an essential role in pollen tube growth. *Planta* **231**: 1323–1334.

Zhu J, Park K-C. **2005**. Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. *Journal of Chemical Ecology* **31**: 1733–1746.

Zhu-Salzman K. **2004**. Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid. *Plant Physiology* **134**: 420–431.

Zipfel C. **2009**. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 414–420.

Zipfel C, Felix G. **2005**. Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 353–360.

Annexes

Annexe 1 Caractéristiques du terreau universel Botanica utilisé pour la culture des plantes d'*A. thaliana*

Annexe 2 Photographies des pucerons étudiés

Annexe 3 Liste des 98 paramètres analysés par EPG-Calc

Annexe 4 Protocole de préparation du milieu d'alimentation artificielle utilisé pour les cages de synchronisation des pucerons

Annexe 5 Review: Homogalacturonan-modifying enzymes (HGMEs): structure, expression, and roles in plants

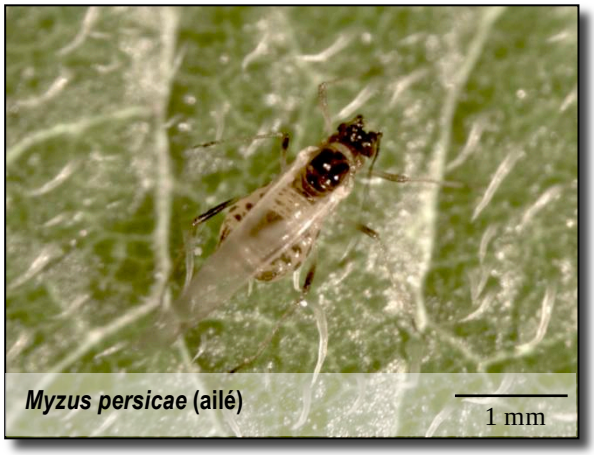
Annexe 1

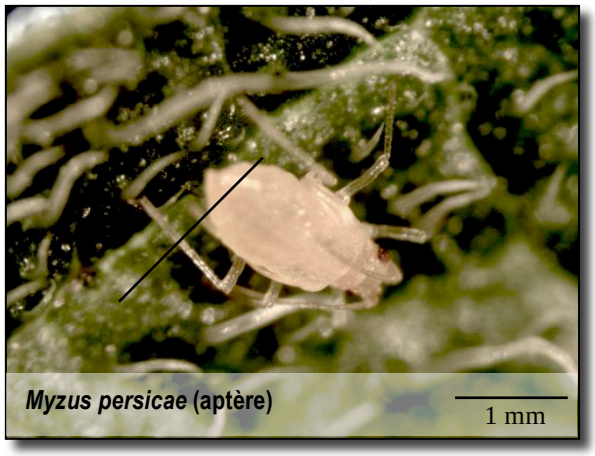
Caractéristiques du terreau universel Botanica utilisé pour la culture des plantes d'*A. thaliana*

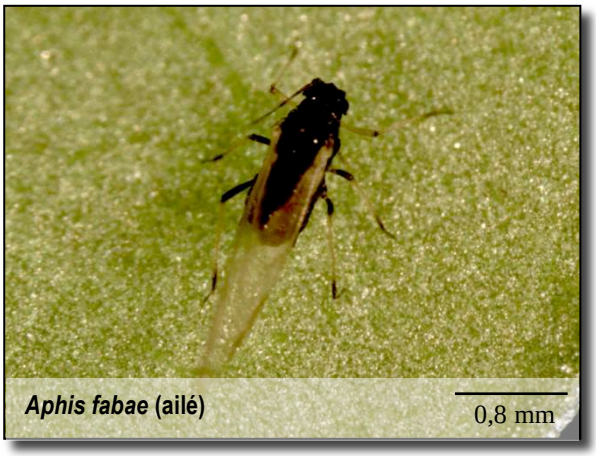
SUPPORT DE CULTURE NF
Terreau
Engrais NPK U42002/2 6,5-6-1 à 2,5 $kg.m^{-3}$
Engrais NF U42001 guano type Pérou 1 $kg.m^{3}$
Tourbe de sphaigne, tourbe blonde de sphaigne et argile
Matière sèche en pourcentage du produit brut : 27 %
Matière organique en pourcentage du produit sec : 82 %
Conductivité : 27 $mS.m^{-1}$
Capacité de rétention pour l'eau : 780 $mL.L^{-1}$
pH (H_2O) : 6,3
Volume : 20 L
Masse : 7,5 kg

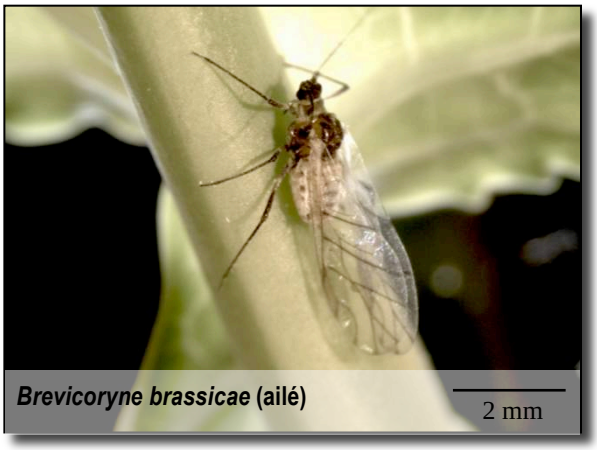
Annexe 2

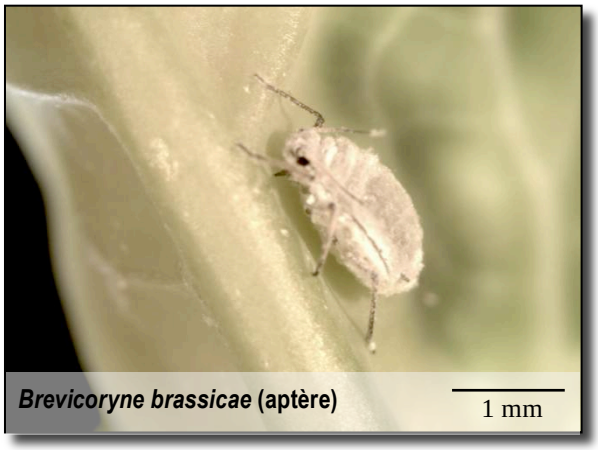
Photographies des pucerons étudiés











Photos réalisées par Sébastien Boquel

Annexe 3

Liste des 98 paramètres analysés par EPG-Calc

------- Non Probing (NP) -------

n_NP	: nombre de NP
a_NP	: durée moyenne d'un NP
m_NP	: durée médiane des NP
s_NP	: durée totale des NP

------- Probes (Pr) -------

n_Pr	: nombre de Pr
n_bPr	: nombre de Pr brefs (< 3 min) avant le 1er E
a_Pr	: durée moyenne d'un Pr
m_Pr	: durée médiane des Pr
s_Pr	: durée totale des Pr
t>1Pr	: temps écoulé avant le 1er Pr
d_1Pr	: durée du 1er Pr

------- Phase C (C) -------

n_C	: nombre de C
a_C	: durée moyenne d'un C
m_C	: durée médiane des C
s_C	: durée totale des C

------- Phase F (F) -------

n_F	: nombre de F
a_F	: durée moyenne d'un F
m_F	: durée médiane des F
s_F	: durée totale des F

------- Phase G (G) -------

n_G	: nombre de G
a_G	: durée moyenne d'un G
m_G	: durée médiane des G
s_G	: durée totale des G
t>1Grec	: temps écoulé avant le 1er G depuis le début de l'enregistrement
t>1G	: temps écoulé avant le 1er G depuis le 1er probe
n_Pr>1G	: nombre de probes avant le 1er G

------- Phases phloémiennes (E1, E2) -------

n_E1e	: nombre de E1e (E1 extracellulaires)
a_E1e	: durée moyenne d'un E1e
m_E1e	: durée médiane des E1e
s_E1e	: durée totale des E1e
n_sgE1	: nombre de sgE1 (E1 non suivi de E2)
a_sgE1	: durée moyenne d'un sgE1
m_sgE1	: durée médiane des sgE1
s_sgE1	: durée totale des sgE1
mx_sgE1	: durée maximum d'un sgE1
n_frE1	: nombre de frE1 (E1 suivi d'un E2)
a_frE1	: durée moyenne des frE1
m_frE1	: durée médiane des frE1
s_frE1	: durée totale des frE1
mx_frE1	: durée maximum d'un frE1
n_E1	: nombre de E1 (sgE1 + frE1)
a_E1	: durée moyenne d'un E1
m_E1	: durée médiane des E1
s_E1	: durée totale des E1
mx_E1	: durée maximum d'un E1
n_E12	: nombre de phases phloémiennes (E12: séquence E1-E2-E1-E2...etc.)
a_E12	: durée moyenne d'un E12
m_E12	: durée médiane des E12s
s_E12	: durée totale des E12
mx_E12	: durée maximum d'un E12
n_E2	: nombre de E2
a_E2	: durée moyenne d'un E2
m_E2	: durée médiane des E2
s_E2	: durée totale des E2
mx_E2	: durée maximum d'un E2
n_sE2	: nombre de sE2 (E2 > 10 min.)
a_sE2	: durée moyenne d'un sE2
m_sE2	: durée médiane des sE2
s_sE2	: durée totale des sE2
n_E	: nombre de E (sgE1 + frE1 + E2)
s_E	: durée totale des E
t>1Erec	: temps écoulé avant le 1er E depuis le début de l'enregistrement
t>1E	: temps écoulé avant le 1er E depuis le 1er Pr
tC>1E/1Pr	: temps écoulé avant le 1er E depuis le début du 1er Pr contenant un E
a_tC>1E/Pr	: temps moyen écoulé avant le 1er E dans les Pr contenant un E
mn_tC>1E/Pr	: temps minimum écoulé avant le 1er E dans les Pr contenant un E
n_bPr>1E	: nombre de probes brefs avant le 1er E
n_Pr>1E	: nombre de probes avant le 1er E
t>1E12	: temps écoulé avant le 1er E12 depuis le 1er Pr
t>1E2	: temps écoulé avant le 1er E2 depuis le 1er Pr
t>1sE2	: temps écoulé avant le 1er sE2 depuis le 1er Pr
n_Pr1E2	: nombre de probes avant le 1er E2
n_Pr>1sE2	: nombre de probes avant le 1er sE2
n_Pr<1sE2	: nombre de probes après le 1er sE2
n_E2>1sE2	: nombre de E2 avant le 1er sE2
%_E2/C	: ratio E2/C
%_E1/allE	: ratio E1/E (E1 index)
n_frE1/n_E12	: index de fractionnement de E
%_E2<1E2	: % de E2 après le 1er E2 (E2 index)

------- Potential Drops (pd) -------

n_pd	: nombre de pd
a_pd	: durée moyenne d'un pd
m_pd	: durée médiane des pd
s_pd	: durée totale des pd
t>1pdrec	: temps écoulé avant le 1er pd depuis le début de l'enregistrement
t>1pd	: temps écoulé avant le 1er pd depuis le 1er Pr
t>1pd/Pr	: temps écoulé avant le 1er pd depuis le 1er Pr contenant 1 pd
a_t>1pd/Pr	: temps moyen écoulé avant le 1er pd tous Pr confondus
m_t>1pd/Pr	: temps médian écoulé avant le 1er pd tous Pr confondus
mn_t>1pd/Pr	: temps minimum écoulé avant le 1er pd tous Pr confondus
n_pd/minC	: nombre de pd par minute de C
n_pd/1Pr	: nombre de pd dans le 1er Pr
n_Pr>1pd	: nombre de Pr avant le 1er pd
d_1pd	: durée du 1er pd
d_2pd	: durée du 2nd pd
d_pd/5pd	: durée moyenne des 5 1ers pd
s_pdII-3/5pd	: durée totale des phases II.3 des cinq 1ers pd

------- Population index -------

%_E2/Tr	: % de pucerons réalisant un E2 (par série expérimentale pas par individu)
%_sE2/Tr	: % de pucerons réalisant un sE2 (par série expérimentale pas par individu)

http://www2.sophia.inra.fr/ID/SOFTS/epg/epg.php

Annexe 4

Protocole de préparation du milieu d'alimentation artificielle utilisé pour les cages de synchronisation des pucerons

Solution mère de vitamines :

1. Peser les vitamines et les mettre dans un bécher.
2. Ajouter 150 mL d'eau. Mélanger.
3. Ajouter 5 mg de riboflavine (dissoute dans 1 mL d'eau en chauffant à 50 °C).
4. Ajuster le volume à 200 mL.
5. Aliquoter par 20 mL et stocker à – 20 °C.

Vitamines	**mg**
Acide amino benzoïque	100
Acide ascorbique	1000
Biotine	1
$CaCl_2$	50
Choline chloride	500
Acide folique	10
Myo-inositol	420
Acide nicotinique	100
Pyroxidine	25
Thiamine	25

Saccharose	20 g
Traces métaux	**mg**
$CuSO_4.5H_2O$	0,47
$FeCl_3.6H$	4,45
$MnCl_2.4H_2O$	0,65
NaCL	2,54
$ZnCl_2$	0,83
Autres	mg
$CaCl_2$	3
acide citrique	5,8
cholestérol benzoate	2,5
$MgSO_4.7H_2O$	242

Acides aminés	**mg**
alanine	178,7
D-β-alanine	6,22
arginine	244,9
asparagine	298,5
acide aspartique	88,25
cystéine	29,59
acide glutamique	149,3
glutamine	445,6
glycine	166,5
histidine	136
isoleucine	164,7
leucine	231,5
lysine	351
méthionine	72,35
ornithine	9,41
phénylalanine	293
proline	129,3
sérine	124,2
thréonine	127,1
tryptophane	42,75
tyrosine	38,63
valine	190,8

Préparation du milieu artificiel :

1. Peser les acides aminés, le saccharose, les métaux et autres.
2. Ajouter 40 mL d'eau et 20 mL de la solution mère de vitamines.
3. Dissoudre pendant 2 à 3 h sous agitation magnétique.
4. Ajuster à pH 7 avec 10 mL de KOH (1 M).
5. Ajouter 250 mg de KH_2PO_4.
6. Ajuster à 100 mL et à pH 7,5.
7. Filtrer, aliquoter et congeler à -20 °C.

Annexe 5

« Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants »

Journal of Experimental Botany, Vol. 65, No. 18, pp. 5125–5160, 2014
doi:10.1093/jxb/eru272 Advance Access publication 23 July, 2014

Journal of Experimental Botany
www.jxb.oxfordjournals.org

DARWIN REVIEW

Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants

Fabien Sénéchal*, Christopher Wattier*, Christine Rustérucci and Jérôme Pelloux†

EA3900 BIOPI Biologie des Plantes et Innovation, Université de Picardie Jules Verne, 33 Rue St Leu, F-80039 Amiens, France

* These authors contributed equally to this work.
† To whom correspondence should be addressed. E-mail: jerome.pelloux@u-picardie.fr

Received 13 March 2014; Revised 20 May 2014; Accepted 22 May 2014

Abstract

Understanding the changes affecting the plant cell wall is a key element in addressing its functional role in plant growth and in the response to stress. Pectins, which are the main constituents of the primary cell wall in dicot species, play a central role in the control of cellular adhesion and thereby of the rheological properties of the wall. This is likely to be a major determinant of plant growth. How the discrete changes in pectin structure are mediated is thus a key issue in our understanding of plant development and plant responses to changes in the environment. In particular, understanding the remodelling of homogalacturonan (HG), the most abundant pectic polymer, by specific enzymes is a current challenge in addressing its fundamental role. HG, a polymer that can be methylesterified or acetylated, can be modified by HGMEs (HG-modifying enzymes) which all belong to large multigenic families in all species sequenced to date. In particular, both the degrees of substitution (methylesterification and/or acetylation) and polymerization can be controlled by specific enzymes such as pectin methylesterases (PMEs), pectin acetylesterases (PAEs), polygalacturonases (PGs), or pectate lyases-like (PLLs). Major advances in the biochemical and functional characterization of these enzymes have been made over the last 10 years. This review aims to provide a comprehensive, up to date summary of the recent data concerning the structure, regulation, and function of these fascinating enzymes in plant development and in response to biotic stresses.

Key words: Biotic stress, development, homogalacturonans, pectate lyase-like, pectin methylesterase, pectins, polygalacturonase.

Introduction

The growth of plant organs involves cell expansion and cell division. Although the regulation of cell division is relatively well understood, very little is known about the control of cell expansion. It is driven by turgor pressure and notably depends on changes in the extensibility of the primary cell wall. In dicotyledonous species, such as the model plant *Arabidopsis thaliana*, the primary cell wall consists of a hydrogen-bonded network of cellulose microfibrils and xyloglucans (XyGs) embedded in a complex pectic and protein matrix (Carpita and Gibeaut, 1993). Cell growth requires creep between cellulose and XyG, which is facilitated by the presence of specific proteins such as expansins (Rose *et al.*, 2002; Cosgrove, 2005). In addition, in dicots and gymnosperms, secondary growth and biomass production involve the synthesis of large amounts of lignified secondary cell wall.

Pectins, which control cell wall porosity and hydration level as well as cellular adhesion, are known to show structural variation during growth and in response to stresses (Willats *et al.*, 2001). Recent findings underline the importance of pectins in the control of cell expansion and differentiation, presumably through changes in the rheological properties of the cell wall. Pectins, which are complex polysaccharides rich in galacturonic acid (Gal-A), contain distinct domains—homogalacturonans (HGs), rhamnogalacturonans I (RGIs), rhamnogalacturonans II (RGIIs), and xylogalacturonans (XGs)—based on two molecular backbones and differing in the diversity of their side chains (Vincken *et al.*, 2003;

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Experimental Biology. All rights reserved.
For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Mohnen, 2008; Burton *et al.*, 2010). HG, one of the main pectic constituents, is a linear homopolymer of α-(1–4)-linked D-Gal-A, which can either be methylesterified at the C-6 carboxyl (typically 80%;Wolf *et al.*, 2009*b*) or carry acetyl groups at O2 or O3 (up to 10%; Gou *et al.*, 2012). HG is synthesized from nucleotide sugars in the Golgi apparatus, and then secreted in a fully methylesterified form into the cell wall where its structure can be modified by the activity of cell wall enzymes. These will subsequently be referred to as HGMEs (HG-modifying enzymes), all of which, in *A. thaliana*, belong to large multigenic families. In particular, HGs can be modified by pectin methylesterases (PMEs; EC 3.1.1.11), whose activity is regulated by endogenous PMEIs (pectin methylesterase inhibitors) and which control the degree of methylesterification (DM) of HGs (Pelloux *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2009*b*). Pectin acetylesterases (PAEs; EC 3.1.1.6) play a similar role by hydrolysing the *O*-acetylated bonds. Overall, the partially demethylesterified HGs can either form Ca^{2+} bonds, which promote the development of the so-called 'egg box' structures that underlie the formation of pectin gels, or become a target for pectin-degrading enzymes such as polygalacturonases (endo-PGs, EC 3.2.1.15; and exo-PGs, EC 3.2.1.67) and pectate lyases-like (PLLs), including pectate lyases (endo-PLs, EC 4.2.2.2; and exo-PLs, EC 4.2.2.9) and pectin lyases (endo-PNLs; EC 4.2.2.10). In either case, the demethylesterification of HGs has dramatic consequences on the rheological properties of the cell wall (Peaucelle *et al.*, 2011*a*, *b*), and is predicted to affect cell growth. In addition, the hydrolysis of partially demethylesterified HGs can release oligogalacturonides (OGs) with a signalling function, for instance during plant–pathogen interactions (Lionetti *et al.*, 2007; Osorio *et al.*, 2008) or in modulating growth by inhibiting auxin-induced processes such as stem elongation, rhizogenesis, and flower and stomata formation (Ridley *et al.*, 2001; Falasca *et al.*, 2008; Camejo *et al.*, 2011). However, to date, the presence of endogenous OGs *in planta* has remained elusive.

This review describes the most recent findings concerning the biochemical characterization of HGMEs and highlights the diversity of their roles during plant development and in responses to biotic stresses.

Inventory and structure of HGMEs

All HGMEs belong to large multigenic families

An analysis of the data generated by sequencing projects shows that all HGMEs belong to rather large multigenic families in several plant species [CAZy, http://www.cazy.org/ (Cantarel *et al.*, 2009); Cell Wall Genomics, http://cellwall.genomics.purdue.edu/; TAIR, http://www.arabidopsis.org/]. For instance, in dicotyledonous species such as *A. thaliana* and poplar (*Populus trichocarpa*), 66 and 88 open reading frames (ORFs) have been annotated, respectively, as putative full-length PMEs (Geisler-Lee *et al.*, 2006; Pelloux *et al.*, 2007). In contrast, in grass species such as *Brachypodium distachyon* and rice (*Oryza sativa* japonica group), only 41 putative PME-encoding genes have been identified for both species (Table 1). This lower number of *PME* genes in grass species is likely to be related to the differences in the structure of cell wall polysaccharides between poales and dicots. In particular, HGs are known to be much less abundant and

Table 1. *Inventory of the PME, PAE, PG, and PLL isoforms in four sequenced plant species*

Species	Pectin methylesterase (EC 3.1.1.11) CE8	Pectin acetylesterase (EC 3.1.1.6) CE13	Endo-polygalacturonase (EC 3.2.1.15), exo-polygalacturonase (EC 3.2.1.67), exo-polygalacturonosidase (EC 3.2.1.82), rhamnogalacturonase (EC 3.2.1.171), endo-xylogalacturonan hydrolase (EC 3.2.1.–), rhamnogalacturonan α-L-rhamnopyranohydrolase (EC 3.2.1.40) GH28	Endo-pectate lyase (EC 4.2.2.2), exo-pectate lyase (EC 4.2.2.9), endo-pectin lyase (EC 4.2.2.10) PL1
Arabidopsis thaliana (dicots)[a]	66	12	68	26
Populus trichocarpa (dicots)[b]	88	10	89	28
Brachypodium distachyon (monocots)[c]	41	7	41	7
Oryza sativa Japonica group (monocots)[d]	41	10	45	12

[a] Full-length *Arabidopsis* protein data were retrieved from Cell Wall Genomics (http://cellwall.genomics.purdue.edu/), CAZy (http://www.cazy.org/), TAIR (http://www.arabidopsis.org/), the PFAM database (http://pfam.sanger.ac.uk/), Tian *et al.* (2006), Gonzalez-Carranza *et al.* (2012), Sun and Van Nocker (2010), and Cao (2012).
[b] *Populus* protein information were retrieved from Geisler-Lee *et al.* (2006).
[c] *Brachypodium* protein data were retrieved from the International Brachypodium Initiative (2010), Tyler *et al.* (2010), and Davidson *et al.* (2012).
[d] Full length *Oryza* protein sequence information were retrieved from Cell Wall Genomics (http://cellwall.genomics.purdue.edu/), CAZy (http://www.cazy.org/), and Davidson *et al.* (2012).
The CAZy code for each family protein was retrieved from CAZy (http://www.cazy.org/).

less methylesterified in grass species (Carpita and Gibeaut, 1993; Vogel, 2008; Burton *et al.*, 2010). The need for HGMEs would therefore be more limited and could explain the differences in the figures observed between type I and type II cell wall species when considering other HGMEs such as PGs and PLLs (Table 1). Surprisingly, regarding the *PAE* gene family, dicotyledonous and grass species have largely the same number of isoforms, with 12, 10, 7, and 11 ORFs annotated as a putative PAE for *A. thaliana*, *P. trichocarpa*, *B. distachyon*, and *O. sativa* japonica group, respectively (Table 1). The large difference between the number of PME and PAE isoforms in dicots could be related to the occurrence of specific substrates. HGs are known to be highly methylesterified (up to 80%; Wolf *et al.*, 2009*b*) while their degree of acetylation (DA) falls within the range of 0.25–10% (Gou *et al.*, 2012) depending on the species. In addition to HG, a number of plant cell wall polysaccharides, such as RGIs, XyGs, and glucuronoarabinoxylans (GAXs), can be *O*-acetylated (Kiefer *et al.*, 1989; Ishii, 1997; Kabel *et al.*, 2003; Fry, 2004; Gibeaut *et al.*, 2005; Gille and Pauly, 2012). The large amount of GAX and the presence of *O*-acetyl-substituents observed in grass species (Carpita and Gibeaut, 1993; Vogel, 2008; Burton *et al.*, 2010) could thus constitute targets for PAE activity. The diversity of putative targets for PAEs would therefore explain the relatively similar number of isoforms between type I and type II cell wall species.

In order to act on HGs *in muro*, HGMEs, which are synthesized in the endoplasmic reticulum and post-translationally modified in the Golgi apparatus (glycosylation and other modifications), must be secreted into the cell wall by exocytosis (Wolf *et al.*, 2009*a*, *b*; Worden *et al.*, 2012). Several isoforms have been shown to be present in the cell wall proteome (Borderies *et al.*, 2003; Boudart *et al.*, 2005; Charmont *et al.*, 2005; Irshad *et al.*, 2008; Jamet *et al.*, 2009). A signal peptide and/or a transmembrane domain at the N-terminus enables their secretion. Analysis of HGME sequences in *A. thaliana* and *O. sativa* japonica group reveals that the majority of sequences (65% and 57%, respectively) show a signal peptide (SP). Many sequences also possess a transmembrane domain (TM; 24% and 22%, respectively) and some possess both (Supplementary Table S1 available at *JXB* online). Surprisingly, for each family, a number of putative soluble isoforms can be identified. The proportion of soluble protein is higher in grass species (17%) than in dicot species (8%). The targets and the functional role of these soluble isoforms remain to be determined. The biochemical characterization of a soluble AtPME suggested that it could act in defence mechanisms against pathogens (Dedeurwaerder *et al.*, 2009).

Structure of HGMEs

To date, among plant HGMEs, 3D crystallographic structures have only been resolved for carrot and tomato PMEs (Johansson *et al.*, 2002; D'Avino *et al.*, 2003; Di Matteo *et al.*, 2005). The first crystallization of bacterial PME from *Erwinia chrisanthemi* was previously performed (Jenkins *et al.* 2001), and its co-crystallization with HGs helped in determining the key amino acids involved at the catalytic site in enzyme–substrate interactions (Fries *et al.*, 2007). This study not only highlighted the hydrolysis mechanism, but also the processive action of *Erwinia* PME (Fries *et al.*, 2007). So far, no PGs and PLs from plants have been resolved at their structural level. However, 3D crystallographic structures of PLs (Pickersgill *et al.*, 1994; Yoder and Jurnak, 1995; Lietzke *et al.*, 1996; Jenkins and Pickersgill, 2001; Jenkins *et al.*, 2004; Creze *et al.*, 2008; Seyedarabi *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2012) and PGs (Pickersgill *et al.*, 1998; Van Santen *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2001; Jenkins and Pickersgill, 2001; Van Pouderoyen *et al.*, 2003; Bonivento *et al.*, 2007) from plant pathogens are available (PDB Protein Data Bank http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do; Punta *et al.*, 2012). Identification of structural motifs was inferred from these structures, enabling models of plant PGs and PLLs to be generated (PFAM database http://pfam.sanger.ac.uk/). The structure of plant PAEs has not yet been resolved.

In *A. thaliana*, 66 PME isoforms are divided into two groups (Pelloux *et al.*, 2007; Dedeurwaerder *et al.*, 2009). The first, called group 1 (or type II), is composed of 21 isoforms that contain a mature active part (PME catalytic domain, Pfam01095), either preceded by different targeting motifs (SP for 14 sequences, SP/TM for 1 sequence, TM for 3 sequences) or without a motif for three soluble isoforms (Fig. 1A). In previous publications (Tian *et al.*, 2006; Pelloux *et al.*, 2007), two group 2 PMEs (At3g10720 and At4g33220) were considered to be group 1 PMEs as the protein sequences used to determine domains were truncated. The second group, so-called group 2 (or type I), is composed of 45 isoforms which have, in addition to the mature part, an N-terminal extension (PRO region) showing similarities with the PMEI domain (Pfam04043). As for group 1 PMEs, different targeting motifs can be identified for the 44 sequences, one being predicted to be soluble (Fig. 1A). Figures for other species are shown in Supplementary Table S1 at *JXB* online. Among group 2 PMEs, 43 isoforms show conserved dibasic amino acid sequences (such as RRLL, RKLL, KKDL, RKLM, RRLM, RKLA, RKLK, RKLR, and RRML) upstream of the mature active part, which could constitute one or more proteolytic cleavage sites. This domain, the so-called processing motif (PM), could be targeted by subtilisin-like proteases (SBTs; 56 isoforms in *Arabidopsis*) during PME *trans*-Golgi trafficking (Wolf *et al.*, 2009*a*; Schaller *et al.*, 2012). A large number of group 2 PMEs and SBTs are co-expressed during development and in response to stresses. Processing of group 2 PMEs was shown to be a prerequisite for the secretion of active enzymes in the cell wall (Wolf *et al.*, 2009*a*) and it was suggested that the PRO region could prevent group 2 PME activity during their transport through the secretory pathway (Bosch and Hepler, 2005; Bosch *et al.*, 2005; Dorokhov *et al.*, 2006). These results are notably backed up by the fact that, in the cell wall proteome, identified PMEs often lack this domain (E. Jamet, personal communication).

When considering AtPGs, the majority of the sequences show a single glycosyl hydrolase family 28 domain (GH28; Pfam00295). This is preceded by a targeting motif at the N-terminus for 59 isoforms, while five isoforms are predicted as soluble (Fig. 1B). Among PG isoforms, there are also four

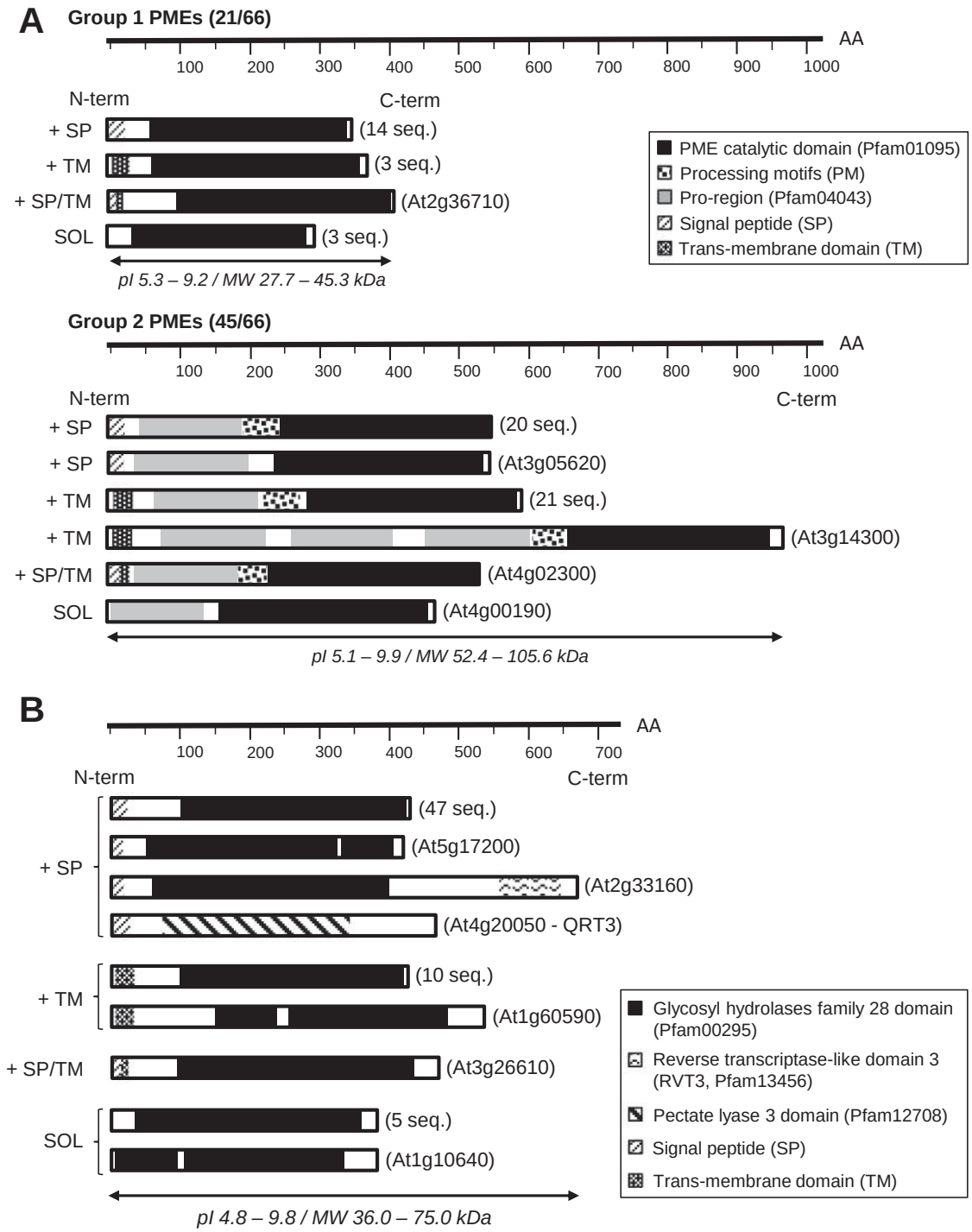


Fig. 1. *Arabidopsis* PME (A) and PG (B) structural motifs. The domains, average size of proteins in amino acid (AA), isoelectric point (pI), and molecular weight (MW) ranges of representative members are indicated according to the PFAM database (http://pfam.sanger.ac.uk/), SignalP4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), and ExPASyProtParam Tool (http://web.expasy.org/protparam/).

atypical protein sequences, three of which harbour two GH28 domains and one with a reverse transcriptase-like 3 domain (RVT3; Pfam13456) downstream of the GH28 domain. Two asparagine and histidine residues have been identified in the GH28 domain for 53 sequences. One ORF, previously annotated as putative PG QRT3 (At4g20050; Rhee *et al.*, 2003), lacks the GH28 domain but has a pectate lyase 3 domain (Pfam12708). The number of putative PGs would therefore be 67, in line with recent published data (Cao, 2012).

For AtPLLs, all the sequences annotated as PL (26 sequences) show a Pec_lyase_C domain (Pfam00544), and only three isoforms are predicted as soluble proteins (Fig. 2A). This multigenic family also has specific features, with the presence of an N-terminal domain, called Pec_lyase_N (Pfam04431), in four sequences. Lastly, one protein (At3g54920 or PMR6), which plays a role in powdery mildew resistance, shows an additional C-terminal glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor site, which may be responsible

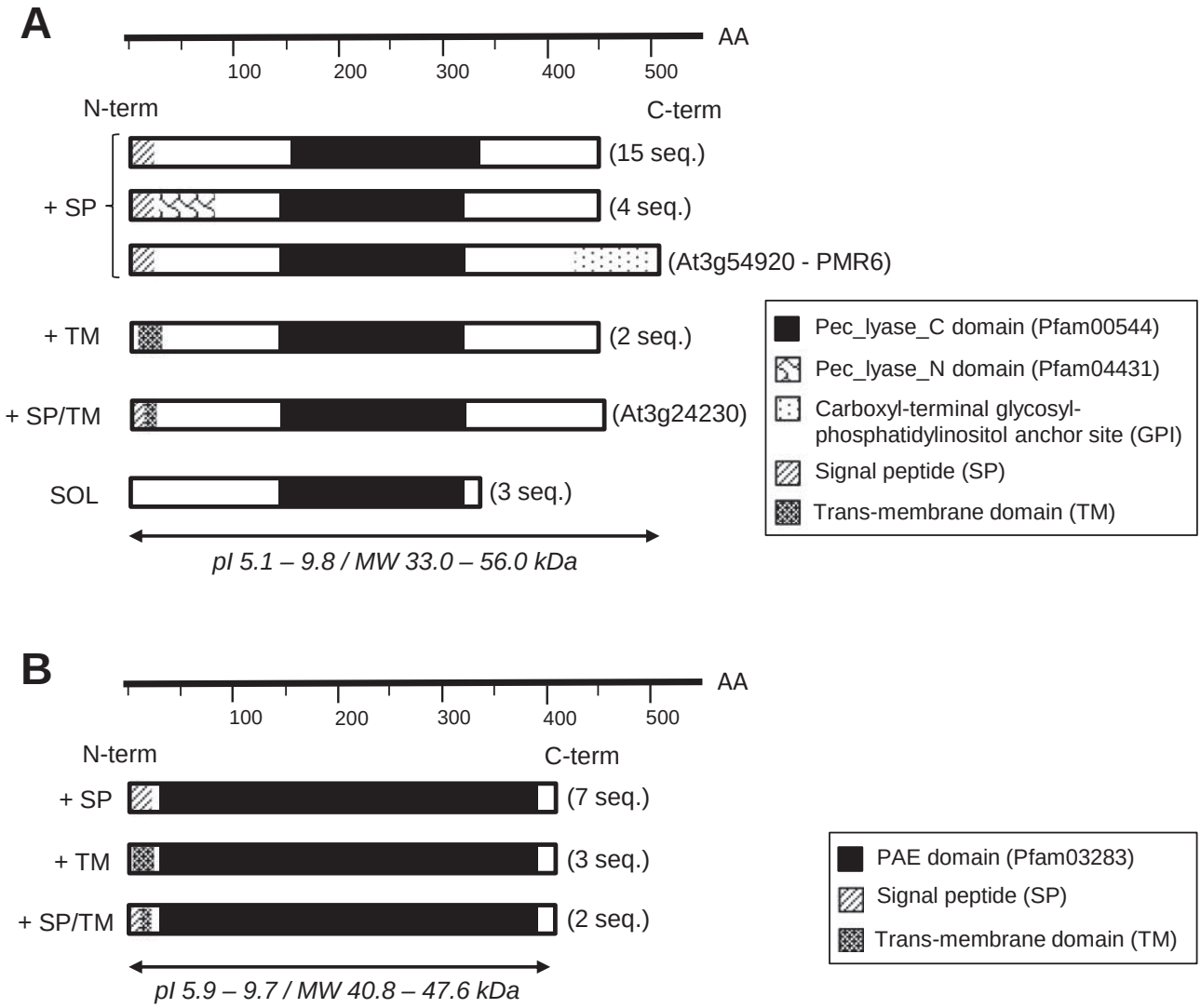


Fig. 2. *Arabidopsis* PLL (A) and PAE (B) structural motifs. The domains, average size of proteins in amino acid (AA), isoelectric point (pI), and molecular weight (MW) ranges of representative members are indicated according to the PFAM database (http://pfam.sanger.ac.uk/), SignalP4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), and ExPASyProtParam Tool (http://web.expasy.org/protparam/).

for this resistance (Vogel *et al.*, 2002; Sun and Van Nocker, 2010).

Concerning AtPAE, all 12 annotated sequences have a PAE domain (Pfam03283) and N-terminal targeting motifs (SP, TM, or SP/TM) (Fig. 2B). No isoform is predicted to be soluble.

HGMEs display distinct patterns of expression

A number of isoforms are co-expressed

Analysis of public microarray data sets for all genes encoding HGMEs has led to the identification of several non-exhaustive co-expression clusters in *A. thaliana* (Genevestigator, http://www.genevestigator.com; Hruz *et al.*, 2008). For instance, for the six clusters reported in this review, a number of genes encoding PME, PAE, PG, and PLL are co-expressed (Fig. 3). In cluster 1, six *PME* genes, five *PAE* genes, three *PG* genes, and 11 *PLL* genes are mainly co-expressed in seedlings, leaf, and root tissues. In contrast, the majority of these genes are not expressed in seed-related tissues. In this cluster, ~42% of *PAE* and *PLL* genes are present. Cluster 2 contains only *PME* and *PG* genes specifically expressed in root tissue, while cluster 3 shows *PME*, *PAE*, *PG*, and *PLL* genes expressed in all tissues selected for the analysis apart from roots. Cluster 4 comprises *PME*, *PG*, and *PLL* genes specifically co-expressed in pollen. The expression and roles of *At1g69940*, *At2g47030*, *At2g47040*, and *At3g62170* in pollen germination and pollen tube growth have been highlighted (Jiang *et al.*, 2005; Röckel *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2009*b*; Mollet *et al.*, 2013). In addition, several genes encoding PGs, PMEs, and PLLs are expressed in anthers (Gonzalez-Carranza *et al.*, 2002, 2007; Rhee *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2005; Francis *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2009*b*; Sun and Van Nocker, 2010) with the encoded proteins, namely AtPME At5g55590 and putative AtPG At4g20050, playing a role in pollen grain formation and tetrad separation (Rhee *et al.*, 2003; Francis *et al.*, 2006). Furthermore, transcriptomic analysis in the stamen abscission zone of *Arabidopsis* revealed a co-expression between

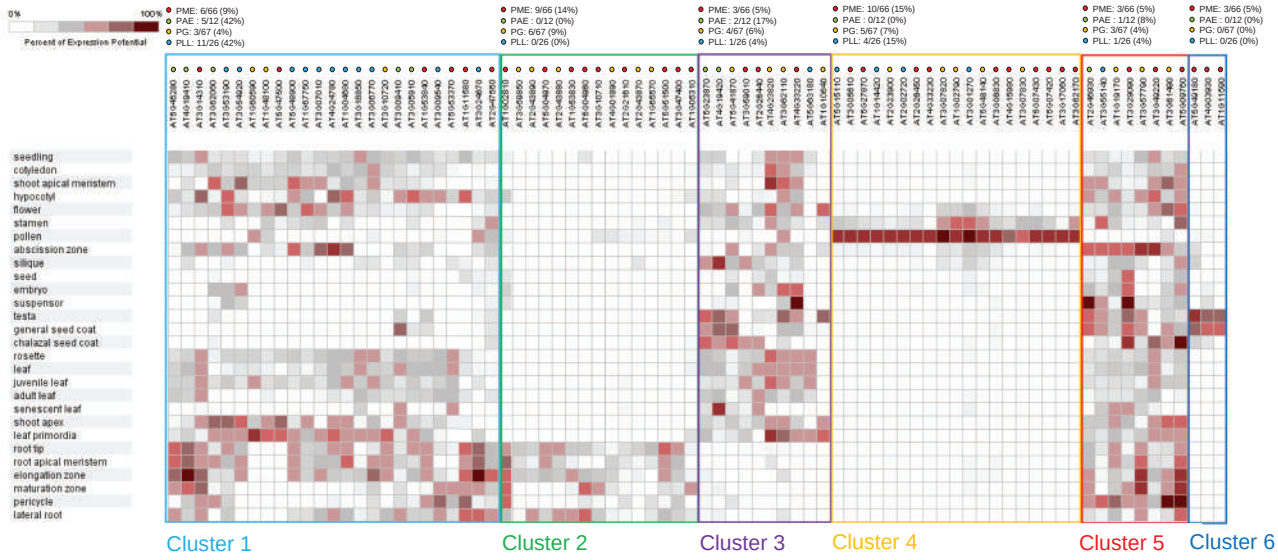


Fig. 3. Clustering analysis of *PME*, *PAE*, *PG*, and *PLL* mRNA expression during development in *A. thaliana*. PME (red circles), PAE (green circles), PG (orange circles), and PLL (blue circles) are shown together. Microarray data and cluster analysis was carried out using Genevestigator (https://www.genevestigator.com/gv/; Hruz *et al.*, 2008). Only some specific tissues were selected. Probes with a single gene and genes showing a minimal expression were used for the cluster analysis. In all clusters, for each HGME family, the proportion (%) of genes expressed among all family members is indicated.

PAE, *PME*, *PG*, and *PLL* genes (Lashbrook and Cai, 2008). In cluster 5, a few *PME*, *PAE*, *PG*, and *PLL* genes exhibit a ubiquitous expression. Interestingly, a small cluster composed of three *PME* genes only expressed in general and chalazal seed coat was also identified. It could relate to the emerging roles of PME–PMEI-mediated control of the DM of HG in mucilage structure and extrusion (Rautengarten *et al.*, 2008; Arsovski *et al.*, 2010; Saez-Aguayo *et al.*, 2013 Voiniciuc *et al.*, 2013). From this analysis, it appears that neither *PAE* nor *PLL* genes are specifically expressed in root and seed coat. In addition, no *PAE* genes appear to be solely expressed in pollen. In contrast, *PME* genes are identified in all of these clusters, potentially highlighting the major role of the control of the DM of HG in a large range of vegetative and reproductive developmental processes. Overall, this analysis shows that the control of HG structure and chemistry is likely to be a highly integrated process involving, in some developmental processes, several different HGMEs.

Regulation of HGME gene expression through hormone signalling

The gene expression of a number of HGMEs has been shown to be modulated, either directly or indirectly, through hormone signalling. A number of publications related to the analysis of phytohormone signalling, including mutants in hormone synthesis pathways and/or hormone application, report changes in the expression of several genes encoding HGMEs (Goda, 2004; Vanneste *et al.*, 2005; Che *et al.*, 2006; Laskowski *et al.*, 2006; Derbyshire *et al.*, 2007; Palusa *et al.*, 2007; Swarup *et al.*, 2008; Quesada *et al.*, 2009; Curvers *et al.*, 2010; Kanai *et al.*, 2010; Di Matteo *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Osorio *et al.*, 2011*a*; Savatin *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012; Braybrook and Peaucelle, 2013). This has consequences on the structure of HGs affecting plant development. It has also been shown that local auxin accumulation at the shoot apex of *A. thaliana* leads to local demethylesterification of HG, suggesting a role for auxin in the control of PME activity (Braybrook and Peaucelle, 2013). Several expression data sets reveal that auxin specifically regulates the expression of *PME*, *PAE*, *PG*, and *PLL* genes during various developmental events, such as lateral root emergence (Vanneste *et al.*, 2005; Laskowski *et al.*, 2006; Swarup *et al.*, 2008), adventitious root formation (Savatin *et al.*, 2011), fruit development (Quesada *et al.*, 2009; Osorio *et al.*, 2011*a*), and seedling development (Goda *et al.*, 2004; Palusa *et al.*, 2007). In addition, in the latter study, *PME*, *PAE*, and *PG* genes appeared to be up-regulated by brassinosteroids (BRs). Potential regulation of *PME* expression by BRs was also observed in the transcriptome analysis of mutant lines for the *Arabidopsis* transcription factor AtBZR1, responsible for regulating the expression of specific target genes involved in developmental processes as diverse as cell elongation and root development. Based on these results, *AtPME2* and *AtPME3* were identified as putative targets of AtBZR1 (Sun *et al.*, 2010). The regulation of *AtPME41* gene expression during chilling stress in *atbzr1-1D* and *atbri1*, two mutants of the BR signalling pathway, together with the recent data obtained using a PMEI overexpressor, reinforce the hypothesis of the control of PME by BRs (Qu *et al.*, 2011; Wolf *et al.*, 2012*b*). When considering other HGMEs, it has been shown that auxin, together with cytokinins, has an effect on the expression of *PLL* and PGIP (PG inhibitor protein) genes in shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture (Che *et al.*, 2006). In general, it is likely that all phytohormones directly or indirectly control HGME gene expression. For instance, gibberellic acids (GAs) have an effect on the expression of genes encoding PLLs and PMEs during rosette expansion in *A. thaliana* (Ribeiro *et al.*, 2012). This is consistent with results showing a change in PME activity and in the DM of pectins in GA-deficient mutants over the course

of hypocotyl growth (Derbyshire *et al.*, 2007). Abscisic acid (ABA) can also regulate development, through the modulation of changes in pectin. For example, ABA-deficient tomato mutants cause changes in pectin composition, including levels of Gal-A (Curvers *et al.*, 2010). This could be related to changes in the expression/activity of pectin-degrading enzymes such as PLLs, known to be regulated by this phytohormone (Palusa *et al.*, 2007), or in the expression of the gene encoding PGIP, which was suggested to control PG activity during germination (Kanai *et al.*, 2010). Identification of the major involvement of HGMEs in changes in fruit texture during maturation has prompted research into the role of ethylene in regulating their gene expression. Early work on tomato (Gaffe *et al.*, 1994) and banana (*Musa acuminata*) showed that PME and PL gene expression is ethylene dependent (Dominguez-Puigjaner *et al.*, 1997) during fruit maturation. More recently, several genes encoding PME, PMEI, PG, and PLL were shown to be strongly expressed in the early stages of banana ripening, a period corresponding to the burst in ethylene production (Mbéguié-A-Mbéguié *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2012). In tomato, the expression of one *PME* and one *PG* gene was associated with inhibition of ripening, when the ethylene receptor *Never-ripe* was mutated (Osorio *et al.*, 2011*b*). Similarly, the overexpression of the *FaPE1* gene, encoding a PME from strawberry (*Fragaria vesca*), led to up-regulation of the expression of one gene involved in the ethylene response (Osorio *et al.*, 2011*a*). In distinct species, several *PG* genes showed specific changes in gene expression, which were ethylene dependent in oil palm (Roongsattham *et al.*, 2012). The role of ethylene in the control of HGME gene expression might go beyond the specific case of fleshy fruit maturation as the *Arabidopsis* transcription factor AtRAP2.6L (a member of the ethylene response factor family), which has a function in shoot regeneration, targets the *AtPG* gene *At3g15720*, which was down-regulated in the *atrap2.6l* T-DNA mutant (Che *et al.*, 2006). These regulation pathways, in particular that of auxin, may be controlled through OG-mediated negative feedback (Ferrari *et al.*, 2013). The antagonism between auxin and OGs has previously been shown during root formation in tobacco (Bellincampi *et al.*, 1993) and by using exogenous OGs in maize seedlings (Peña-Uribe *et al.*, 2012). Exogenous OGs inhibit the expression of auxin-induced genes (*IAA5*, *SAUR16*, etc.), leading to inhibition of adventitious root formation (Savatin *et al.*, 2011). Inhibition by OGs targets late rather than early auxin-responsive genes (Mauro *et al.*, 2002). In *A. thaliana*, a few *PME* and *PG* genes showed significant changes in expression in response to treatment with OGs, which could be associated with calcium signalling pathways (Moscatiello *et al.*, 2006).

Regulation of biochemical activity

Mode of action and regulation of plant PMEs

As shown previously, PMEs are commonly present in plants and microorganisms such as fungi and bacteria (Giovane *et al.*, 2004; Pelloux *et al.*, 2007). In plants, several neutral and basic isoforms (Micheli, 2001; Giovane *et al.*, 2004; Verlent *et al.*, 2007; Jolie *et al.*, 2010; Dixit *et al.*, 2013), as well as a few acidic isoforms (Lin *et al.*, 1989; Bordenave and Goldberg, 1994; Mareck *et al.*, 1995; Micheli *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2000, 2002; Thonar *et al.*, 2006), have been identified. Although all isoforms catalyse the specific hydrolysis of methylester bonds at C-6 from Gal-A residues, and the subsequent formation of free carboxyl groups, release of methanol (MeOH), and acidification of the cell wall (Micheli, 2001; Giovane *et al.*, 2004; Pelloux *et al.*, 2007; Jolie *et al.*, 2010), PME activity is dependent upon a rather large range of factors. For instance, the presence of free carboxyl groups near the active site appears to be required for enzyme action, which might explain the affinity of PME for partially demethylesterified HG (Rexova-Benkova and Markovic, 1976; Bordenave, 1996; Grasdalen *et al.*, 1996; Van Alebeek *et al.*, 2003; Fries *et al.*, 2007). The reaction mechanism of PMEs, which act as monomers according to resolved crystallographic structures (Johansson *et al.*, 2002; Di Matteo *et al.*, 2005; Fries *et al.*, 2007), consists of a nucleophilic attack and an acid/base catalysis by conserved aspartate catalytic residues on the carbonyl carbon of the C-6 methylester of Gal-A (Fries *et al.*, 2007). Co-crystallization between *Erwinia* PME and various substrates highlighted a preference towards substrates with an alternation of methylesterified and non-methylesterified Gal-A residues, corresponding to partially methylesterified HGs. Consequently, the presence of methylesterified Gal-A residues upstream and non-methylesterified Gal-A residues downstream of the catalytic site could determine the processive action of *Erwinia* PME (Fries *et al.*, 2007). Moreover, recent results using molecular dynamics approaches on the *Erwinia* PME suggest that the rotation of the substrate is necessary for access to the subsequent site and the processive demethylesterification of HG by the enzyme (Mercadante *et al.*, 2013). A similar mechanism could be hypothesized for plant PMEs that have a similar mode of action.

Several factors can affect plant PME activity, which appears to be very sensitive to changes in pH and in the concentrations of cations (Catoire *et al.*, 1998; Denès *et al.*, 2000; Ly-Nguyen *et al.*, 2004; Do Amaral *et al.*, 2005; Verlent *et al.*, 2007; Jolie *et al.*, 2009; Dixit *et al.*, 2013). The effect of pH on PME activity may be related to the pI of the isoforms, which is neutral to alkaline for most plant and bacterial PMEs and acidic to neutral for fungal PMEs. In an acidic environment, alkaline plant PMEs may be positively charged and poorly active due to a strong interaction between PMEs and the negatively charged free carboxyl groups of HG. This has consequent effects on growth (Fig. 4). In contrast, at slightly alkaline pH, basic isoforms are less positively charged and can be released from the substrate due to electrostatic repulsion between the enzyme and the free carboxyl groups (Bordenave, 1996; Jolie *et al.*, 2010). However, as some acidic plant PMEs have been identified in various species such as flax (Mareck *et al.*, 1995), mung bean (Bordenave and Goldberg, 1994), jelly fig (Lin *et al.*, 1989; Ding *et al.*, 2000, 2002), chicory (Thonar *et al.*, 2006), and aspen (Micheli *et al.*, 2000), distinct scenarios are likely to occur in the cell wall (Fig. 4). Thus, the control of the DM of pectins probably depends on the recruitment of specific PME pools, according to the DM of the substrate,

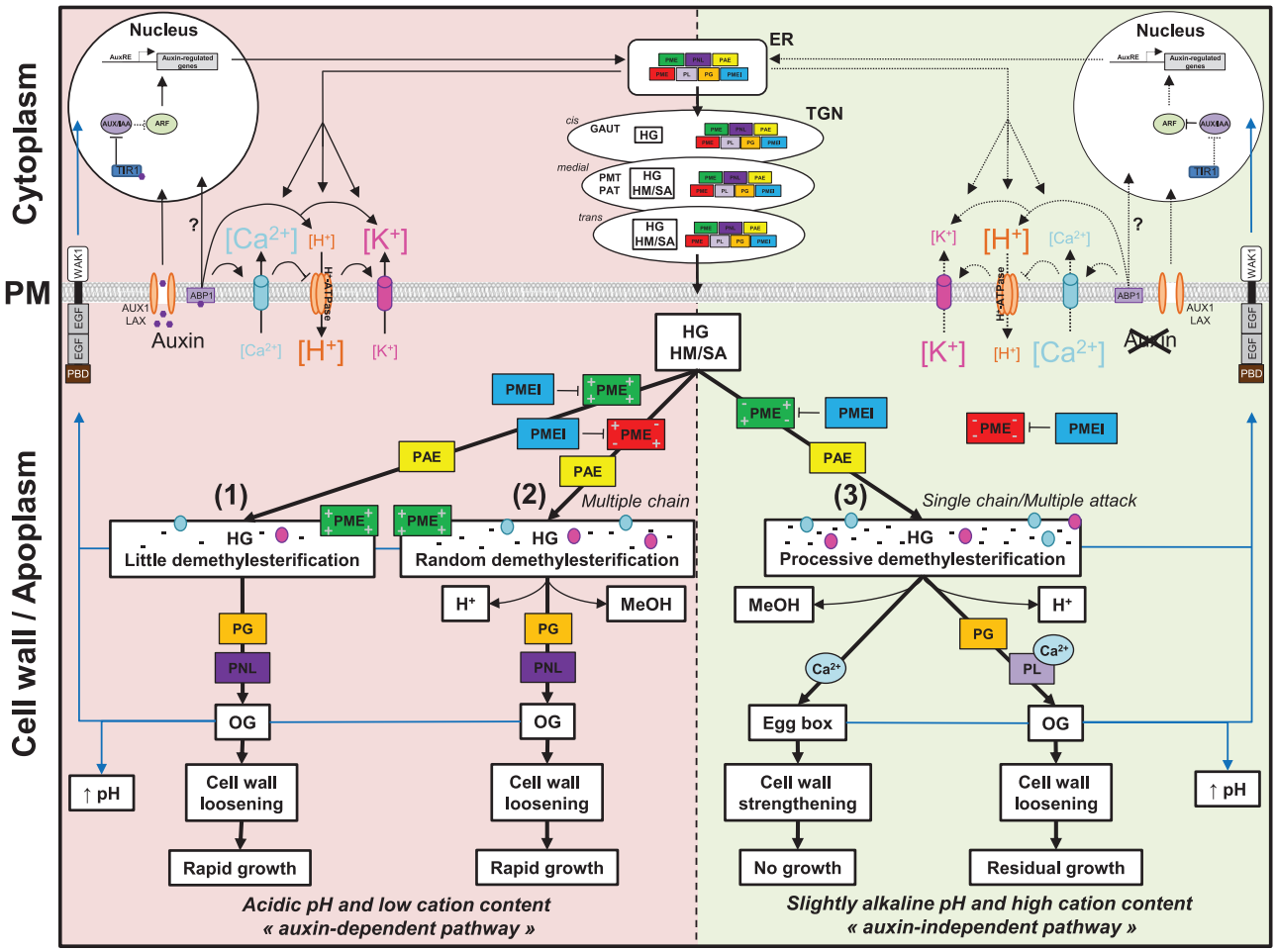


Fig. 4. Schematic diagram showing the regulation of HGME pools in distinct cell wall microenvironments and consequent effects on growth. In the presence of auxin, the auxin-binding protein 1 (ABP1) receptor, localized at the plasma membrane (PM), activates Ca^{2+} and K^+ influx into the cytoplasm (Philippar *et al.*, 1999, 2004; Shishova and Lindberg, 2010; Perrot-Rechenmann, 2010; Tromas *et al.*, 2010; Sauer and Kleine-Vehn, 2011) as well as H^+-ATPase, leading to H^+ efflux into the cell wall and acidification of the apoplasm (Perrot-Rechenmann, 2010; Tromas *et al.*, 2010; Sauer and Kleine-Vehn, 2011). In parallel, auxin imported into the cytoplasm through AUX1/LAX penetrates the nucleus, where it acts on the expression of auxin-regulated genes via the action of TIR1, AUX/IAA, and ARF proteins (Robert and Friml, 2009; Shishova and Lindberg, 2010; Hayashi, 2012). ABP1 can induce downstream responses by regulating gene expression (Rayle and Cleland, 1992; Rober-Kleber *et al.*, 2003; Perrot-Rechenmann, 2010; Monshausen *et al.*, 2011), including that of *HGME* genes (Vanneste *et al.*, 2005; Laskowski *et al.*, 2006; Swarup *et al.*, 2008). PMEs (red, green), PAEs (yellow), PNLs (dark purple), PGs (orange), and PMEIs (blue) are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) and matured in the *trans*-Golgi network (TGN), before secretion into the cell wall (Wolf *et al.*, 2009*b*; De Caroli *et al.*, 2011*a*, *b*). In parallel, HGs are synthesized in the *cis*-Golgi by galacturonosyltransferases (GAUTs), methylesterified and acetylated by pectin methyltransferases (PMTs) and pectin acetyltransferases (PATs), respectively, in the medial-Golgi, and secreted into the cell wall as highly methylesterified (HM) and slightly acetylated (SA) forms (Atmodjo *et al.*, 2013). In an acidic cell wall context (left), basic PMEs (in green), which are the major PME isoforms, are strongly positively charged (represented by positive symbols) and can be trapped by free carboxyl groups (represented by negative symbols) (Jolie *et al.*, 2010) (1). In parallel, acidic pH stimulates inhibition of basic PMEs by several PMEIs (Raiola *et al.*, 2004). This leads to a decrease in HG demethylesterification. HGs can become targets of PG and PNL, which depolymerize HGs, leading to the release of OGs, cell wall loosening, and rapid growth. In the same conditions, acidic PMEs (in red) are neutrally charged (represented by positive and negative symbols) and can act on HGs by multiple chain demethylesterification and/or be inhibited by PMEIs (2) (Catoire *et al.*, 1998; Denès *et al.*, 2000). Following PME action, PAEs can deacetylate HGs (Williamson, 1991; Bordenave *et al.*, 1995). Randomly demethylesterified and deacetylated HGs are depolymerized by PGs and PNLs (Pressey and Avants, 1973; Themmen *et al.*, 1982; Mayans *et al.*, 1997; Protsenko *et al.*, 2008), leading to the release of OGs, cell wall loosening, and rapid growth. OGs can increase the apoplasmic pH and control gene expression through binding to membrane receptors such as PBD-EGF-EGF-WAK1 (Wolf *et al.*, 2012*a*; Ferrari *et al.*, 2013). In the absence of auxin (right), H^+ is not imported into the cell wall, and Ca^{2+} and K^+ are not exported into the cytoplasm. Consequently, the cell wall is slightly alkaline with a high ionic concentration. Auxin-independent *HGME* genes can be expressed, generating distinct pools. In these conditions, acidic PMEs (in red) are strongly negatively charged (represented by negative symbols). By electrostatic repulsion with the free carboxyl group, acidic PMEs cannot bind to their substrate. In parallel, basic PMEs (in green) are less positively or neutrally charged (represented by positive and negative symbols) and can bind to HG HM/SA (Jolie *et al.*, 2010). Slightly alkaline pH can decrease PME–PMEI complex formation and stability, but other PMEIs showing various pH sensitivities can be stimulated and inhibit acidic and basic PMEs (Raiola *et al.*, 2004). Basic PMEs perform the demethylesterification of the HG HM/SA, by single chain or multiple attacks, leading to processively demethylesterified HG (Catoire *et al.*, 1998; Denès *et al.*, 2000; Ngouémazong *et al.*, 2012). PAEs could subsequently act on processively demethylesterified HGs (Williamson, 1991; Bordenave *et al.*, 1995). Depending on Ca^{2+} content and PG/PL presence, processively demethylesterified and deacetylated HGs can form so-called egg box structures through binding with Ca^{2+}, leading to cell wall strengthening and growth retardation (3). Several basic PGs and PLs, stimulated by Ca^{2+} (Pressey and Avants, 1973; Themmen *et al.*, 1982; Protsenko *et al.*, 2008; Chotigeat *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010), can depolymerize HG to form OGs, which could increase apoplasmic pH and lead to residual growth. The egg box and OGs can regulate gene expression

the pI of the isoforms, and the pH microenvironment at the cell wall. Therefore, depending on the patterns of demethylesterification produced, the properties of pectin are likely to be modified and could differentially affect cell wall rheology and cell growth (Fig. 4).

In plants, cations are often essential for PME activity (Jolie *et al.*, 2010). Although some salt-independent plant PME isoforms have been described, PME activity normally increases up to an optimal cation concentration, above which it decreases (Do Amaral *et al.*, 2005; Verlent *et al.*, 2007; Jolie *et al.*, 2009; Videcoq *et al.*, 2011; Dixit *et al.*, 2013). This optimal concentration is highly dependent upon the type of cation. For example, some salts, such as NaCl or KCl, have a positive effect on the activity up to a certain range of concentration, while others, such as LiCl, are strong inhibitors regardless of the concentration (Do Amaral *et al.*, 2005; Verlent *et al.*, 2007; Dixit *et al.*, 2013). This latter effect is related to competition between cations and positively charged PMEs for interaction with the free carboxyl groups of HG (Fig. 4). In acidic or slightly alkaline cell wall contexts, basic PMEs, positively charged, could be more sensitive to the ionic environment than acidic PMEs.

Different modes of action of plant PMEs have been reported. Three mechanisms have been described: (i) a single-chain mechanism, where PMEs remove all contiguous methylesters from a single chain of HG before dissociating from the substrate; (ii) a multiple-attack mechanism, in which several PMEs catalyse the release of a limited number of methylesters on several chains of HG; these two modes of action produce similar processively demethylesterified HG and are often attributed to basic PMEs, in plants and in bacteria (Johansson *et al.*, 2002; Willats *et al.*, 2006; Jolie *et al.*, 2010); (iii) a multiple-chain mechanism, where PMEs remove only one methylester before dissociating from Gal-A. This mechanism is likely to be that of acidic PMEs in plants and in fungi (*Aspergillus* sp.) and allows a random demethylesterification (Micheli, 2001; Johansson *et al.*, 2002; Willats *et al.*, 2006; Jolie *et al.*, 2010). However, fungal PME from *Trichoderma reesei* shows a processive demethylesterification. Thus these different modes of action are probably dependent upon several factors including the enzyme properties characterized by the pH and ionic environment as well as the substrate specificity, rather than the origin of PMEs (Denès *et al.*, 2000; Johansson *et al.*, 2002; Videcoq *et al.*, 2011). In fact, the action of apple PME has been shown to be pH dependent, with a possible shift between a blockwise and non-blockwise mode of action (Catoire *et al.*, 1998). In addition, the activity of isoforms can vary for the same given substrate (Ly-Nguyen *et al.*, 2004; Do Amaral *et al.*, 2005; Jolie *et al.*, 2009).

Plant PMEs can also be regulated by inhibition of their activities by proteinaceous or non-proteinaceous compounds. Protein inhibitors of plant PMEs (PMEIs) can form a stoichiometric 1:1 complex with PMEs (Di Matteo *et al.*, 2005), leading to an inhibition of PME activity which is dependent on the pH and ionic environment of the cell wall (Bellincampi *et al.*, 2004; Giovane *et al.*, 2004; Raiola *et al.*, 2004). Like PMEs, PMEIs belong to large multigenic families in plants, which further questions the occurrence of specific PME–PMEI pairs in the cell wall. Non-proteinaceous compounds include a wide range of substances including OGs, iodine, detergents, tannins, phenolic acids, glycerol, some sugars, and epigallocatechingallate (Rexova-Benkova and Markovic, 1976; Lewis *et al.*, 2008).

Regulation of biochemical activity of plant PAEs

In plant cell walls, several polysaccharides such as pectins, XyGs, xylans, and mannans can be acetylated (Ishii, 1997; Ralet *et al.*, 2005; Scheller and Ulvskov, 2010; Orfila *et al.*, 2012). However, acetyl groups are not distributed homogeneously in the cell wall, and for pectins they are mainly clustered in specific regions of HG and RG-I, as shown in sugar beet (Ralet *et al.*, 2005; Orfila *et al.*, 2012). Gal-A residues from RG-I can be *O*-acetylated at the O2 and/or O3 positions (Ishii, 1997), while Gal-A from the HG backbone can be *O*-acetylated at the O2 or O3 position, but not di-acetylated (Ralet *et al.*, 2005). In the HG backbone, the simultaneous presence of acetyl and methyl groups on the same Gal-A residues is observed infrequently, but might influence either PME or PAE activities (Ralet *et al.*, 2005). Several investigations have indicated an effect of acetylation on pectin properties. The presence of acetyl groups on Gal-A of HG has an effect on cell wall viscosity (Gou *et al.*, 2012; Orfila *et al.*, 2012) and impairs the formation of Ca^{2+} bonds between HG chains (Renard and Jarvis, 1999; Turquois *et al.*, 1999). Acetylation can also hinder the degradation of HG by some endo-PGs (Bonnin *et al.*, 2003). The deacetylation of HG by enzymatic activity is thus likely to be necessary to trigger changes in the cell wall mediating plant growth.

In this context, PAEs can act by specific hydrolysis of acetylester bonds at O2 and/or O3 from Gal-A residues, making up the linear HG and RG-I of pectins (Gou *et al.*, 2012). Indeed, partial deacetylation of HG improved the gelation properties of sugar beet (Williamson, 1991; Ralet *et al.*, 2003) and increased the enzymatic degradation of pectins (Biely *et al.*, 1986; Schols and Voragen, 1994; Chen and Mort, 1996; Benen *et al.*, 1999; Bonnin *et al.*, 2003). PAE enzymes have been identified in plants (Williamson, 1991; Bordenave *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1996), bacteria (Shevchik and Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997; Bolvig *et al.*, 2003; Shevchik and Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2003), and fungi (Kauppinen *et al.*, 1995; Bonnin *et al.*, 2008). Generally, they act specifically on HG and RG-I polymers and seem to be inactive against acetyl groups present in XyGs, xylans, and

through their binding to membrane receptor such as PBD-EGF-EGF-WAK1 (Wolf *et al.*, 2012*a*; Ferrari *et al.*, 2013). Otherwise, in acidic or slightly alkaline cell wall contexts, basic PMEs, positively or neutrally charged, could be more sensitive to the ionic environment than acidic PMEs. Particularly in a slightly alkaline cell wall context, basic PMEs could be in competition with cations such as K^+ (pink circle) and Ca^{2+} (light blue circle) for interaction with free carboxyl groups of HG, avoiding basic PME trapping by processively demethylesterified HG. The solid arrows correspond to the actions taking place in the presence of auxin (purple circle), whereas dotted arrows represent the lack of action when there is no auxin signal.

mannans (Bolvig *et al.*, 2003; Bonnin *et al.*, 2008). This differentiates them from rhamnogalacturonan acetylesterase from *Aspergillus aculeatus*, which is highly specific for RG-I and does not deacetylate HG (Kauppinen *et al.*, 1995). In *Arabidopsis*, the majority of PAE isoforms have a neutral to basic pI. Purified plant PAEs characterized from mung bean and orange, which are highly active against synthetic substrates such as triacetin and *p*-nitrophenyl acetate and sugar beet pectins, have an optimal activity at pH ranging from 5 to 6.5, depending on the substrates used in the assay (Williamson, 1991; Bordenave *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1996). Moreover, PAE activity is increased when the substrate has previously been demethylesterified (Williamson, 1991; Bordenave *et al.*, 1995; Oosterveld *et al.*, 2000). Therefore, a synergistic effect between PME and PAE is likely to occur at the cell wall to mediate either egg box formation or degradation of HG by PGs and PLLs.

Mode of action and regulation of plant PGs

PGs belong to an enzyme family identified in plants (Pressey *et al.*, 1973, 1977; Themmen *et al.*, 1982; Nogota *et al.*, 1993; Chun and Huber, 1998; Hadfield and Bennett, 1998; Pathak and Sanwal, 1998; Pathak *et al.*, 2000; Verlent *et al.*, 2004, 2005), herbivorous insects (Shen *et al.*, 2003), and microorganisms such as bacteria, fungi, and nematodes (Pickersgill *et al.*, 1998; Jaubert *et al.*, 2002; André-Leroux *et al.*, 2005; Jayani *et al.*, 2005; Kars *et al.*, 2005; Mertens and Bowman, 2011). Whatever their origin, PGs cleave by hydrolysing the α-(1–4) bonds linking D-Gal-A residues, mainly from the HG linear homopolymer (Brummell and Harpster, 2001; Verlent *et al.*, 2005; Protsenko *et al.*, 2008). In both plants and microorganisms, PGs are constituted of two types, the endo-PGs (EC 3.2.1.15) and the exo-PGs (EC 3.2.1.67) (Brummell and Harpster, 2001; Verlent *et al.*, 2005; Protsenko *et al.*, 2008). Generally, their activities increase with the decrease in the DM of HG (Thibault and Mercier, 1979; Bonnin *et al.*, 2002). Consequently, and in agreement with previous comments, prior action of PME seems to be necessary to enable the degradation of HGs by plant PGs and, for the same DM, the pattern of demethylesterification could affect the action of plant PGs (Verlent *et al.*, 2005). For example, PG isolated from tomato prefers HG previously demethylesterified blockwise by the endogenous PME of tomato, rather than randomly demethylesterified by the exogenous fungal PME of *A. aculeatus* (Verlent *et al.*, 2005). More precisely, endo-PGs catalyse the hydrolytic cleavage of the α-(1–4) linkage between at least two demethylesterified Gal-A residues of the HG backbone with a random action pattern, leading to the formation of OGs of various degrees of polymerization (DPs; Verlent *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2013). In plants, endo-PGs particularly prefer HG with a chain region containing more than four demethylesterified Gal-A residues between methylesterified Gal-A (Clausen *et al.*, 2003; Protsenko *et al.*, 2008). Consequently, endo-PGs could act against HG demethylesterified blockwise, and the variation of the demethylesterification pattern may regulate the action of endo-PGs. In contrast, exo-PGs act only at the terminal position of the HG backbone to hydrolyse the α-(1–4) linkage, producing monogalacturonides (Verlent *et al.*, 2005; Protsenko *et al.*, 2008). In this case, they could act together against HG, which is partially, randomly, or blockwise demethylesterified at the terminal position.

In plants such as *Arabidopsis*, all isoforms have a pI varying from 4.8 to 9.8 (Cao, 2012), which could regulate their optimum activity depending on the pH and the ionic microenvironment. With regard to pH, several plant PGs have been partially purified from plants and biochemically characterized. Overall, like PGs from microorganisms such as *Botrytis cinerea*, that show optimal activities at approximately pH 4.5 (Kars *et al.*, 2005), plant PGs prefer an acidic pH from 3.3 to 6 (Pressey *et al.*, 1973, 1977; Themmen *et al.*, 1982; Nogota *et al.*, 1993; Chun and Huber, 1998; Pathak and Sanwal, 1998; Pathak *et al.*, 2000; Verlent *et al.*, 2004). Furthermore, the pH of optimal activity of plant PGs seems to be dependent on the ionic microenvironment. For example, PG purified from tomato shows an optimal activity at pH 4–4.5 with NaCl, compared with pH 5–6 in the presence of KCl (Chun and Huber, 1998). Other ions such as Cd^{2+} and Ca^{2+} could affect PG activity in *Avena sativa* (Pressey *et al.*, 1977). Regarding Ca^{2+}, an exo-PG from peach fruit is Ca^{2+} dependent (Pressey *et al.*, 1973) as is an endo-PG from strawberry fruit because with EDTA, which chelates Ca^{2+} ions, PG activity is inhibited (Nogota *et al.*, 1993). Nevertheless, not all plant PGs are Ca^{2+} dependent. For instance, among three PG isoforms isolated from banana, where two endo-PGs (PG1 and PG3) and one exo-PG (PG2) are characterized, only PG1 was shown to be activated by Ca^{2+} (Pathak *et al.*, 1998). Consequently, ion dependence does not seem to be related to the mode of action of PGs (endo- or exo-PGs).

PG activity can also be inhibited by proteinaceous compounds (Juge, 2006; Protsenko *et al.*, 2008). It has been widely demonstrated in plants that there are PGIPs directed against secreted pathogen PGs (Federici *et al.*, 2001; Di Matteo *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2006; Oelofse *et al.*, 2006; Sathiyaraj *et al.*, 2010; Benedetti *et al.*, 2011). Plant PGIPs are bound to HG substrate as a guardian, thus inhibiting pathogen PG activity by formation of a stoichiometric complex, which prevents access to the substrate (Spadoni *et al.*, 2006). More precisely, when PGIPs interact with pathogen PG, the complex formed can move the substrate away, thus preventing PG action against the HG substrate (Spadoni *et al.*, 2006). Moreover, it appears that PGIPs act mainly against endo-PGs from pathogens (Protsenko *et al.*, 2008). This is confirmed by the mode of action of PGIPs, which bind strongly to HG demethylesterified blockwise, in contrast to HG randomly demethylesterified, and prevent the action of endo-PGs (Spadoni *et al.*, 2006). Currently, limited data indicate a role for plant PGIPs in the regulation of plant PG activity and development. However, a recent publication shows changes in radicle protrusion in *pgip1* mutants and PGIP1 overexpressors, probably caused by an alteration of *Arabidopsis* PG activity (Kanai *et al.*, 2010).

Mode of action and regulation of plant PLLs

PLLs are mainly found in plants (Domingo *et al.*, 1998; Chourasia *et al.*, 2006; Chotigeat *et al.*, 2009; Wang *et al.*,

2010) and microorganisms such as bacteria, fungi, and nematodes (Popeijus *et al.*, 2000; Jayani *et al.*, 2005). They cleave, by β-elimination, the α-(1–4) bond linking methylesterified or non-methylesterified D-Gal-A units mainly from the HG backbone, giving rise to an unsaturated C4–C5 bond at the non-reducing end of the newly formed OG (Mayans *et al.*, 1997; Pilnik and Rombouts, 1981). PLLs comprise the PL and PNL family of enzymes. PLs are more specific for non-methylesterified or slightly methylesterified HG and require Ca^{2+} for their activity whose optimal pH is near 8.5. In contrast, PNLs degrade highly methylesterified HG with an optimal pH of 5.5 for their activity and do not require Ca^{2+} (Mayans *et al.*, 1997; Herron *et al.*, 2000). PLs have both endo (EC 4.2.2.2) and exo (EC 4.2.2.9) activities, while only endo (EC 4.2.2.10) activity has been discovered for PNLs (Sinitsyna *et al.*, 2007). PLs and PNLs are commonly found in microorganisms; fungi usually secrete PNLs (Sinitsyna *et al.*, 2007) while bacteria produce predominantly PLs (Payasi and Sanwal, 2003).

To date, of PNLs and PLs, only PLs have been discovered and biochemically characterized in plants. For instance, the plant PL from *Zinnia elegans* shares homology with the microbial PLs from *Bacillus subtilis* and *Pectobacterium carotovorum* (Domingo *et al.*, 1998). Moreover, the presence of PL isoforms has been demonstrated in plants such as *Hevea brasiliensis*, *Z. elegans*, and *Gossypium hirsutum*, and in the ripening fruits of banana. More precisely, coding sequences isolated from these latter and expressed in a heterologous system led to the production of *Escherichia coli* or yeast expressed recombinant enzymes showing PL activities (Domingo *et al.*, 1998; Pua *et al.*, 2001; Chotigeat *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). PLs from pathogens are rather active at alkaline pH (Jayani *et al.*, 2005); recombinant PLs from *H. brasiliensis*, *Z. elegans*, and mango fruit also show optimal activities at basic pH, namely pH 7, 10, and 8, respectively (Domingo *et al.*, 1998; Chourasia *et al.*, 2006; Chotigeat *et al.*, 2009). Moreover, as in microorganisms, PL activity from *H. brasiliensis* and mango fruit is inhibited by EDTA and stimulated by $CaCl_2$ (Mayans *et al.*, 1997; Chourasia *et al.*, 2006; Chotigeat *et al.*, 2009). A multiple sequence alignment suggests that the calcium-binding site of plant PLs could be conserved and may involve three aspartate residues (Chotigeat *et al.*, 2009). Lastly, plant PLs, like those from bacteria (*E. chrysanthemi*), seem to be more active against non-methylesterified HG because their optimal activities have often been quantified with non-methylesterified substrates (Tardy *et al.*, 1997; Chotigeat *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). To date, a PNL inhibitor protein has been found (Bugbee, 1993), but no proteic inhibitor of PL enzyme.

Roles of HG modifications in vegetative and reproductive development

Early reports showed the multiple roles of pectin modifications in the control of vegetative development (Hasunuma *et al.*, 2004; Pilling *et al.*, 2004). The current review focuses on the role(s) of HGME-mediated HG modification during cell elongation and differentiation in specific developmental processes.

Roles of HGMEs in organ growth

Understanding the role of pectin modifications in the control of growth requires the use of simple models in which developmental and cell biology, genomics, biochemistry, and biophysics can be integrated at a cellular level. The pollen tube, such as dark-grown hypocotyl, is a powerful system to analyse the roles of the cell wall in modulating cell elongation.

PMEs have been reported to play a role in pollen grain formation. In *A. thaliana*, the *atqrt1* mutant, which does not express the *AtQRT1* gene encoding a PME (At5g55590), does not show cell wall degradation and separation of the haploid spores during microsporogenesis (Francis *et al.*, 2006). Consequently, the spores remain fused and pollen grains are released as tetrads. The modifications of HGs by PMEs could play a central role in the first step of wall degradation, by creating substrates for pectin-degrading enzymes. A similar phenotype was shown for mutants in the *AtQRT3* gene encoding a putative PG (At4g20050; Rhee *et al.*, 2003). A model was proposed in which the action of PME would create specific substrates for downstream enzymes. The structure of the pollen grain might be a determinant of the subsequent capacity for pollen tube emergence. In *A. thaliana*, the *AtVGD1* gene (*At2g47040*), which encodes a PME, is involved in pollen tube elongation. The *atvgd1* knockout (KO) mutant showed a slight reduction in pollen PME activity together with a retarded pollen tube growth within the style and transmitting tract. In addition, the pollen tube had an abnormal shape with frequent tip explosions (Jiang *et al.*, 2005). The mutant had lower than wild-type levels of pollen fertility, and hence smaller siliques with fewer seeds. A similar phenotype, albeit less drastic, was observed for the *AtPPME1* KO mutant (Tian *et al.*, 2006). In other species, such as *Nicotiana tabacum*, silencing of *NtPPME1*, encoding the main tobacco PME isoforms, led to a decrease in pollen tube growth (Bosch and Hepler, 2006). Recent advances in the understanding of the role of HG modifications in pollen tube elongation include the tight spatial and temporal regulation of PMEs by PMEIs. For instance, it was shown that AtPMEI2 inactivates AtPPME1 *in vitro* and that both proteins are located in the pollen tube where they physically interact (Röckel *et al.*, 2008). More recently, *BoPMEI1*, a novel *Brassica oleracea* gene, was characterized (Zhang *et al.*, 2010). Heterologously expressed BoPMEI1 showed PMEI activity while a transgenic *Arabidopsis* plant, expressing antisense *BoPMEI1*, suppressed the expression of the orthologous gene *At1g10770* altering pollen tube growth. The fine control of PME activity modulates HG structure on the lateral sides of the pollen tube, with consequences on cell wall rheology, enabling apical growth. In contrast to PMEs, the functional characterization of the roles of PAEs, PGs, and PLLs in pollen tube growth has remained elusive. However, a recent report showed a role for the control of the DA of pectins in pollen tube growth (Gou *et al.*, 2012). In *Brassica campestris*, a putative BcPG encoded by *BcMF2* is specifically expressed in tapetum and

pollen after the tetrad stage of anther development. In a transgenic plant with reduced levels of *BcMF2* expression, mature pollen presents a distorted morphology with abnormal intine development, leading to abnormal pollen tube growth and a consequent reduction in male fertility (Huang *et al.*, 2009*a*). In the same species, *BcMF9*, encoding a distinct BcPG, was shown to play a role in intine and exine formation (Huang *et al.*, 2009*b*). It is therefore likely that PGs are involved in the changing intine cell wall structure affecting subsequent pollen tube development. Similarly, the activity of PL Cry j I, expressed in pollen of *Cryptomeria japonica*, could cause cell wall loosening during pollen development, thus improving pollen tube emergence and growth as well as its penetration within the style (Taniguchi *et al.*, 1995). Overall, recent data generated about the control of HG structure, including the role of HG acetylation (Gou *et al.*, 2012) during pollen development, have enabled new models to be established linking pollen tube growth to the spatial distribution of polysaccharides (Zonia and Munnik, 2011; Chebli *et al.*, 2012; Mollet *et al.*, 2013).

On the vegetative side, PME play a role in the early stages of radicle emergence, as shown by the faster germination rate in *A. thaliana* plants overexpressing *AtPMEI5* (Müller *et al.*, 2013). PME activity would therefore modulate the mechanical properties of the cell wall, between opposing forces of radicle elongation and resistance of the endosperm. PG activity can also be involved in radicle protrusion. For example, when the *AtPGIP1* gene, which is regulated by the transcription factor ABA insensitive 5 (ABI5), is mutated or overexpressed, PG activity is modified, leading to changes in the seed coat mucilage released and the timing of radicle protrusion (Kanai *et al.*, 2010). Seed coat mucilage production has been shown to be affected by PME (Rautengarten *et al.*, 2008; Voiniciuc *et al.*, 2013; Saez-Aguayo *et al.*, 2013).

Once germinated, dark-grown hypocotyl has a simple anatomy that elongates, in the absence of cell division, from 10 µm up to 1 mm during post-embryonic development (Gendreau *et al.*, 1997). Previous work has shown that the initial elongation rate of hypocotyl cells is developmentally controlled. At first, all cells elongate uniformly and slowly up to 48 h after germination, after which abrupt growth acceleration takes place (Refregier *et al.*, 2004). An important relationship has been demonstrated between the DM of HGs in primary cell wall and hypocotyl elongation in *A. thaliana*, as well as other species (Al-Qsous *et al.*, 2004; Paynel *et al.*, 2009). First, two mutants deficient in GA biosynthesis (*ga1-3* and *gai*) showed changes in the DM of HGs, with consequences on hypocotyl length (Derbyshire *et al.*, 2007). More recently, microarray analysis in *A. thaliana* showed that several genes, encoding PMEs, PMEIs, PGs, and PLLs, were up- or down-regulated at the growth phase transition (Pelletier *et al.*, 2010). The down-regulation of PME expression, using the *atpme3* KO mutant, had consequences on hypocotyl length (Guénin *et al.*, 2011). The overexpression of one of these genes, *AtPMEI4* (*At4g25250*), increased carboxylic ester bonds in the primary cell wall of dark-grown hypocotyls and delayed growth (Pelletier *et al.*, 2010). A similar approach showed that the overexpression of *AtPMEI5* (*At2g31430*) had dramatic effects on plant growth, including a drastic reduction in dark-grown hypocotyl length (Wolf *et al.*, 2012*b*). It was further shown that feedback signalling from the cell wall is integrated by the BR signalling module to ensure homeostasis of cell wall biosynthesis and remodelling. This adds a new component to understanding the regulation and roles of pectin modifications in the control of growth rate. BRs have been shown to modulate PME activity and the expression of specific PME genes (Qu *et al.*, 2011). Surprisingly, the overexpression of another *PMEI*, *AtPMEI-2*, did not show similar results (Lionetti *et al.*, 2010). This suggests that, depending on the PMEI used, specific PME targets could be present or absent, with consequences on the cell wall and growth phenotype. This introduces a fascinating perspective in understanding the role of the sensing of cell wall integrity and its consequences on modulating cell growth (Kohorn and Kohorn, 2012).

When considering root growth, a study showed that the *AtPME3* gene encoding one of the major PME isoforms in *A. thaliana* plays a role in controlling root elongation. The *atpme3* KO mutant, which showed decreased PME activity, had a 20% reduction in root length compared with the wild type, while *AtPME3* overexpressors showed the opposite phenotype (Hewezi *et al.*, 2008). By using a distinct KO allele, it was shown that the reduction in PME activity in the *atpme3* mutant correlated with an increased DM of HGs (Guénin *et al.*, 2011). The control of PME activity by specific PMEIs is likely to play a key role in the regulation of root growth. Transgenic plants overexpressing *AtPMEI-1* and *AtPMEI-2* showed a 50% decrease in PME activity and an increased root length compared with the wild type; this was notably related to changes in cell size in the root expansion zone (Lionetti *et al.*, 2007). These changes were associated with modifications in leaf shape/size. Recent data demonstrated a link between expression of specific PME genes and the Al-induced inhibition of root elongation in rice (Yang *et al.*, 2012). Interestingly, the number of adventitious roots was modified in PME mutants, suggesting that these enzymes influence both root elongation and root differentiation (Guénin *et al.*, 2011).

Roles of HGMEs in organ formation

As mentioned previously, the changes in the pectic network affect root emergence as shown by the modifications of the number of adventitious roots in specific *atpme* KO mutant lines (Guénin *et al.*, 2011). This could be related to OG-mediated signalling (Savatin *et al.*, 2011) and/or to phytohormone-related signalling. In this respect, auxin homeostasis is likely to be a major signal regulating the expression of HG-modifying genes, such as *PG* and *PLL* genes, during root emergence (Swarup *et al.*, 2008). Although the functional role of PLLs in root differentiation has not yet been elucidated, the increase in transcript accumulation in auxin-treated roots (Laskowski *et al.*, 2006) as well as the large number of isoforms expressed in this organ zone suggest a major involvement of these enzymes (Sun and Van Nocker, 2010). Recent data showing a role for a *Lotus japonicus* PL in the

modification of roots required for rhizobia infection support this hypothesis (Xie *et al.*, 2012).

The phyllotaxis of plant organs, which is the precise emergence of lateral organs, is controlled by a gradient of the plant hormone auxin (Rybel *et al.*, 2010; Vernoux *et al.*, 2010; Besnard *et al.*, 2011; Santuari *et al.*, 2011; Sassi *et al.*, 2012), but the chemical and mechanical status of the cell wall is also important in the formation of new organs. More particularly, the DM of HGs can affect cell wall rheology, modifying phyllotaxis. A first study has shown that the formation of flower primordia in *A. thaliana* shoot apical meristem is accompanied by a demethylesterification of HGs. In fact, the overexpression of *AtPMEI3* (*At5g20740*) and *AtPME5* (*At5g47500*), which are co-expressed in the shoot apical meristem area, alters the methylesterification status of HGs. This can lead to inhibition of either primordia formation when *AtPMEI3* is expressed or ectopic primordia formation with *AtPME5* expression (Peaucelle *et al.*, 2008). A second study reported the role of the homeodomain transcription factor BELLRINGER (AtBLR) in the establishment and maintenance of the phyllotaxis pattern in *A. thaliana* by the control of *AtPME5* expression. The study of the KO mutant *atblr-6* showed that AtBLR is required to establish normal phyllotaxis through the exclusion of *AtPME5* expression from the meristem; in contrast, phyllotaxis is maintained by the activation of *AtPME5* in the elongating stem (Peaucelle *et al.*, 2011*b*). Local accumulation of auxin in the shoot apex of *Arabidopsis* leads to local demethylesterification of HGs, suggesting a role for auxin in the control of PME activity, necessary for the decrease in tissue rigidity promoting organ formation. In an *AtPMEI3*-overexpressing line, which shows decreased demethylesterification of HGs, local accumulation of auxin did not induce organ formation, confirming that the control of the DM of HGs occurs downstream of auxin accumulation during organ formation (Braybrook and Peaucelle, 2013). The changes in HG structure underlie changes in cell wall rheology that are key elements of primordia emergence at the shoot apical meristem (Hamant *et al.*, 2011; Peaucelle *et al.*, 2011*a*). Pectins thus play a major role in controlling plant morphogenesis during development (Palin and Geitmann, 2012).

Although the parts played by other HGMEs in flower development have been less documented, some results suggest putative roles in this developmental process. For instance, a cDNA encoding a *PGIP* gene has been isolated from cotton flower. This gene, designated *GhPS1*, is specifically expressed in cotton petals and is gradually up-regulated over the course of petal development. However, its expression level declines rapidly in senesced petals after flowering, suggesting that the *GhPS1* gene may be involved in cotton petal development and senescence (Shi *et al.*, 2009).

Roles of HGMEs in the modulation of the physical properties of the end-product

Among other post-fecundation processes, the roles of pectin modifications during fleshy fruit development and maturation have been extensively studied (Brummell *et al.*, 2004; Ericksson *et al.*, 2004; Louvet *et al.*, 2011; Lunn *et al.*, 2013; Terao *et al.*, 2013). Early reports showed that, during tomato ripening, PME activity regulates MeOH and ethanol (EtOH) accumulation in the pericarp (Frenkel, 1998). Recent results showed an additional role for PME in cellular calcium distribution and blossom-end rot development in tomato fruit (De Freitas *et al.*, 2012). The link between PME levels and fruit susceptibility to pathogens was reported in the strawberry–*Botrytis* interaction (Osorio *et al.*, 2008), and the consequences of changes in PME gene expression on metabolic and signalling pathways were described (Osorio *et al.*, 2011*a*, *b*). Overall, the fine control of PME activity could be related to the interaction with specific inhibitors during fruit development, as recently shown (Reca *et al.*, 2012). The role of PME-mediated changes in the pectic network is likely to be highly conserved during fruit development, as shown by the changes in PME activity and/or transcript accumulation in various plant species (Barnavon *et al.*, 2001; Deytieux-Belleau *et al.*, 2008; Draye and Cutsem, 2008; Mbéguié-A-Mbéguié *et al.*, 2009; Cação *et al.*, 2012; Roongsattham *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2013). For instance, in *Musa acuminata*, PMEs are involved in cell wall modifications, responsible for softening the pedicel abscission area after induction of ripening. However, the observed effects could also be caused by cooperation of PME with other cell wall-modifying genes. In tomato, PG activity appears necessary for HG modifications, following the first stage of ripening; in transgenic plants underexpressing a PG gene, the fruit does not show any degradation in the last stage of fruit ripening (Hadfield and Bennett, 1998). The close relationship between PG activities and fruit firmness has recently been shown in apple (Atkinson *et al.*, 2012) and in strawberry (García *et al.*, 2009; Quesada *et al.*, 2009). In addition, PGs have been reported to play a central role in the modifications of the HG network associated with fruit abscission (Swain *et al.*, 2011). In banana, as in other climacteric fruits, ripening is accompanied by a high production of ethylene, which suggests a strong regulation of HGMEs by this phytohormone (Dominguez-Puigjaner *et al.*, 1997; Mbéguié-A-Mbéguié *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2012). For instance, in *M. acuminata*, the *BAN17* gene encoding PL is expressed under the control of ethylene. The role of PL in fruit softening was functionally demonstrated in strawberry (Jimenez-Bermudez *et al.*, 2002; Santiago-Doménech *et al.*, 2008). The changes in the HG network and its methylesterification status, mediated by HGMEs, are thus key elements of fruit texture that could be used for quantitative and genetic association studies (Chapman *et al.*, 2012; Lahaye *et al.*, 2012). Other post-fecundation processes appear to be under the control of HG structure. For instance, HG modification was shown to play a role in fibre elongation in cotton. In *Gossypium hirsutum*, the *GhPEL* gene, whose product was biochemically characterized as a PL, is preferentially expressed in fibres at 10 d post-anthesis. In antisense *GhPEL* transgenic cotton plants, where the expression is significantly suppressed, a reduction in PL activity was observed. This reduction led to a decreased degradation of demethylesterified HG epitopes in the primary cell wall with

consequent effects on cell wall loosening; ultimately, the elongation of the fibre was repressed (Wang *et al.*, 2010).

Recent findings also highlight emerging roles for PMEs in wood development and wood mechanical properties. In *A. thaliana*, five different *PME* genes are expressed in the xylem, one of which is more highly expressed in this tissue than in any other examined. Similarly, transcripts of a dozen *PME* genes have been found in poplar wood-forming tissues (Geisler-Lee *et al.*, 2006) and shown to be tightly regulated within the cambial meristem and during xylogenesis. In addition, several genes encoding HGMEs have been found to be regulated during wood formation in *Pinus radiata* (Li *et al.*, 2011, 2012) and *Eucalyptus* (Carvalho *et al.*, 2008; Goulao *et al.*, 2011). A role for PMEs has been demonstrated in the regulation of fibre length in poplar (Siedlecka *et al.*, 2007) as well as in the modulation of stem mechanical properties in *Arabidopsis* (Hongo *et al.*, 2012). For the latter, AtPME35 is involved in the demethylesterification of the primary cell wall, which directly regulates the mechanical strength of the supporting tissue. Mutants affected in the expression of the *AtPME35* gene showed a striking bending phenotype. Furthermore, the presence of HG and its de-esterification are likely to be essential for xylem lignification. For example, Ca^{2+}-bridged de-esterified HG is known to bind class III peroxidases that might initiate lignin polymerization (Jenkins *et al.*, 2001). In support of this hypothesis, it was shown that PME, de-esterified HGs, peroxidase, and the start of the lignification process co-localize at cell junctions in woody tissues (Wi *et al.*, 2005) and that pectins interact with lignin monomers and affect lignin polymerization *in vitro* (Lairez *et al.*, 2005; Habrant *et al.*, 2009). The control of the methylesterification status of HGs has dramatic consequences on the chemical and rheological properties of the cell wall (Wolf *et al.*, 2009*b*), and thus is likely to affect the properties of biomass-derived by-products. For instance, the PME-mediated changes in pectin structure have been shown to influence the texture of cooked potato tubers (Ross *et al.*, 2011*a*, *b*), the saccharification of plant tissues for biomass bioconversion (Lionetti *et al.*, 2010), and the solid wood properties of *Eucalyptus pilularis* (Sexton *et al.*, 2012). The differences in pectins between juvenile and adult *Eucalyptus globulus* wood, revealed by various nuclear magnetic resonance (NMR) analyses, support a major role for these enzymes during wood formation (Rencoret *et al.*, 2011).

Role of HG modifications in plant responses to biotic stress

Biotic stresses modify gene expression of HG-modifying enzymes

Plant HGMEs are involved in various biotic interactions: necrotrophic, hemibiotrophic, or biotrophic pathogens (fungi, oomycetes, bacteria, and viruses); phytophagous organisms (piercing–sucking insects, chewing insects, and nematodes); endosymbiotic microorganisms (arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria); or plant parasites that feed and then develop on host plants. Piercing–sucking insects wound the plant by inserting their stylets (mouthpart) into tissue to suck the cell contents or sieves. This wounding stress may be mimicked using needle punctures on leaves. Plant HGME gene expression is modified by all of these stresses, but the observed patterns of expression are dependent upon the bioaggressor (Table 2). For instance, no induction of PG gene expression has yet been reported after chewing insect and plant parasite infestations. Similarly, no induction of PAE or PL gene expression was shown following infections by viruses, endosymbiotic microorganisms, and plant parasites. For each bioaggressor, the pattern of HGME expression differs depending on the plant species, ecotype (or cultivar), and plant phenology. While *A. thaliana AtPME3* (*At3g14310*) was overexpressed in the C24 ecotype (Hewezi *et al.*, 2008) after 3 d of infestation with 250 J_2 nematodes (*Heterodera schachtii*), no such effect was reported in Col-0 for a similar infestation level. In contrast, in this ecotype, the expression of two other PMEs (*At2g45220* and *At1g53830*) was down-regulated following infestation (Puthoff *et al.*, 2003). This difference could also be related to plant phenology as, although of similar age (14 d old for C24 and 12 d old for Col-0), the plants were grown under distinct photoperiods (16/8 h and 12/12 h day/night, respectively).

The analysis of available microarray data sets from *A. thaliana* Col-0 ecotype (www.genevestigator.com; Hruz *et al.*, 2008) for distinct pathogens shows that the expression of a number of HGME genes is mostly down-regulated whatever the type of biotic stress: necrotrophic (*Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*), hemibiotrophic (*Phytophthora infestans*), or biotrophic (*Pseudomonas syringae*) pathogens, phytophagous organisms (*Bemisia tabaci* and *Meloidogyne incognita*), virus (*Cabbage leaf curl virus* CalCuV), or wounding (needles, Fig. 5). In general, within the smallest multigenic families of HGMEs such as PAEs and PLs, up to 67% and 42% of genes, respectively, show distinct expression patterns in response to biotic stresses. In contrast, figures are in the range of 29% and 24% for PMEs and PGs, respectively. In more detail, when considering the number of regulated HGME genes and their expression levels (up- or down-regulation), two clusters can be distinguished. The first includes responses to *P. infestans*, *B. tabaci*, *B. cinerea*, CalCuV, and *P. syringae*, and shows an overall down-regulation of most of the genes. The second cluster, which has far fewer modifications of gene expression, comprises the responses to *M. incognita*, *F. oxysporum*, or wounding. Some genes are specifically expressed in each cluster (PL, *At5g63180*; PGs, *At4g23820*, *At3g06770*, and *At3g16850*; or PME, *At1g53830*; and PL, *At5g55720* in cluster one and two, respectively). On this basis, it would be possible to distinguish between rather ubiquitous biotic stress-related HGMEs (PME, *At2g45220*; and PL, *At3g07010*) and specific ones (PMEs *At5g04960–At3g10710* with *M. incognita*; PME *At2g47280* and PGs *At3g48950–At5g27530* with CalCuV, or PGs *At1g70500–At3g57510* with *P. syringae*). As both clusters include a necrotrophic fungus (*B. cinerea* and *F. oxysporum*), the changes in the expression of HGMEs do not appear to be dependent on the bioaggressor lifestyle *per se*. The expression of HGME genes is more likely to depend on the bioaggressor species (Fig. 5). For instance, the number

Table 2. *Gene expression variations of homogalacturonan-modifying enzymes after biotic stresses*

Pectin methylesterases, pectin acetylesterases, polygalacturonases, and pectin lyase-like involved in plant–bioaggressor interactions.

Gene name	AGI or accession	Stress	Species name(s)	Induction	References
Pectin methylesterases (PMEs)					
		Aphid	*Brevicoryne brassicae*	32 aphids/plant; 48 hpi	Kusnierczyk *et al.* (2008)
AtPME17	At2g45220			Up-regulated 48 hpi (×4.53)	
AtPMEPCRF (61)	At5g53370			Up-regulated 6, 12, 24, 48 hpi (×1.35, 1.44, 1.83, 1.85)	
Apium graveolens cv. Dulce (celery)		Aphid	*Myzus persicae*	20 (3 dpi) or 100 aphids (7 dpi)/plant	Divol *et al.* (2005)
AgPME	CN254944			Up-regulated (×3.41, 2.41)	
AgPME	CN254453			Up-regulated (×3.48, 2.19)	
		Whitefly	*Bemisia tabaci*	100 whiteflies/plant; 21 dpi	Kempema *et al.* (2007)
AtPME17	At2g45220			Up-regulated (×8.06)	
AtPMEPCRA (18)	At1g11580			Down-regulated (×–1.70)	
		Chewing insect	*Spodotera littoralis OS*	1 mm holes punctured and 1 µl of insect OS applied; 6, 24 hpi	Consales *et al.* (2011)
AtPME32	At3g43270		(oral secretion)	Up-regulated (×2.17, 1.58)	
AtPMEPCRA (18)	At1g11580			Up-regulated (×3.33, 1.77)	
		Chewing insect	*Pieris brassicae*	10–40 eggs/plant; 24, 48, 72 hpi	Little *et al.* (2007)
AtPME44	At4g33220			Down-regulated (× –1.54, –1.65, –1.39)	
Nicotiana attenuata (tobacco)		Chewing insect	*Manduca sexta* OS	Leaf wounded with a pattern wheel + 20 µl of diluted insect OS; 9 hpi	Von *et al.* (2006)
NaPME	DQ115979			Up-regulated (×2.59)	
		Nematode	*Meloidogyne javanica*	10–12 J_2 nematodes/root tip; 3 dpi	Barcala *et al.* (2010)
AtPME	At5g20860			Up-regulated (×3.05)	
AtPME	At1g11580			Up-regulated (×3.56)	
AtPME17	At2g45220			Down-regulated (× –3.54)	
		Nematode	*Heterodera schachtii*	250 J_2 nematodes/plant; 3, 8, 13 dpi	Hewezi *et al.* (2008)
AtPME3	At3g14310		*or Meloidogyne incognita*	Up-regulated (×2.0, 3.5, 3.0)	
Solanum lycopersicum (tomato)		Nematode	*Globodera rostochiensis*	10 000 J_2 nematodes/plant; 14 dpi	Uehara *et al.* (2007)
LePME	SNG-U213346			Up-regulated (×7.0)	
		Nematode	*Heterodera schachtii*	250 J_2 nematodes/plant; 3 dpi	Puthoff *et al.* (2003)
AtPME2	At1g53830			Down-regulated (× –3.8)	
AtPME17	At2g45220			Down-regulated (× –3.9)	
		Bacterium	***Pectobacterium carotovorum***	5×10^7 cfu ml^{-1}; 14 hpi	Raiola *et al.* (2011)
AtPME3	At3g14310			Up-regulated (×2.5)	
		Fungus	***Botrytis cinerea***	5×10^5 conidia ml^{-1}; 72 hpi	Raiola *et al.* (2011)
AtPME3	At3g14310			Up-regulated (×7.0)	
		Fungus	***Alternaria brassicola***	10, 24, 48 hpi	Narusaka *et al.* (2005)
AtPME3	At3g14310			Up-regulated (×7.2, 2.9, 4.1)	
		Fungus	***Alternaria alternata***	10, 24, 48 hpi	Narusaka *et al.* (2005)
AtPME3	At3g14310			Up-regulated (×11.2, 11.5, 6.8)	
Linum usitatissimum (flax)		Fungus	***Fusarium oxysporum or F. culmorum***	2 dpi (RT–PCR)	Wojtasik *et al.* (2011)
LuPME3	AF188895			Down-regulated	
LuPME5	AF355057			Down-regulated	
Medicago truncatula (barrel medic)		AM fungus	*Glomus mosseae*	28 dpi	Hohnjec *et al.* (2005)
MtPME	TC78420		or *Glomus intraradices*	Up-regulated (×2.56 GM, ×2.66 GI)	

Table 2. *Continued*

Gene name	AGI or accession	Stress	Species name(s)	Induction	References
MtPME	TC82059			Up-regulated (×2.33 GM, ×4.11 GI)	
Sesbania rostrata (Sesbania)		Bacterium	*Azorhizobium caulinodans*	48 hpi	Lievens *et al.* (2001)
SrPME1	Srdd18			Up-regulated (RT–PCR)	Lievens *et al.* (2002)
Solanum tuberosum cv Igor (potato)		Virus	PVY^{NTN}	0.5 hpi	Baebler *et al.* (2009)
StPME	STMHY50			Down-regulated (× –1.27)	
		Virus	TuMV	5 dpi	Yang *et al.* (2007)
AtPME3	At3g14310			Down-regulated (× –2.64)	
		Virus	CaLCuV	12 dpi	Ascencio-Ibanez *et al.* (2008)
AtPMEPCRA (18)	At1g11580			Down-regulated (× –1.14)	
		Virus		4 dpi	Whitham *et al.* (2003)
AtPMEPCRA (18)	At1g11580		CMV, ORMV, TuMV, PVX, TVCV	Up-regulated (×2.2–3.8)	
Vigna inguilata (cowpea)		Parasitic plant	*Striga gesnerioides*	6 dpi or 13 dpi	Huang *et al.* (2012)
VuPME	33686210			Up-regulated 6 dpi (×3.24) and 13 dpi (×3.29)	
Pectin acetylesterases (PAEs)					
		Whitefly	*Bemisia tabaci*	100 silverfly/plant, 21 dpi	Kempema *et al.* (2007)
AtPAE	At4g19420			Up-regulated (×2.89)	
AtPAE	At5g45280			Down-regulated (× –1.78)	
		Aphid	*Myzus persicae*	20 (3 dpi) or 100 aphids (7 dpi) /plant	Divol *et al.* (2005)
AtPAE	CN254169			Up-regulated (×3.78, 2.16)	
Malus domestica (apple tree)		Aphid	*Dysaphis plantaginea*	20 aphids/leaf, 72 hpi	Qubbaj *et al.* (2005)
MdPAE	CB035291			Up-regulated	
		Chewing insect	*Spodotera littoralis* OS	1 mm holes punctured and 1 µl of insect OS applied; 6, 24 hpi	Consales *et al.* (2011)
AtPAE	At2g46930			Up-regulated (×2.83, 2.30)	
		Nematode	*Meloidogyne incognita* or *Heterodera schachtii*	1, 2, 3, 5, 7 dpi	Vercauteren *et al.* (2002)
AtPAE	AY050847			Up-regulated	
Polygalacturonases (PGs)					
		Aphid	*Brevicoryne brassicae*	32 aphids/plant	Kusnierczyk *et al.* (2008)
AtPG	At5g49215			Down-regulated 6, 12, 24, 48 hpi (× –1.21, –1.46, –1.38, –1.52)	
AtPG	At3g62110			Down-regulated 6, 12, 24, 48 hpi (× –1.53, –1.43, –1.56, –1.55)	
AtPG	At1g60590			Down-regulated 6, 12, 24, 48 hpi (× –1.33, –1.45, –1.39, –1.51)	
AtPG	At4g23820			Down-regulated 6, 12, 24, 48 hpi (× –1.14, –1.27, –1.51, –1.62)	
AtPG	At3g06770			Down-regulated 6, 12, 24, 48 hpi (× –1.48, –1.83, –1.92, –1.83)	
AtPG	At1g10640			Down-regulated 6, 24, 48 hpi (× –1.78, –1.41, –1.88)	
		Aphid	*Myzus persicae* saliva infiltration	50 aphids/plant, 24 (OS), 48, 72 (OS+feeding) hpi	De Vos and Jander (2009)
AtPG	At1g60590			Down-regulated (× –2.69, –22.7)	
		Nematode	*Heterodera schachtii*	250 J_2 nematodes/plant, 3 dpi	Puthoff *et al.* (2003)

Table 2. *Continued*

Gene name	AGI or accession	Stress	Species name(s)	Induction	References
AtPG	At2g41850			Up-regulated (×3.7)	
AtPG	At1g05660			Down-regulated (×3.1)	
		Nematode	*Meloidogyne javanica*	10–12 J_2 nematodes/root tip; 3 dpi	Barcala *et al.* (2010)
AtPG	At4g23820			Up-regulated (×3.03)	
Medicago truncatula (barrel medic)		AM fungus	*Glomus mosseae*	28 dpi	Hohnjec *et al.* (2005)
MtPG	TC88957		or *Glomus intraradices*	Up-regulated (×2.53 GM, ×4.50 GI)	
Medicago truncatula (barrel medic)		Bacterium	*Sinorhizobium meliloti*	24, 48 dpi	Lohar *et al.* (2006
MtPG	TC78631			Up-regulated (×1.14, 1.41)	
MtPG	TC89800			Up-regulated (×1.45, 1.25)	
MtPG	TC91368			Up-regulated (×1.14, 1.12)	
MtPG	TC87651			Up-regulated (×2.88, 2.23)	
Medicago sativa (alfafa)		Bacterium	*Sinorhizobium meliloti*	24 dpi	Munoz *et al.* (1998)
MsPG	MsPG3			Up-regulated (RT–PCR)	
Solanum tuberosum cv Igor (potato)		Virus	PVY^{NTN}	0.5 hpi	Baebler *et al.* (2009)
StPG	STMIS28			Down-regulated (× –1.43)	
Pectate lyase-like proteins (PLLs)					
		Aphid	*Brevicoryne brassicae*	32 aphids/plant, 6, 12, 24, 48 hpi	Kusnierczyk *et al.* (2008)
AtPL	At1g67750			Down-regulated (× –2.00, –1.62, –1.64, –1.85)	
Glycine max (soybean)		Aphid	*Aphis glycines*	40 aphids/plant, 6 hpi	Li *et al.* (2008)
GmPL	AI748551 (At1g67750)			Down-regulated (× –1.52)	
GmPL	AW099533			Down-regulated (× –1.54)	
GmPL	AW309146 (At1g11920)			Down-regulated (× –1.62)	
		Chewing insect	*Spodotera littoralis* OS	1 mm holes punctured and 1 µl of insect OS applied; 6, 24 hpi	Consales *et al.* (2011)
AtPNL	At3g15720			Up-regulated (×5.28, 2.0)	
AtPNL	At3g61490			Up-regulated (×12.13, 2.0)	
		Chewing insect	*Pieris brassicae*	Down-regulated (× –1.48, –1.45, –1.23)	Little *et al.* (2007)
AtPNL	At5g48900			10–40 eggs/plant, 24, 48, 72 hpi	
		Nematode	*Meloidogyne javanica*	10–12 J_2 nematodes/root tip; 3 dpi	Barcala *et al.* (2010)
AtPL	At3g53190			Up-regulated (×4.88)	
Medicago truncatula (barrel medic)		AM fungus	*Glomus mosseae*	28 dpi	Hohnjec *et al.* (2005)
MtPL	TC88957		or *Glomus intraradices*	Up-regulated (×2.03 GM, ×3.00 GI)	
Medicago truncatula (barrel medic)		Bacterium	*Rhizobium meliloti*	6, 12, 24, 48 dpi	Lohar *et al.* (2006)
MtPL	TC89125			Up-regulated (×5.12, 2.37, 2.73, 1.18)	
Vigna inguilata (cowpea)		Parasitic plant	*Striga gesnerioides*	13 dpi	Huang *et al.* (2012)
VuPL	33691436			Down-regulated (× –8.86)	

Piercing–sucking insects (yellow box), chewing insects (turquoise), nematodes (blue), bacteria (black), fungi (light grey), arbuscular mycorrhizal fungus (dark grey), viruses (red). and parasitic flowering plants (green).
Species names in bold indicate necrotrophic pathogens and underlined gene names refer to characterized enzymes.

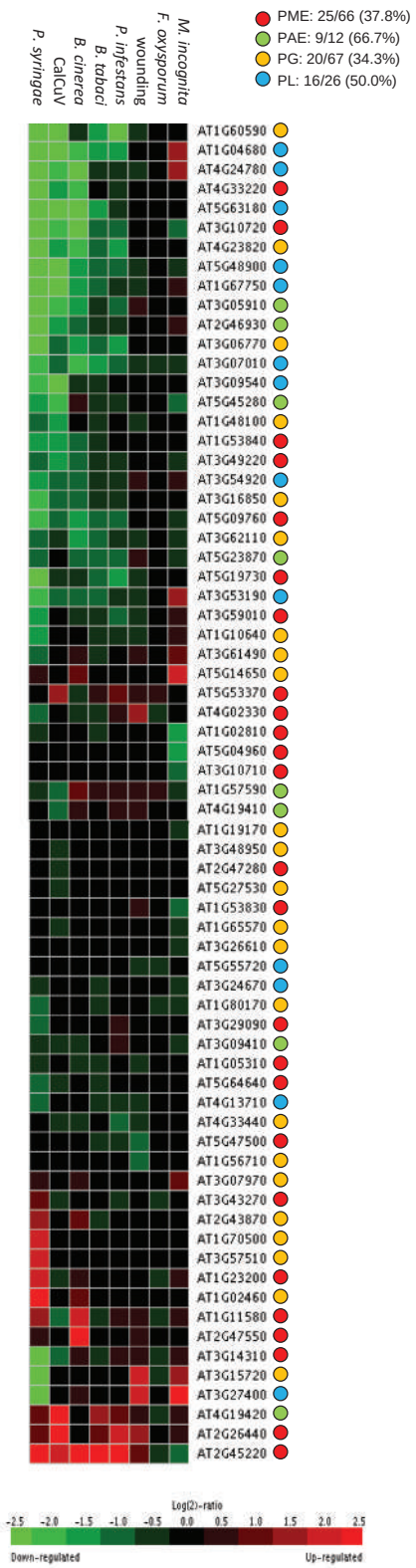


Fig. 5. Expression pattern of PME, PAE, PG and PLL mRNA in *A. thaliana* Col-0 in response to necrotrophic fungi (48 h, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*), hemibiotrophic oomycete (24 h, *Phytophthora infestans*), biotrophic bacterium (24 h, *Pseudomonas syringae*), herbivore insects (21 d, *Bemisia tabaci*), nematode (28 d, *Meloidogyne incognita*), virus (24 h, *Cabbage leaf curl virus* CalCuV), and leaf wounding with needles (24 h). PMEs, PAEs, PGs, and PLLs (red, green, orange, and blue circles) are shown together. Data were analysed using the Genevestigator Meta-Analyzer Tools (www.genevestigator.com/gv/; Hruz *et al.*, (2008). Only probes with a single gene and genes showing a minimal expression were used for the analysis. For each HGME family, the percentage (%) of genes expressed among all family members is indicated.

of HGME genes regulated following a 48 h infestation by *B. cinerea* was 3-fold higher than for an *F. oxysporum* infestation. This suggests distinct response pathways at the cell wall level. Interestingly, whatever the HGME family considered, *F. oxysporum* induces the fewest changes in gene expression levels. While it has been suggested that necrotrophs and hemibiotrophs can modulate the expression of a higher number of PMEs than biotrophs (Lionetti *et al.*, 2012), it seems important to consider the pathogen species and probably the duration of infection. For example, after 48 h of infestation, HGME modifications induced by the two necrotrophic fungi, *F. oxysporum* and *B. cinerea*, belong to the two different clusters defined before, while, within the same cluster, most HGME genes are more extensively modified after 24 h of infection by the biotrophic bacterium *P. syringae* than by the necrotrophic fungus *B. cinerea* (29, 24, and 42% against 23, 16, and 35% of PME, PG, and PL, respectively). Only PAEs are recruited at the same level in both infections. Changes in the expression of HGME genes were observed for the duration of an interaction that can reach several weeks in the case of piercing–sucking insects and nematodes; the time needed to complete development steps or even a whole reproduction cycle. After 21 d of continuous feeding in a single phloem sieve element by the whitefly nymph *B. tabaci*, or after 28 d of infestation by the nematode *M. incognita*, the number of genes with modified expression was almost the same as after *B. cinerea* infection. Comparing the two piercing–sucking phytophagous insects, each belonging to the two different clusters, the overall number of PMEs and PLs differentially expressed is relatively similar, but differences lie in the identity of the isoforms. The changes in gene expression are likely to concern isoforms that are organ specific; nematodes feeding on roots and whiteflies on leaves. Interestingly, 24 h after leaf wounding, the HGME pattern belongs to the same cluster as that of nematode infestation. Current challenges include the identification of the specific roles of HGME isoforms in biotic interactions (host species, bioaggressor lifestyle, plant phenology, attacked organ, and duration of infestation/infection). This might help to build general and specific models of the response of the plant at the cell wall (pectin) level.

Role of HGMEs in the establishment of feeding structures during biotic interactions

Except for chewing insects and necrotrophic pathogens, in most cases a feeding connection is established during plant–bioaggressor interactions. Most hemibiotrophic and obligate biotrophic fungi, or oomycetes use an appressorium followed by a penetration peg that goes through the plant cell wall to develop a haustorium for host cell nutrient absorption. Nutrient trafficking passes through the plant extrahaustorial membrane and matrix to the hyphal wall and membrane

(Szabo and Bushnell, 2001; Underwood, 2012), while the whole haustorium is encased. Haustoria are also described as special organs of most parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi for penetration and development of vascular connections within the host plant for feeding (Leake, 1994; Lee, 2007). Cell wall remodelling, and thus cell wall-degrading enzymes (CWDEs), including HGMEs, are necessary to establish a conductive system (Deising *et al.*, 1995). CWDEs are secreted by pathogens, plant parasites, or mycorrhizal fungi to develop the haustorium and by the plant to restrict its development, especially through the cell wall apposition (papilla). Although callose and lignin have been described as the main embedded compounds for cell wall strengthening in the vicinity of the haustorium, pectate gel generated following PME activity could also play a role (Micheli, 2001) (Fig. 4). In fact, two PME genes are overexpressed in *Medicago truncatula* roots infected by the endosymbiotic fungus *Glomus* sp. (Hohnjec *et al.*, 2005). In cowpea (*Vigna unguiculata*) infected by the holoparasite *Striga gesnerioides*, in parallel with the overexpression of one PME gene, one PLL is underexpressed in roots (Huang *et al.*, 2012). Although to date no specific role has been demonstrated for plant HGMEs during haustorium differentiation, in wheat leaves infected by the pathogen *Blumeria graminis*, papilla size correlated with peroxidase activity and H_2O_2 accumulation, depending on the DA of plant pectin fragments used as elicitors (Randoux *et al.*, 2010).

HGMEs are also good candidates for modulating cell wall structure during intrusive cell growth that occurs when plants interact with biotrophic, hemibiotrophic, and arbuscular mycorrhizal fungi (Perfect and Green, 2001) and with parasitic plants (Leake, 1994). HGMEs could also modulate the interaction with aphids and nematodes (Wyss and Zunke, 1986; Tjallingii and Esch, 1993). For instance, the trophic behaviour of the aphid *Myzus persicae* was modified within 8 h of infestation in *A. thaliana* plants knocked out for the expression of the *AtPME17* gene (C. Wattier *et al.*, unpublished). Interestingly, the expression of *PME17* is markedly increased following interactions with other aphids (*Brevicoryne brassicae*) or whitefly (*B. tabaci*) (Fig. 5) (Kempema *et al.*, 2007; Kuśnierczyk *et al.*, 2008). As the salivation phases were longer in the *pme17* mutant, PME17 could have a role in facilitating the progression of the stylets in wild-type plants. Similarly, very early in root knot and cyst nematode infections (*M. incognita* and *Heterodera schachtii*, respectively), an up-regulation of one *AtPAE* was shown using *in situ* localization (Vercauteren *et al.*, 2002). The activity of this HGME could be involved in softening the plant cell wall to establish a feeding site, which is an induced multinucleate and physiologically active aggregation of fused root cells that exclusively provides nutrients during the nematode sedentary life (Szabo and Bushnell, 2001; Vercauteren *et al.*, 2002). Similarly, AtPME3 seems to be crucial in the early phase of the establishment of the syncytium, the feeding site of the cyst nematode, as it appeared to be a virulent target in the *A. thaliana–H. schachtii* interaction (Hewezi *et al.*, 2008). Using a yeast two-hybrid screen, PME3, whose gene expression was increased during infestation, was identified as interacting with a cellulose-binding protein (CBP) secreted by *H. schachtii* (Hewezi *et al.*, 2008). Results obtained using transgenic lines suggest that PME3 could be recruited by CBP to modify the plant cell wall, thus helping cyst nematode parasitism. However, this is unlikely to be the whole mechanism for parasitism success. Similarly, a so-called 'welcoming programme', characterized by huge cell reorganizations and by the formation of root hairs, has been related to the facilitation of the intercellular progression of infection threads or hyphae during the initiation of endosymbiotic interactions (van Brussel *et al.*, 1992; Bonfante, 2001; Hause and Fester, 2004). For instance, during legume–*Rhizobium* or arbuscular mycorrhizal fungus symbioses, several plant HGMEs were involved in the early stages of the interaction (Lohar *et al.*, 2006; Oldroyd *et al.*, 2011). Four PG genes and one PLL gene were overexpressed in *M. truncatula–Rhizobium meliloti* interactions, while in *Medicago sativa* one PG was specifically localized in the cell wall of nodule primordia and invasion zones from 1 h to 2 d post-inoculation (Muñoz *et al.*, 1998; Lohar *et al.*, 2006). Using mutant plants, a PL from *L. japonicus* appears essential for the proper initiation of *Rhizobium trifolii* infection (Xie *et al.*, 2012). Moreover, *in situ* localization showed that PMEs could contribute to the development of new vascular tissues during rhizobial infection (Lievens *et al.*, 2002). This is consistent with the analysis of microarray data sets, showing that *M. truncatula* PGs, PLLs, and PMEs are overexpressed 28 d after inoculation with *Glomus* sp. (Hohnjec *et al.*, 2005) and that PG activity is localized in the cell wall of lateral root primordia (Peretto *et al.*, 1995). The specific case of parasitic plants is of interest as, like host plants, they secrete their own HGMEs to facilitate their penetration into the host plant root cortex. For instance, *Orobanche* sp. secretes PMEs and their activity is correlated with the localization of low esterified HG in the cell wall and the middle lamella at the site of contact between host and parasitic cells (Ben-Hod *et al.*, 1993; Losner-Goshen *et al.*, 1998). This plant–plant interaction raises fascinating questions concerning the roles and specificity of host and parasite HGMEs. In particular, the study of the potential inhibition of parasitic plant PMEs by host plant PMEIs would be of great interest.

Host plant HGMEs are thus largely involved during the establishment of the feeding structures of bioaggressors, both to facilitate their intrusion and to restrict their excessive spreading. Their role in the fine-tuning of cell wall remodelling in favour of parasitic success at an early stage suggests that HGME activity has been diverted during a co-evolution process. Virulence factors of bioaggressors that target plant protein involved in defence responses, and the binding of exogeneous protein to some plant PMEs, appear as examples. Reported for plant–nematode interactions, this targeting has previously been highlighted for plant–virus interactions. The movement protein (MP) of *Tobacco mosaic virus* (TMV), which can be transmitted by piercing–sucking insects, interacts with a PME purified from tobacco leaves and this interaction is required for TMV cell to cell movement in the host plant (Dorokhov *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000). The reduction of total PME activity, using antisense suppression of the

expression of one PME or the overexpression of a characterized PMEI, led to the delayed systemic movement of TMV (Chen and Citovsky, 2003). In the meantime, using transgenic plants overexpressing PME, an inverse correlation between PME activity and TMV lesion sizes has been demonstrated (Gasanova *et al.*, 2008). In this respect, the common hypothesis that plant HGMEs play a role in plant resistance by mediating cell wall strengthening or producing endogenous elicitors is probably too simplistic.

Roles of HGMEs in structural resistance

The cell wall represents an impenetrable physical barrier with constitutive rigidity to fend off bioaggressor attacks (Vallarino and Osorio, 2012). A high DM of HG has been correlated to genotype resistance to the aphid *Schizaphis graminum*, the biotrophic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, and the necrotrophic bacterium *Ralstonia solanacearum* (Table 3) (Dreyer and Campbell, 1984; Boudart *et al.*, 1998; Wydra and Beri, 2006). This could be related to changes in cell wall elasticity and mechanics. As shown during organ initiation (Peaucelle *et al.*, 2011*a*), the lowest wall elasticity is correlated to the highest DM. Furthermore, a high constitutive DM of pectin was structurally related to the borate–RGII cross-link in regulating cell wall stiffness (Ishii and Matsunaga, 2001). As such, plant resistance to the necrotrophic bacterium *Pectobacterium carotovorum* is associated with a high DM of pectin in wild potato plants (McMillan *et al.*, 1993; Marty *et al.*, 1997) and in the *pme3* mutant of *A. thaliana* (Raiola *et al.*, 2011). The enhanced DM level obtained by mutation of *PME* genes or by overexpression of *PMEI* genes *in planta* increased the resistance of dicotyledonous and monocotyledonous species to biotrophic or necrotrophic pathogens, but not to the full range of pathogens for each plant (Table 3) (Lionetti *et al.*, 2007; An *et al.*, 2008; Raïola *et al.*, 2011; Volpi *et al.*, 2011). Furthermore, *in vitro*, the hydrolysis of plant pectin by endo-PGs from several necrotrophic pathogens is decreased when pectins of high DM are used as carbon sources (Bonnin *et al.*, 2002). The resistance observed could therefore be related to a decrease in the number of specific substrates for endogenous PGs, as well as the physical or chemical properties of pectins, such as the isoform pattern of HGME activity or the amount of branched pectins. Using antisense tomato plants, the decrease in plant PG activity reduced, as expected, fruit softening and ripening, but also increased tomato resistance against biotrophic or necrotrophic pathogens (Damasceno *et al.*, 2011). Nevertheless, enhancing resistance through the modulation of the DM of HG is unlikely to be an easy strategy as it appears to be pathogen specific. For instance, increased PME activity and the associated lower DM of pectins, in transgenic strawberry overexpressing one PME, enhanced fruit resistance to the necrotrophic fungus *B. cinerea* (Osorio *et al.*, 2008). Understanding this opposite effect is complex as PME activity on HG can have two distinct consequences. On one hand, the linear activity of PME can give rise to blocks of free carboxyl groups that non-covalently interact with Ca^{2+} ions, conferring a gel-like structure and cell wall strengthening (Morris *et al.*, 1982; Micheli, 2001). On the other hand, random PME activity promotes the action of pectin depolymerases (endo-PG or lyase activities) increasing both cell wall loosening and porosity and producing OGs that elicit plant defence responses (Baron-Epel *et al.*, 1988; Ehwald *et al.*, 1992). Thus, in transgenic plants with modified HGME activity, either the direct or the indirect effect on HG structure could play a role in plant resistance. For example, constitutive gene expression of antimicrobial proteins (*PR5*) in transgenic strawberry overexpressing one PME enhanced basal resistance to *B. cinerea*, while a decrease in their level (PR1 and PR10) in *PMEI1*-silenced pepper conferred decreased basal resistance to the biotrophic bacterium *Xanthomonas campestris* (An *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2008). Among PMEs, some (At1g11580) that have a ribosome-inactivating protein (RIP) activity might be considered antimicrobial proteins themselves. RIPs are known to be involved in plant defence against viruses (De-la-Peña *et al.*, 2008). Resistance to the fungus *Puccinia graminis* was associated with a random distribution of the methylesters of HGs in the near-isogenic resistant line as compared with a more blockwise distribution in the susceptible cultivar (Wiethölter *et al.*, 2003). The DA of pectins is also likely to play an important role in plant resistance. While the *Arabidopsis* mutant *reduced cell wall acetylation rwa2* was more resistant against the necrotrophic fungus *B. cinerea*, it was susceptible to the biotrophic fungus *Golovinomyces cichoracearum*. The 'antagonistic responses' to these pathogens are consistent with the two distinct plant defence pathways induced [jasmonic acid (JA)/ethylene (ET), versus salicylic acid (SA)]. All these results suggest an indirect link between cell wall-related basal structural resistance and inducible plant defences. The mutation of the plant putative pectate lyase PMR6 (*POWDERY MILDEW RESISTANT 6*), required for the virulence of *Erysiphe* sp., increased the content and DM of pectin as well as plant resistance, but surprisingly did not change either fungus penetration success or SA- and JA/ET-dependent defence responses. Similar results were obtained using the *pmr5* mutant; *PMR5* encodes a protein of unknown function required for pectin production and is likely to be targeted to the endoplasmic reticulum/secretory pathway. These results suggest non-elicitor OG production, highlighting the dual role of HGMEs in the control of cell wall stiffness during plant bioaggressor interactions. Finally, since HGME activities result in direct (strengthening) or indirect (OG elicitor production) resistance, they appear good candidates for virulent factor targeting.

HGMEs are involved in induced resistance against biotic stresses

The role of HGMEs in the production of endogenous elicitors during plant–bioaggressor interactions has been indirectly shown through the induction of all the main known plant defence responses following application of purified OGs, end-products of HGMEs. Indeed, within early signalling events, OGs induce H^+ and Ca^{2+} influx, K^+ efflux, membrane depolarization, extracellular medium alkalinization (Mathieu *et al.*, 1991), protein phosphorylation/dephosphorylation,

Table 3. *Biochemical implication of HG-modifying enzymes (PMEs, PAEs, and PLLs) and their inhibitor proteins (PMEIs, PGIPs, and PNLIP) in plant resistance against bioaggressors*

Gene name	Utilization	Stress		Induction	References
Pectin methylation and PME activity					
Sorghum bicolor (sorgho)	DM of pectin	Aphid	*Schzaphis graminum*	Resistant variety has higher methylated pectins than the suceptible	Dreyer and Campbell (1984)
Phaseolus vulgaris (bean)		Fungus	*Collectotrichum lindemuthianum*	Resistant line has higher methylated pectins than the suceptible	Boudart *et al.* (1998)
DM of pectin	Near-isogenic lines				
Solanum tuberosum cv Bintje or ADG (potato) DM of pectin		Bacterium	***Pectobacterium carotovorum***	Resistant genotype (ADG) has higher methylated pectins than the susceptible genotype (Bintje)	Marty *et al.* (1997)
Potato DM of pectin	Somatic hybrid of 3 cv (Record, Estima, Katahdin)	Bacterium	***Pectobacterium carotovorum***	Resistant genotype has higher methylated pectins than the susceptible genotype	McMillan et al (1993)
Solanum lycopersicum (tomato) DM of pectin	(Hawaii7996, Wva700)	Bacterium	***Ralstonia solanacearum***	Resistant genotype (Hawaii7996) has higher methylated pectins than the susceptible genotype (Wva700)	Wydra and Beri (2006)
Nicotiana attenuata (tobacco) PME activity	Wild type	Chewing insect	*Manduca sexta* OS	Leaf wounded with a pattern wheel; 20 µl of diluted insect OS applied; PME activity increased (29%) 30 min after OS applied	Von Dahl *et al.* (2006)
Nicotiana tabacum (tobacco) PME		Virus	TMV	PME specifically recognized the TMV MP (movement protein)	Dorokhov *et al.* (1999)
Nicotiana tabacum cv. Turk (tobacco) PME		Virus	TMV	Mutant TMV without MP proteins cannot link to tobacco PME (no lesions on leaves after TMV mutant infection)	Chen *et al.* (2000)
Nicotiana tabacum cv. Samsun (tobacco) PME activity	ProPME	Virus	TMV	PME activity increased >resistance increased (size of leaf necrosis and short- and long-distance transport decreased)	Gasanova *et al.* (2008)
Nicotiana tabacum cv. Turk (tobacco) PME activity	Antisense suppression	Virus	TMV	PME activity decreased >symptome appearence delayed (5–12 times slower in the antisense line than in the wild type)	Chen and Citovsky (2003)
	pme3 KO	Fungus	***Botrytis cinerea***	PME activity decreased >DM decreased>resistance decreased	Raiola *et al.* (2011)
AtPME3	At3g14310				
AtPME3	*pme3* KO At3g14310	Bacterium	***Pectobacterium carotovorum***	PME activity decreased >DM decreased >resistance decreased	Raiola *et al.* (2011)
Fragaria vesca (wild strawberry)		Fungus	***Botrytis cinerea***	OGA with low DM >resistance increased	Osorio *et al.* (2008)

Table 3. *Continued*

Gene name	Utilization	Stress		Induction	References
PME activity	Overexpression line (FaPE1)				
Pectin acetylation					
	Mutant *Atrwa2*	Fungus	***Botrytis cinerea***	Pectin acetylation decreased >resistance increased	Manabe *et al.* (2011)
DA of pectin	(with 20% decreased acetylester content)				
Triticum aestivum (wheat)		Fungus	*Blumeria graminis*	OGA with high DA >resistance increased	Randoux *et al.* (2010)
DA of pectin	Chemical acetylation				
Pectate lyase-like (PLL)					
		Fungus	*Erysiphe cichoracearum*	10^8 cfu ml^{-1}; 1, 2, 4 dpi confers resitance to *E. cichoracearum*	Vogel *et al.* (2002)
AtPMR6	At3g54920				
Pectin methyl esterase inhibitors (PMEIs)					
	overexpression lines	Fungus	***Botrytis cinerea***	ATPMEI increased>PME activity decreased>DM increased>resistance increased	Lionetti *et al.* (2007)
AtPMEI1	At1g48020				
ATPMEI2	At3g17220				
Capsicum annuum (pepper)		Bacterium	*Xanthomonas campestris*	CaPMEI inhibited >susceptibility increased	An *et al.* (2008)
CaPMEI1	Transgenic pepper silences CaPMEI1		pv. *vesicatoria*		
Capsicum annuum (pepper)		Bacterium	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*	CaPMEI overexpressed >resistance increased, but no resistance to the biotrophic fungus *Hyaloperonospora parasitica*	An *et al.* (2008)
CaPMEI1	Transgenic *A. thaliana* overexpresses CaPMEI1				
Actinidia chinensis (kiwi)		Fungus	***Fusarium graminearum***	AcPMEI expression >PME activity decreased >DM increased >resistance increased	Volpi *et al.* (2011)
AcPMEI	Transgenic wheat expresses AcPMEI				
Actinidia chinensis (Kiwi)		Fungus	***Bipolaris sorokiniana***	AcPMEI expression >PME activity decreased >DM increased >resistance increased	Volpi *et al.* (2011)
AcPMEI	Transgenic wheat expresses AcPMEI				
Polygalactuonase inhibitor proteins (PGIPs)					
		Fungus	***Botrytis cinerea***	AtPGIP1 increased >resistance increased	Ferrari *et al.* (2006)
AtPGIP1	Antisense suppression				
Brassica rapa (Chinese cabbage)		Bacterium	***Pectobacterium carotovorum***	BrPGIP2 overexpressed > resistance increased	Hwang *et al.* 2010
PGIP	Overexpression lines				
Solanum lycopersicum (tomato)		Fungus	***Botrytis cinerea***	pPGIP increased >resistance increased (*B. cinerea* endo-PGs inhibited)	Powell *et al.* (2000)
pPGIP	Expression of a pear PGIP				
Vitis vinifera (grape)		Fungus	***Botrytis cinerea***	VvPGIP1 increased >resistance increased (BcPG1 inhibited)	Joubert *et al.* (2006)

Table 3. *Continued*

Gene name	Utilization	Stress		Induction	References
VvPGIP1 *Vitis vinifera* (grape)	Overexpression lines	Fungus	***Botrytis cinerea***	pPGIP increased >resistance increased	Agüero *et al*. (2005)
pPGIP	Expression of a pear PGIP	Fungus	***Botrytis cinerea***	AtPGIPs increased >resistance increased	Ferrari *et al.* (2003)
AtPGIP1, AtPGIP2 *Phaseolus vulgaris* (bean)	Overexpression lines	Fungus	***Botrytis cinerea***	PvPGIP2 increased >resistance increased (BcPG1 inhibited)	Manfredini *et al.* (2005)
PvPGIP2 *Phaseolus vulgaris* (bean)	Overexpression lines	Fungus	***Fusarium moniliforme***	PvPGIP2 inhibits FmPG	Federeci *et al*. (2001)
PvPGIP2 *Phaseolus vulgaris* (bean)		Fungus	*Aspergillus niger*	PvPGIP inhibits AnPG (endoPGII)	King *et al.* (2002)
PvPGIP *Phaseolus vulgaris* (bean)		Fungus	***Botrytis cinerea***	PvPGIP2 increased >resistance increased (BcPG1 inhibited)	Sicilia *et al.* (2005)
PvPGIP2 Pectin lyase inhibitor protein (PNLIP) *Beta vulgaris* (sugar beet)		Fungus	***Rhizoctonia solani***	Barley-grain inoculum applied for 2 weeks at 25 °C	Bugbee (1993)
PNLIP	PNLIP			PNLIP activity higher in rotted tissues than in healthy	

Piercing–sucking insects (yellow box), chewing insects (turquoise), bacteria (black), fungi (light grey), and viruses (red).
Species names in bold indicate necrotrophic pathogens.

mitogen-actived protein kinase (MAPK) cascades, GTP-binding protein, and reactive oxygen species (ROS) production (H_2O_2, O_2^-) (Shibuya and Minami, 2001; Vallarino and Osorio, 2012). They also induce the expression of defence genes encoding proteins involved in (i) defence protein accumulation such as protease inhibitors, pathogenesis-related proteins (PRs), or PGIPs; (ii) SA and JA/ET biosynthesis and signalling; (iii) biosynthesis of defensive secondary metabolites such as phytoalexins; or (iv) plant cell wall reinforcement (Shibuya and Minami, 2001) (Fig. 6; Supplementary Table S2 at *JXB* online). Some cell wall proteins were reported to be involved in cell wall strengthening and papilla formation [peroxidase and hydroxyproline-rich glycoprotein (HRGP)]. Among HGMEs, only PG and PL were identified following elicitation by OGs. Wound-inducible PG activity was correlated to H_2O_2 production in most plants belonging to different families (Orozco-Cardenas and Ryan, 1999). Both responses were induced by OG treatment in tomato leaves (Orozco-Cardenas and Ryan, 1999), where *PG* gene expression and its corresponding activity were transiently increased (Bergey *et al.*, 1999). In contrast, in *Arabidopsis* seedlings, a mixture of OGs (DP 9–16) did not change overall *PG* gene expression but repressed *PL-PMR6* expression (Denoux *et al.*, 2008). These differences are probably related to the plant species as well as the type and concentrations of OGs used. In fact, several studies have shown that the ability of OGs to act as elicitors is dependent on their chemical structure (DP, DM, pattern of methylesterification, and DA) (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012). OGs with DP ranging from 1 to 20 are efficient elicitors (Côté and Hahn, 1994) (Fig. 6). The treatment by flagellin, a microbial-associated molecular pattern (MAMP) from bacteria, is mimicked by OGs in a range of DP from 9 to 16 to induce plant defences including cell wall reinforcement (Denoux *et al.*, 2008). The critical DP triggering plant elicitation is dependent on both the type of defence responses measured for a given plant and the type of plant species (Côté and Hahn, 1994). OGs with a high DA led to wheat resistance against the necrotrophic fungus *B. graminis* (Randoux *et al.*, 2010), while fully methylated OGs failed to induce defence signalling in soybean (Navazio *et al.*, 2002). This variability highlights the difficulty in unravelling the relationship between the structure and function of OGs. Furthermore, in adequate ionic conditions, the Ca^{2+}-egg box conformation of OGs improves their biological activity (Fig. 6). For example, dimeric and trimeric association of OGs induced a higher level of early and late defence responses in carrot (Messiaen *et al.*, 1993). The ability of multimeric forms of OGs to elicit plant responses appears to depend on their maturation, which is likely to be necessary for their fixation on OG receptors (Cabrera *et al.*, 2008). To date, wall-associated kinase 1 (WAK1), belonging to the WAK gene family (five in *Arabidopsis*), is the only receptor characterized for OG recognition inducing the defence signalling cascade (Wolf *et al.*, 2012*a*) (Fig. 6). Using chimeric proteins, the binding

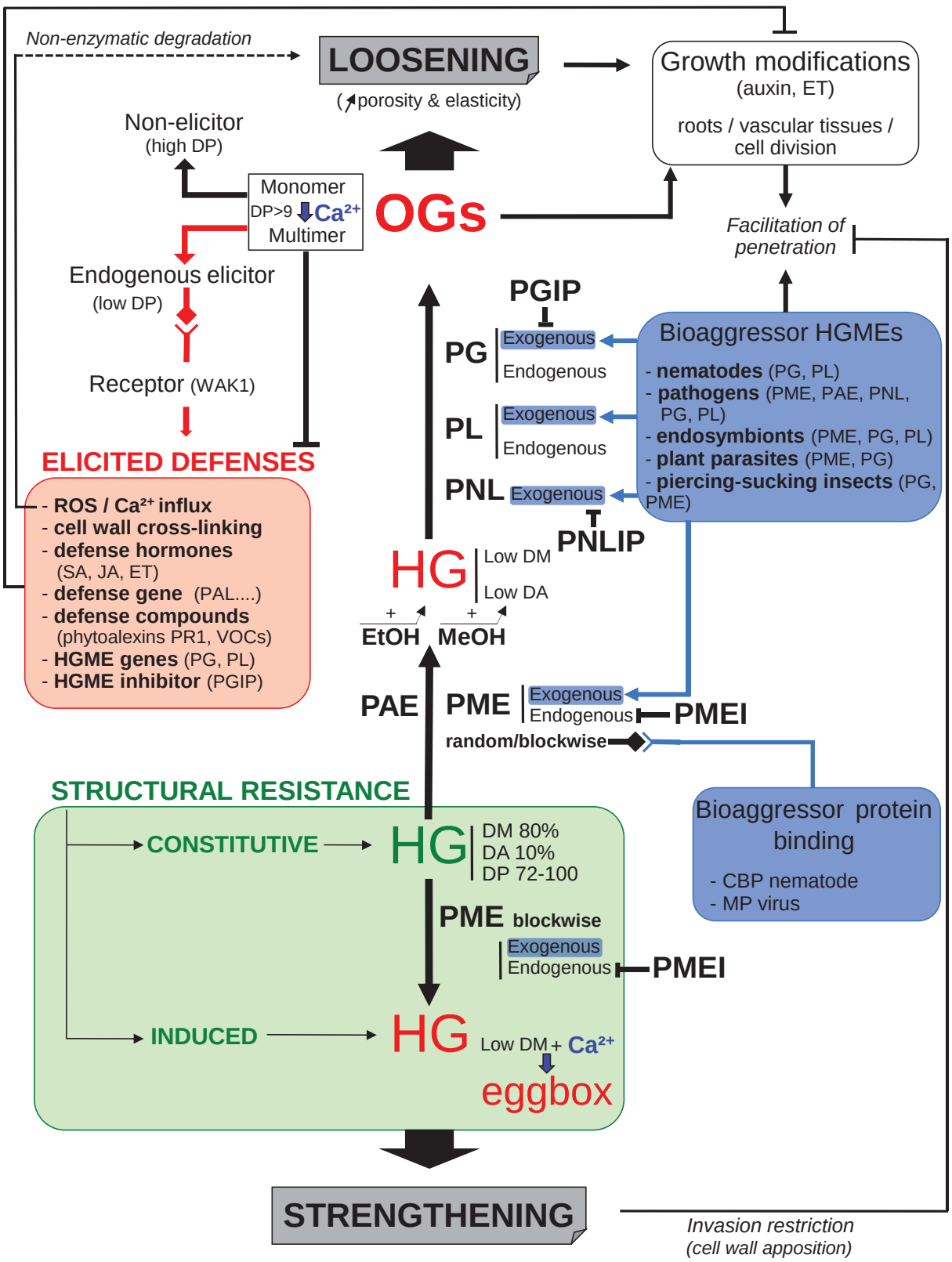


Fig. 6. Involvement of HGMEs in plant defence responses to biotic stresses. Homogalacturonans (HGs) embedded in the cell wall after their synthesis in the Golgi apparatus with a high degree of polymerization (DP, minimum 72–100 galacturonic acid residues; Thibault *et al.*, 1993) are *O*-acetylated [with a degree of acetylation (DA) of ~10%; Ralet *et al.* (2005)], and highly methylated [with a degree of methylesterification (DM) of ~80%; O'Neill and Albersheim (1990)]. Depending on the stress and growth states, these HGs will be demethylesterified by pectin methylesterases (PMEs) and/or deacetylated by pectin acetylesterases (PAEs), both enzyme activities being associated with the release of the volatile compounds methanol and ethanol, respectively. Depending on the cell wall properties, PMEs can act linearly, giving rise to blocks of free carboxyl groups that interact with bivalent ions (Ca^{2+}) and contributing to cell wall strengthening (green frame), or can act randomly, promoting the action of downstream cell wall hydrolases [polygalacturonases (PGs) and pectate lyases (PLs)] and then contributing to cell wall loosening (Micheli, 2001). Cell wall strengthening restricts bioaggressor progression,

of OGs on its ectodomain was shown to activate specific plant defences following recognition by a leucine-rich repeat (LRR)-receptor kinase (EFR). Conversely, its intracellular kinase domain induced OG-specific plant defences after treatment by the EFR-specific elicitor (Brutus *et al.*, 2010). Interestingly, OG monomers, dimers, and trimers have been reported to be inhibitors of disease resistance reactions independently of the way they are produced (plant cell wall autolysis or pathogen CWDE digestion) (Messiaen *et al.*, 1993; Moerschbacher *et al.*, 1999) (Fig. 6). As monomeric OGs inhibit phytoalexin accumulation [i.e. phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity] in carrot in contrast to the dimeric OG (Messiaen *et al.*, 1993), HGME activity associated with ionic cell status may be a way to regulate plant responses by modifying OG structure. In non-challenged plants, the difference in the rate of activity between intrinsic plant exo-PG and endo-PG that give rise to different OG structures (elicitors or not) supports a regulation of the balance between active/non-active OG forms by plant HGMEs during stress. Nevertheless, in plant–bioaggressor interactions, although the endogenous OG production is mostly described as being in favour of the plant, it may also benefit the bioaggressor. The combination of the action of both virulent microbes and plant HGMEs might suppress OGs with an eliciting function. PG, PL, and PME are found in plants and in secretions of most bioaggressors (microbes, nematodes, and insects) (Shen *et al.*, 2003, 2005; Harmel *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2013) (Fig. 6). The types and distribution of HGMEs vary depending on the bioaggressor considered. For instance, among phytophagous insects, no HGME activity has been measured in chewing insects. In aphididae, PME activity has been detected in the saliva of all tested aphids except for *Sitobion avenae*, while they all possess PG activity (Harmel *et al.*, 2010). The differences in HGME content of bioaggressors, together with the activity of plant enzymes, may have an effect on the quantity and structure of OGs released, thus enhancing or inhibiting specific MAMPs or HAMPs (herbivore-associated molecular patterns) plant defence responses (Felton and Tumlinson, 2008). While an oxidative burst can be induced by OGs, ROS themselves (H_2O_2) can give rise to a non-enzymatic OG production by oxidative breakdown of pectins (Miller, 1986; Fry, 1998) (Fig. 6).

The aphid *Diuraphis noxia* induced massive H_2O_2 accumulation in resistance of wheat, while this effect was not detectable in the *Brevicoryne brassicae–Arabidopsis* interaction (Moloi and van der Westhuizen, 2006; Kuśnierczyk *et al.*, 2008). The observation of H_2O_2 accumulation in both compatible and incompatible interactions between the aphid *Macrosiphum euphorbiae* and tomatoes suggested that they might not have a preponderant role as enhancers of endogenous elicitor production (De Ilarduya *et al.*, 2003). If the production of effective OGs is considered to be related to the balance between endogenous and exogenous HGME activities, specific regulators of HGMEs (PMEI, PGIP, and PNLIP) have to be taken into account (Table 3; Fig. 6). Among these protein inhibitors, at least one PGIP appears specifically directed to exogenous HGMEs and is used as a marker of the plant defence response. Plant PGIPs interact with PGs from various bioaggressors such as bacteria, fungi, and phytophagous insects (Albersheim and Anderson, 1971; D'Ovidio *et al.*, 2004; Schacht *et al.*, 2011) but are unlikely to target plant PGs (Cervone *et al.*, 1990; Federici *et al.*, 2001). PGIPs from different plant species can reduce PG activity from distinct pathogen species (Table 3), and one single PGIP can inhibit different fungal PGs; the PGIP2 of common bean inhibits *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger*, and *B. cinerea* PGs (Federici *et al.*, 2001; King *et al.*, 2002; Sicilia *et al.*, 2005). The expression of a pea PGIP gene was induced during pea defence against the cyst nematode *Heterodera goettingiana*; none of the PGs from the nematode was shown to interact with the plant PGIP (Veronico *et al.*, 2011). Results concerning potential pectin lyase inhibitor protein (PNLIP) are rather scarce. A PNLIP from sugar beet (*Beta vulgaris*) was shown to inhibit fungal pectin lyases from *Rhizoctonia solani*, *Phoma betae*, and *Aspergillus japonicus*, but information about the inhibitor structure and regulation in plants is so far lacking (Table 3) (Bugbee, 1993; Juge, 2006). Plant PMEIs, which only target plant PMEs, could, however, play a role in resistance to pathogens by targeting specific plant PME isoforms, thus modulating the structure of pectins (Lionetti *et al.*, 2007).

Plant HGMEs are involved in the emission of two volatile organic compounds (VOCs), MeOH and EtOH (Yadav *et al.*, 2009), released by PME and PAE activity, respectively (Fig. 6). PME-mediated pectin remodelling appears to be the main MeOH producer, while EtOH is mostly attributed to fermentive reactions of glucose (Fall, 1999; Seco *et al.*, 2007). Among the huge range of VOCs produced during plant defence responses, an increase in MeOH emissions has been measured after wounding (Dorokhov *et al.*, 2012*a*) and feeding by herbivore caterpillars (Peñuelas *et al.*, 2005; Körner *et al.*, 2009). In tobacco leaves, rapid and sustained emission of MeOH was observed after *Manduca sexta* wounding, and was enhanced in the presence of caterpillar oral secretions, due to both up-regulation of gene expression and activity of plant PMEs, and a decrease in the DM of pectins (Von Dahl

while cell wall loosening may facilitate their penetration. The various bioaggressors (blue frames) that attempt to breach the plant cell wall release their own HGMEs (exogenous), including pectin lyases (PNLs), that could amplify or compete with the hydrolysis by plant HGMEs (endogenous). Consequently, following the activity of plant and bioaggressor hydrolases, small HG fragments called oligogalacturonides (OGs) are released. Most of these enzymes (plant PMEs or bioaggressor PGs, PNLs) could be modulated by PME, PG, or PNL inhibitors (PMEIs, PGIPs, and PNLIPs). Depending on their DP and the amount of free Ca^{2+}, the OG monomers obtained can form multimers with an egg box conformation (Cabrera *et al.*, 2008) and/or can act as endogenous elicitors. After OG recognition by a specific receptor [wall-associated kinase 1 (WAK1); Brutus *et al.* (2010)], various defence responses (red frame) are induced against the bioaggressor (Ridley *et al.*, 2001) and could interact with growth modifications. Among them, ROS production (H_2O_2) can contribute to cell wall loosening with a non-enzymatic degradation of cell wall polysaccharides including HG (OG production; Miller, 1986; Fry, 1998). Plant PMEs also appear to act more directly during an interaction with some bioaggressors as they (bottom blue frame) specifically bind to a virus movement protein (MP; Chen *et al.*, 2000) or a nematode cellulose-binding protein (CBP; Hewezi *et al.*, 2008).

et al., 2006). The role of MeOH in induced plant resistance appears dual. It may either diffuse as a signal or be catabolized into compounds that might be used in plant defence. First converted by a putative methanol oxidase into formaldehyde, a lethal compound, it is quickly bound to a nucleophile such as glutathione (*S*-formylglutathione), turned into formate, and used as a carbon source incorporated into plant one-carbon metabolism (C1 folate pool) or the Calvin–Benson cycle (CO_2) (Gout *et al.*, 2000; Achkor *et al.*, 2003; Wojtasik *et al.*, 2011). Ethanol may also be oxidized into acetyl-coenzyme A via alcohol dehydrogenases involved in primary metabolism (Leblová *et al.*, 1977). In *Arabidopsis*, glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, known as *S*-nitrosoglutathione reductase (GSNOR), plays a key role in regulating nitric oxide and *S*-nitrosoglutathione levels as well as being a signal in systemic resistance against pathogens (Martínez *et al.*, 1996; Rustérucci *et al.*, 2007). As nitric oxide and *S*-nitrosothiols are signalling molecules that regulate immunity, MeOH release by PMEs seems to act as a quantitative signal during plant–herbivore interactions. Silencing the endogenous PME gene suppressed MeOH release and led to reduced accumulation of PGIP involved in tobacco leaf resistance against *M. sexta* (Körner *et al.*, 2009). While wounding regulated the GSNOR gene, the direct effect of MeOH on its regulation is still not clear (Downie *et al.*, 2004). For instance, several MeOH-inducible genes were identified, some of which are known to encode proteins involved in plant resistance, especially in antibacterial resistance, virus spreading (Dorokhov *et al.*, 2012*a*), or anthocyanin and flavonoid content (Downie *et al.*, 2004). PME-mediated MeOH production was recently shown to act as a cross-kingdom signal (Dorokhov *et al.*, 2012*b*). Indeed, in mice, some MeOH-inducible genes are involved in their preference for MeOH sources such as wounded leaves. As caterpillar oral secretions increased VOC emission, which is known to attract predators or parasitoids against insects or nematodes (Kahl *et al.*, 2000; Heil, 2008), as well as MeOH (Von Dahl *et al.*, 2006), PME appears to play a role in both indirect (VOCs) and direct plant defences (signal/elicitor producer).

Concluding remarks and perspectives

The contribution of the changes in the pectic network to the changes in cell wall rheology, enabling anisotropic growth or response to biotic stress, has been well documented over recent years. However, how the changes in HG-type pectins are spatially and temporally mediated, through the specific action of HGMEs, remains a central issue in our understanding of plant development. Until now, major advances in understanding the contribution of these enzymes to changes in development have mainly concerned PMEs. This notably includes their roles in mediating discrete changes in HG structure during the interaction with pathogens, the regulation of primordia emergence, pollen tube and hypocotyl elongation, as well as the identification of novel post-translational control of their activity through the processing of the proteins by serine proteases and/or their interaction with specific inhibitors (PMEIs). Although much progress has been made when considering PMEs, many challenges remain; for instance, the identification of specific PME–SBT and PME–PMEI pairs in the cell wall, the understanding of the potential polarity of the trafficking of PMEs to the cell wall, and its role in generating specific localized demethylesterification patterns through interaction of the enzymes with pH and ion microdomains. In addition, given the recent discovery of the interplay between hormonal signalling and PMEs, further research could include the determination of the upstream regulators of PME transcription, including transcription factors and hormone levels, and possible feedback loops.

Other classes of plant HGMEs, including PGs, PLLs, and PAEs, have received surprisingly little attention over the last few years, which probably does not reflect the importance of these enzymes in mediating changes in HG structure. As for PMEs, this could be related to the difficulties in determining strong phenotypes in KO mutants, with the occurrence of compensation mechanisms. When considering these multigenic families, the identification of compensation isoforms using dedicated tools, at both the transcript and protein levels, will help to provide a comprehensive overview of the underlying changes in cell wall structure. In particular, the roles of pectic fragments in generating plant responses to stress and in mediating changes in development will need further investigation. This will involve the identification of potential receptors of cell wall fragments, and of their specificity with regard to DP, DM, or DA. In parallel, the biochemical characterization of PMEs, PGs, PLLs, and PAEs will enable their substrate specificity and pH preference to be determined. In particular, how the PME-mediated changes in HG structure can influence the activity of PGs, PLLs, and PAEs will be a key issue in our understanding of the possible interplay of these enzymes *in muro*. This could be used to implement the current models illustrating the interaction between HGs and HGMEs in the cell wall environment (Figs 4, 6).

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Table S1. Comparative inventory of the structural motifs of PME, PAE, PG, and PLL isoforms between dicot and monocot species.

Table S2. Gene expression variations of HG-modifying enzyme inhibitor proteins (PMEIs and PGIPs) after biotic stresses.

Acknowledgements

The authors thank Ministry of Education support for the PhD scholarship CW. This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-BLANC-0007-01, GROWPEC project), by the EC INTERREG IVA No. 4166 'Trans channel Wallnet' program, and by the Conseil Régional de Picardie through a PhD studentship awarded to FS. Financial support from the Institut Universitaire de France (IUF) to JP is gratefully acknowledged.

References

Achkor H, Díaz M, Fernández MR, Biosca JA, Parés X, Martínez MC. 2003. Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of

glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132,** 2248–2255.

Agüero CB, Uratsu SL, Greve C, Powell AL, Labavitch JM, Meredith CP, Dandekar AM. 2005. Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Molecular Plant Pathology* **6,** 43–51.

Albersheim P, Anderson AJ. 1971. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **68,** 1–5.

Al-Qsous S, Carpentier E, Klein-Eude D, Burel C, Mareck A, Dauchel H, Gomord V, Balangé A. 2004. Identification and isolation of a pectin methylesterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening. *Planta* **219,** 369–378.

An SH, Sohn KH, Choi HW, Hwang IS, Lee SC, Hwang BK. 2008. Pepper pectin methylesterase inhibitor protein CaPMEI1 is required for antifungal activity, basal disease resistance and abiotic stress tolerance. *Planta* **228,** 61–78.

André-Leroux G, Tessier D, Bonnin E. 2005. Action pattern of Fusarium moniliforme endopolygalacturonase towards pectin fragments: comprehension and prediction. *Biochimica et Biophysica Acta* **1749,** 53–64.

Arsovski AA, Haughn GW, Western TL. 2010. Seed coat mucilage cells of *Arabidopsis thaliana* as a model for plant cell wall research. *Plant Signaling and Behavior* **5,** 796–801.

Ascencio-Ibáñez J, Sozzani R, Lee T, Chu T, Wolfinger R, Cella R, Hanley-Bowdoin L. 2008. Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiology* **148,** 436–454.

Atkinson RG, Sutherl PW, Johnston SL, Gunaseelan K, Hallett IC, Mitra D, Brummell DA, Schroder R, Johnston JW, Schaffer RJ. 2012. Down-regulation of POLYGALACTURONASE1 alters firmness, tensile strength and water loss in apple (Malus×domestica) fruit. *BMC Plant Biology* **12,** 1–13.

Atmodjo MA, Hao Z, Mohnen D. 2013. Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **64,** 747–779.

Baebler Š, Krecic Stres H, Rotter A, Kogovsek P, Cankar K, Kok EJ, Gruden K, Kovac M, ŽEL J, Pompe Novak M. 2009. PVYNTN elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Molecular Plant Pathology* **10,** 263–275.

Barcala M, García A, Cabrera J, Casson S, Lindsey K, Favery B, García-Casado G, Solano R, Fenoll C, Escobar C. 2010. Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *The Plant Journal* **61,** 698–712.

Barnavon L, Doco T, Terrier N, Ageorges A, Romieu C, Pellerin P. 2001. Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry* **58,** 693–701.

Baron-Epel O, Gharyal PK, Schindler M. 1988. Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* **175,** 389–395.

Bellincampi D, Camardella L, Delcour JA, *et al*. 2004. Potential physiological role of plant glycosidase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1696,** 265–274.

Bellincampi D, Salvi G, Lorenzo G, Cervone F, Marfa V, Eberhard S, Darvill A, Albersheim P. 1993. Oligogalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants. *The Plant Journal* **4,** 207–213.

Benedetti M, Leggio C, Federici L, de Lorenzo G, Pavel NV, Cervone F. 2011. Structural resolution of the complex between a fungal polygalacturonase and a plant polygalacturonase-inhibiting protein by small-angle X-ray scattering. *Plant Physiology* **157,** 599–607.

Benen J, Kester H, Visser J. 1999. Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *European Journal of Biochemistry* **259,** 577–585.

Ben-Hod G, Losner D, Joel DM, Mayer AM. 1993. Pectin methylesterase in calli and germinating seeds of *Orobanche aegyptiaca*. *Phytochemistry* **32,** 1399–1402.

Bergey DR, Orozco-Cardenas M, de Moura DS, Ryan CA. 1999. A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96,** 1756–1760.

Besnard F, Vernoux T, Hamant O. 2011. Organogenesis from stem cells in planta: multiple feedback loops integrating molecular and mechanical signals. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68,** 2885–2906.

Biely P, MacKenzie C, Puls J, Schneider H, 1986. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Nature Biotechnology* **4,** 731–733.

Bolvig P, Pauly M, Orfila C, Scheller H, Schnorr K. 2003. Sequence analysis and characterisation of a novel pectin acetyl esterase from *Bacillus subtilis*. In: Voragen F, Schols H, Visser R. eds. *Advances in pectins and pectinase research*. Berlin: Springer, 315–330.

Bonfante P. 2001. At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. In: Esser K, ed. *The mycota, fungal associations*. Berliny: Springer, 45–61.

Bonivento D, Pontiggia D, Matteo A, Fernandez Recio J, Salvi G, Tsernoglou D, Cervone F, Lorenzo G, Federici L. 2007. Crystal structure of the endopolygalacturonase from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lupini* and its interaction with polygalacturonase-inhibiting proteins. *Proteins* **70,** 294–299.

Bonnin E, Clavurier K, Daniel S, Kauppinen S, Mikkelsen JD, Thibault JF. 2008. Pectin acetylesterases from Aspergillus are able to deacetylate homogalacturonan as well as rhamnogalacturonan. *Carbohydrate Polymers* **74,** 411–418.

Bonnin E, Dolo E, Le Goff A, Thibault JF. 2002. Characterisation of pectin subunits released by an optimised combination of enzymes. *Carbohydrate Research* **337,** 1687–1696.

Bonnin E, Le Goff A, Alebeek G, Voragen A, Thibault JF. 2003. Mode of action of *Fusarium moniliforme* endopolygalacturonase towards acetylated pectin. *Carbohydrate Polymers* **52,** 381–388.

Bonnin E, Le Goff A, Körner R, Vigouroux J, Roepstorff P, Thibault JF. 2002. Hydrolysis of pectins with different degrees and patterns of methylation by the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1596,** 83–94.

Bordenave M. 1996. Analysis of pectin methyl esterases. *Plant Cell Wall Analysis* **17,** 165–180.

Bordenave M, Goldberg R. 1994. Immobilized and free apoplastic pectinmethylesterases in mung bean hypocotyl. *Plant Physiology* **106,** 1151–1156.

Bordenave M, Goldberg R, Huet JC, Pernollet JC. 1995. A novel protein from mung bean hypocotyl cell walls with acetyl esterase activity. *Phytochemistry* **38,** 315–319.

Borderies G, Jamet E, Lafitte C, Rossignol M, Jauneau A, Boudart G, Monsarrat B, Esquerré Tugayé MT, Boudet A, Pont-Lezica R. 2003. Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* **24,** 3421–3432.

Bosch M, Hepler PK. 2005. Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *The Plant Cell* **17,** 3219–3226.

Bosch M, Cheung AY, Hepler PK. 2005. Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiology* **138,** 1334–1346.

Bosch M, Hepler PK. 2006. Silencing of the tobacco pollen pectin methylesterase NtPPME1 results in retarded *in vivo* pollen tube growth. *Planta* **223,** 736–745.

Boudart G, Jamet E, Rossignol M, Lafitte C, Borderies G, Pont-Lezica R. 2005. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* **5,** 212–221.

Boudart G, Latte C, Barthe JP, Frasez D, Esquerré-Tugayé MT. 1998. Differential elicitation of defense responses by pectic fragments in bean seedlings. *Planta* **206,** 86–94.

Braybrook SA, Peaucelle A. 2013. Mechano-chemical aspects of organ formation in *Arabidopsis thaliana*: the relationship between auxin and pectin. *PLoS One* **8,** e57813.

Brummell DA, Cin VD, Crisosto C, Labavitch J. 2004. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany* **55,** 2029–2039.

Brummell DA, Harpster MH. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **47,** 311–340.

Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, De Lorenzo G. 2010. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **107,** 9452–9457.

Bugbee WM. 1993. A pectin lyase inhibitor protein from cell walls of sugar beet. *Physiologia Plantarum* **83,** 63–67.

Burton RA, Gidley MJ, Fincher GB. 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology* **6,** 724–732.

Cabrera JC, Boland A, Messiaen J, Cambier P, van Cutsem P. 2008. Egg box conformation of oligogalacturonides: the time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiology* **18,** 473–482.

Cação SM, Leite TF, Budzinski IG, Santos TB, Scholz MB, Carpentieri-Pipolo V, Domingues DS, Vieira LG, Pereira LF. 2012. Gene expression and enzymatic activity of pectin methylesterase during fruit development and ripening in *Coffea arabica* L. *Genetics and Molecular Research* **11,** 3186–3197.

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research* **37,** 233–238.

Camejo D, Martí MC, Jiménez A, Cabrera JC, Olmos E, Sevilla F. 2011. Effect of oligogalacturonides on root length, extracellular alkalinization and O2-accumulation in alfalfa. *Journal of Plant Physiology* **168,** 566–575.

Cao J. 2012. The pectin lyases in *Arabidopsis thaliana*: evolution, selection and expression profiles. *PLoS One* **7,** e46944.

Carpita NC, Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* **3,** 1–30.

Carvalho MC, Caldas DG, Carneiro RT, Moon DH, Salvatierra GR, Franceschini LM, Andrade A, Celedon PA, Oda S, Labate CA. 2008. SAGE transcript profiling of the juvenile cambial region of *Eucalyptus grandis*. *Tree Physiology* **28,** 905–919.

Catoire L, Pierron M, Morvan C, Penhoat du CH, Goldberg R. 1998. Investigation of the action patterns of pectinmethylesterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy. Implications in cell wall expansion. *Journal of Biological Chemistry* **273,** 33150–33156.

Cervone F, De Lorenzo G, Pressey R, Darvill AG, Albersheim P. 1990. Can Phaseolus PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants? *Phytochemistry* **29,** 447–449.

Chapman NH, Bonnet J, Grivet L, *et al*. 2012. High-resolution mapping of a fruit firmness-related quantitative trait locus in tomato reveals epistatic interactions associated with a complex combinatorial locus. *Plant Physiology* **159,** 1644–1657.

Charmont S, Jamet E, Pont-Lezica R, Canut H. 2005. Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochemistry* **66,** 453–461.

Che P, Lall S, Nettleton D, Howell S. 2006. Gene expression programs during shoot, root, and callus development in Arabidopsis tissue culture. *Plant Physiology* **141,** 620–637.

Chebli Y, Kaneda M, Zerzour R, Geitmann A. 2012. The cell wall of the Arabidopsis pollen tube—spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides. *Plant Physiology* **160,** 1940–1955.

Chen M, Citovsky V. 2003. Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *The Plant Journal* **35,** 386–392.

Chen E, Mort A. 1996. Nature of sites hydrolyzable by endopolygalacturonase in partially-esterified homogalacturonans. *Carbohydrate Polymers* **29,** 129–136.

Chen MH, Sheng J, Hind G, Handa AK, Citovsky V. 2000. Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO Journal* **19,** 913–920.

Cho S, Lee S, Shin W. 2001. The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase–octagalacturonate complex. *Journal of Molecular Biology* **314,** 863–878.

Chotigeat W, Duangchu S, Wititsuwannakun R, Phongdara A. 2009. Cloning and characterization of pectate lyase from *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **47,** 243–247.

Chourasia A, Sane VA, Nath P. 2006. Differential expression of pectate lyase during ethylene-induced postharvest softening of mango (*Mangifera indica* var. Dashehari). *Physiologia Plantarum* **128,** 546–555.

Christensen T, Nielsen J, Mikkelsen J. 1996. Isolation, characterization and immunolocalization of orange fruit acetyl esterase. *Progress in Biotechnology* **14,** 723–730.

Chun J, Huber D. 1998. Polygalacturonase-mediated solubilization and depolymerization of pectic polymers in tomato fruit cell walls. Regulation by pH and ionic conditions. *Plant Physiology* **117,** 1293–1299.

Clausen MH, Willats WG, Knox JP. 2003. Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. *Carbohydrate Research* **338,** 1797–1800.

Consales F, Schweizer F, Erb M, Gouhier-Darimont C, Bodenhausen N, Bruessow F, Sobhy I, Reymond P. 2011. Insect oral secretions suppress wound-induced responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **63,** 727–737.

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

Côté F, Hahn MG. 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology* **26,** 1379–1411.

Creze C, Castang S, Derivery E, Haser R, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Shevchik EV, Gouet P. 2008. The crystal structure of pectate lyase Pell from soft rot pathogen *Erwinia chrysanthemi* in complex with its substrate. *Journal of Biological Chemistry* **283,** 18260–18268.

Curvers K, Seifi H, Mouille G, *et al*. 2010. Abscisic acid deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **154,** 847–860.

Damasceno CMB, Lohse M, Usadel B, Rose JKC, Fernie AR. 2011. Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiology* **157,** 405–425.

Davidson RM, Gowda M, Moghe G, Lin H, Vaillancourt B, Shiu S, Jiang N, Buell CR. 2012. Comparative transcriptomics of three Poaceae species reveals patterns of gene expression evolution. *The Plant Journal* **71,** 492–202.

D'Avino R, Camardella L, Christensen TMIE, Giovane A, Servillo L. 2003. Tomato pectin methylesterase: modeling, fluorescence, and inhibitor interaction studies—comparison with the bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) enzyme. *Proteins* **53,** 830–839.

De Caroli M, Lenucci MS, Di Sansebastiano G, Dalessandro G, de Lorenzo G, Piro G. 2011*a*. Protein trafficking to the cell wall occurs through mechanisms distinguishable from default sorting in tobacco. *The Plant Journal* **65,** 295–308.

De Caroli M, Lenucci MS, Di Sansebastiano GP, Dalessandro G, de Lorenzo G, Piro G. 2011*b*. Dynamic protein trafficking to the cell wall. *Plant Signaling and Behavior* **6,** 1012–1015

Dedeurwaerder S, Menu-Bouaouiche L, Mareck A, Lerouge P, Guerineau F. 2009. Activity of an atypical *Arabidopsis thaliana* pectin methylesterase. *Planta* **229,** 311–321.

De Freitas ST, Handa AK, Wu Q, Park S, Mitcham EJ. 2012. Role of pectin methylesterases in cellular calcium distribution and blossom-end rot development in tomato fruit. *The Plant Journal* **71,** 824–835.

Deising H, Frittrang AK, Kunz S, Mendgen K. 1995. Regulation of pectin methylesterase and polygalacturonate lyase activity during differentiation of infection structures in *Uromyces viciae-fabae*. *Microbiology* **141,** 561–571.

De Ilarduya OM, Xie Q, Kaloshian I. 2003. Aphid-induced defense responses in Mi-1-mediated compatible and incompatible tomato interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16,** 699–708.

De-la-Peña C, Badri DV, Vivanco JM. 2008. Novel role for pectin methylesterase in Arabidopsis: a new function showing ribosome-inactivating protein (RIP) activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780,** 773–783.

Denès JM, Baron A, Renard CM, Péan C, Drilleau JF. 2000. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydrate Research* **327,** 385–393.

Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J. 2008. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Molecular Plant* **1,** 423–445.

Derbyshire P, McCann MC, Roberts K. 2007. Restricted cell elongation in Arabidopsis hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biology* **7,** 1–12.

De Vos M, Jander G. 2009. *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary components induce defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **32,** 1548–1560.

Deytieux-Belleau C, Vallet A, Donèche B, Geny L. 2008. Pectin methylesterase and polygalacturonase in the developing grape skin. *Plant Physiology and Biochemistry* **46,** 638–646.

Di Matteo A, Federici L, Mattei B, Salvi G, Johnson KA, Savino C, de Lorenzo G, Tsernoglou D, Cervone F. 2003. The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100,** 10124–10128.

Di Matteo A, Giovane A, Raiola A, Camardella L, Bonivento D, de Lorenzo G, Cervone F, Bellicampi D, Tsernoglou D. 2005. Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. *The Plant Cell* **17,** 849–858.

Di Matteo A, Sacco A, Anacleria M, Pezzotti M, Delledonne M, Ferrarini A, Frusciante L, Barone A. 2010. The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biology* **10,** 1–11.

Ding JL, Hsu JS, Wang MM, Tzen JT. 2002. Purification and glycosylation analysis of an acidic pectin methylesterase in jelly fig (*Ficus awkeotsang*) achenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50,** 2920–2925.

Ding JL, Lee TT, Wang MM, Tai SS, Tzen JT. 2000. Cloning and expression of an acidic pectin methylesterase from Jelly Fig (*Ficus awkeotsang*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **4,** 3052–3057.

Divol F, Vilaine F, Thibivilliers S, Amselem J, Palauqui J-C, Kusiak C, Dinant S. 2005. Systemic response to aphid infestation by *Myzus persicae* in the phloem of *Apium graveolens*. *Plant Molecular Biology* **57,** 517–540.

Dixit S, Upadhyay S, Singh H, Pandey B, Chandrashekar K, Verma P. 2013. Pectin methylesterase of Datura species, purification, and characterization from *Datura stramonium* and its application. *Plant Signaling and Behavior* **8,** e25681.

Do Amaral S, De Assis S, De Oliveira OF. 2005. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from orange (*Citrus sinensis*) cv. Pera-rio. *Journal of Food Biochemistry* **29,** 367–380.

Domingo C, Roberts K, Stacey NJ, Connerton I, Ruíz-Teran F, McCann MC. 1998. A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible. *The Plant Journal* **13,** 17–28.

Dominguez-Puigjaner E, LLop I, Vendrell M, Prat S. 1997. A cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases. *Plant Physiology* **114,** 1071–1076.

Dorokhov YL, Komarova TV, Petrunia I. 2012*a*. Airborne signals from a wounded leaf facilitate viral spreading and induce antibacterial resistance in neighboring plants. *PLoS Pathogens* **8,** e1002640.

Dorokhov YL, Komarova TV, Petrunia IV, Kosorukov VS, Zinovkin RA, Shindyapina AV, Frolova OY, Gleba YY. 2012*b*. Methanol may function as a cross-kingdom signal. *PLoS One* **7,** e36122.

Dorokhov YL, Mäkinen K, Frolova O, Merits A, Saarinen J, Kalkkinen N, Atabekov J, Saarma M. 1999. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Letters* **461,** 223–228.

Dorokhov YL, Skurat EV, Frolova OY, *et al*. 2006. Role of the leader sequence in tobacco pectin methylesterase secretion. *FEBS Letters* **580,** 3329–3334.

D'Ovidio R, Raiola A, Capodicasa C, Devoto A, Pontiggia D, Roberti S, Galletti R, Conti E, O'Sullivan D, De Lorenzo G. 2004. Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. *Plant Physiology* **135,** 2424–2435.

Downie A, Miyazaki S, Bohnert H, John P, Coleman J, Parry M, Haslam R. 2004. Expression profiling of the response of *Arabidopsis thaliana* to methanol stimulation. *Phytochemistry* **65,** 2305–2316.

Draye M, Cutsem P. 2008. Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. *Journal of Plant Physiology* **165,** 1152–1160.

Dreyer D, Campbell B. 1984. Association of the degree of methylation of intercellular pectin with plant resistance to aphids and with induction of aphid biotypes. *Experientia* **40,** 224–226.

Ehwald R, Woehlecke H, Titel C. 1992. Cell wall microcapsules with different porosity from suspension cultured *Chenopodium album*. *Phytochemistry* **31,** 3033–3038.

Ericksson E, Bovy A, Manning K, Harrison L, Andrews J, Silva J, Tucker G, Seymour G. 2004. Effect of the colorless non-ripening mutation on cell wall biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening. *Plant Physiology* **136,** 4184–4197.

Falasca G, Capitani F, Rovere F, Zaghi D, Franchin C, Biondi S, Altamura M. 2008. Oligogalacturonides enhance cytokinin-induced vegetative shoot formation in tobacco explants, inhibit polyamine biosynthetic gene expression, and promote long-term remobilisation of cell calcium. *Planta* **227,** 835–852.

Fall R. 1999. Biogenic emissions of volatile organic compounds from higher plants. In: Hewitt CN, ed. *Reactive hydrocarbons in the atmosphere*. New York: Academic Press, 43–96.

Federici L, Caprari C, Mattei B, Savino C, Di Matteo A, De Lorenzo G, Cervone F, Tsernoglou D. 2001. Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98,** 13425–13430.

Felton GW, Tumlinson JH. 2008. Plant–insect dialogs: complex interactions at the plant–insect interface. *Current Opinion in Plant Biology* **11,** 457–463.

Ferrari S, Galletti R, Vairo D, Cervone F, De Lorenzo G. 2006. Antisense expression of the *Arabidopsis thaliana AtPGIP1* gene reduces polygalacturonase-inhibiting protein accumulation and enhances susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19,** 931–936.

Ferrari S, Savatin D, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, de Lorenzo G. 2013. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science* **4,** 1–9.

Ferrari S, Vairo D, Ausubel FM, Cervone F, De Lorenzo G. 2003. Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *The Plant Cell* **15,** 93–106.

Francis KE, Lam SY, Copenhaver GP. 2006. Separation of Arabidopsis pollen tetrads is regulated by QUARTET1, a pectin methylesterase gene. *Plant Physiology* **142,** 1004–1013.

Frenkel C. 1998. Pectin methylesterase regulates methanol and ethanol accumulation in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *Journal of Biological Chemistry* **273,** 4293–4295.

Fries M, Ihrig J, Brocklehurst K, Shevchik V, Pickersgill R. 2007. Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. *EMBO Journal* **26,** 3879–3887.

Fry SC. 1998. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal* **332,** 507–515.

Fry SC. 2004. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist* **161,** 641–675.

Gaffe J, Tieman D, Handa A. 1994. Pectin methylesterase isoforms in tomato (*Lycopersicon esculentum*) tissues (effects of expression of a pectin methylesterase antisense gene). *Plant Physiology* **105,** 199–203.

García JM, Posé S, Muñoz-Blanco J, Quesada MA, Mercado JA. 2009. The polygalacturonase FaPG1 gene plays a key role in strawberry fruit softening. *Plant Signaling and Behavior* **4,** 766–768.

Gasanova T, Skurat E, Frolova O, Semashko M, Dorokhov Y. 2008. Pectin methylesterase as a factor of plant transcriptome stability. *Molecular Biology* **42,** 421–429.

Geisler-Lee J, Geisler M, Coutinho PM, *et al*. 2006. Poplar carbohydrate-active enzymes. Gene identification and expression analyses. *Plant Physiology* **140,** 946–962.

Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, Höfte H. 1997. Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **114,** 295–305.

Gibeaut DM, Pauly M, Bacic A. 2005. Changes in cell wall polysaccharides in developing barley (*Hordeum vulgare*) coleoptiles. *Planta* **221,** 729–738.

Gille S, Pauly M. 2012. O-Acetylation of plant cell wall polysaccharides. *Frontiers in Plant Science* **3,** 1–7.

Giovane A, Servillo L, Balestrieri C, Raiola A, D'Avino R, Tamburrini M, Ciardiello MA, Camardella L. 2004. Pectin methylesterase inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta* **1696,** 245–252.

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

Gonzalez-Carranza ZH, Elliott KA, Roberts JA. 2007. Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **58,** 3719–3730.

Gonzalez-Carranza ZH, Shahid AA, Zhang L, Liu Y, Ninsuwan U, Roberts JA. 2012. A novel approach to dissect the abscission process in Arabidopsis. *Plant Physiology* **160,** 1342–1356.

Gonzalez-Carranza ZH, Whitelaw CA, Swarup R, Roberts JA. 2002. Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and Arabidopsis. *Plant Physiology* **128,** 534–543.

Gou J, Miller LM, Hou G, Yu X, Chen X, Liu C. 2012. Acetylesterase-mediated deacetylation of pectin impairs cell elongation, pollen germination, and plant reproduction. *The Plant Cell* **24,** 50–65.

Gout E, Aubert S, Bligny R, Rébeillé F, Nonomura AR, Benson AA, Douce R. 2000. Metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies. *Plant Physiology* **123,** 287–296.

Goulao LF, Vieira-Silva S, Jackson PA. 2011. Association of hemicellulose- and pectin-modifying gene expression with *Eucalyptus globulus* secondary growth. *Plant Physiology and Biochemistry* **49,** 873–881.

Grasdalen H, Andersen A, Larsen B. 1996. NMR spectroscopy studies of the action pattern of tomato pectinesterase: generation of block structure in pectin by a multiple-attack mechanism. *Carbohydrate Research* **289,** 105–114.

Guénin S, Mareck A, Rayon C, *et al*. 2011. Identification of pectin methylesterase 3 as a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **192,** 114–126.

Habrant A, Gaillard C, Ralet M, Lairez D, Cathala B. 2009. Relation between chemical structure and supramolecular organization of synthetic lignin–pectin particles. *Biomacromolecules* **10,** 3151–3156.

Hadfield K, Bennett A. 1998. Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology* **117,** 337–343.

Hamant O, Meyerowitz EM, Traas J. 2011. Is cell polarity under mechanical control in plants? *Plant Signaling and Behavior* **6,** 137–139.

Harmel N, Haubruge É, Francis F. 2010. Étude des salives de pucerons: un préalable au développement de nouveaux bio-insecticides. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **14,** 369–378.

Hasunuma T, Fukusaki E, Kobayashi A. 2004. Expression of fungal pectin methylesterase in transgenic tobacco leads to alteration in cell wall metabolism and a dwarf phenotype. *Journal of Biotechnology* **111,** 241–251.

Hause B, Fester T. 2004. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* **221,** 184–196.

Hayashi K. 2012. The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant and Cell Physiology* **53,** 965–975.

Heil M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* **178,** 41–61.

Herron SR, Benen JA, Scavetta RD, Visser J, Jurnak F. 2000. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97,** 8762–8769.

Hewezi T, Howe P, Maier TR, Hussey RS, Mitchum MG, Davis EL, Baum TJ. 2008. Cellulose binding protein from the parasitic nematode *Heterodera schachtii* interacts with Arabidopsis pectin methylesterase: cooperative cell wall modification during parasitism. *The Plant Cell* **20,** 3080–3093.

Hohnjec N, Vieweg MF, Pühler A, Becker A, Küster H. 2005. Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different Glomus fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **137,** 1283–1301.

Hongo S, Sato K, Yokoyama R, Nishitani K. 2012. Demethylesterification of the primary wall by PECTIN METHYLESTERASE35 provides mechanical support to the Arabidopsis stem. *The Plant Cell* **24,** 2624–2634.

Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P. 2008. Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics* **2008,** 1–5.

Huang L, Cao J, Zhang A, Ye Y, Zhang Y, Liu T. 2009*a*. The polygalacturonase gene *BcMF2* from *Brassica campestris* is associated with intine development. *Journal of Experimental Botany* **60,** 301–313.

Huang K, Mellor KE, Paul SN, Lawson MJ, Mackey AJ, Timko MP. 2012. Global changes in gene expression during compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) with the root parasitic angiosperm *Striga gesnerioides*. *BMC Genomics* **13,** 1–15.

Huang L, Ye Y, Zhang Y, Zhang A, Liu T, Cao J. 2009*b*. BcMF9, a novel polygalacturonase gene, is required for both *Brassica campestris* intine and exine formation. *Annals of Botany* **104,** 1339–1351.

Hwang BH, Bae H, Lim H-S, Kim KB, Kim SJ, Im M-H, Park B-S, Kim DS, Kim J. 2010. Overexpression of polygalacturonase-inhibiting protein 2 (*PGIP2*) of Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) increased resistance to the bacterial pathogen *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **103,** 293–305.

International Brachypodium Initiative. 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* **463,** 763–768.

Irshad M, Canut H, Borderies G, Pont-Lezica R, Jamet E. 2008. A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biology* **8,** 1–16.

Ishii T. 1997. O-Acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. *Plant Physiology* **113,** 1265–1272.

Ishii T, Matsunaga T. 2001. Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry* **57,** 969–974.

Jamet E, Roujol D, San-Clemente H, Irshad M, Soubigou-Taconnat L, Renou J, Pont-Lezica R. 2009. Cell wall biogenesis of *Arabidopsis thaliana* elongating cells: transcriptomics complements proteomics. *BMC Genomics* **10,** 1–12.

Jaubert S, Laffaire J, Abad P, Rosso M. 2002. A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *FEBS Letters* **522,** 109–112.

Jayani R, Saxena S, Gupta R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry* **40,** 2931–2944.

Jenkins J, Mayans O, Smith D, Worboys K, Pickersgill RW. 2001. Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *Journal of Molecular Biology* **305,** 951–960.

Jenkins J, Pickersgill R. 2001. The architecture of parallel β-helices and related folds. *Biophysics and Molecular Biology* **77,** 111–175.

Jenkins J, Shevckik V, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. 2004. The crystal structure of pectate lyase Pel9A from *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Biological Chemistry* **279,** 9139–9145.

Jiang S, Yang SL, Xie LF, San Puah CH, Zhang XQ, Yang WC, Sundaresan V, Ye D. 2005. VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the Arabidopsis style and transmitting tract. *The Plant Cell* **17,** 584–596.

Jimenez-Bermudez S, Redondo-Nevado J, Munoz-Blanco J, Caballero JL, Lopez-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA. 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiology* **128,** 751–759.

Johansson K, El-Ahmad M, Friemann R, Jörnvall H, Markovic O, Eklund H. 2002. Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Letters* **514,** 243–249.

Jolie RP, Duvetter T, Houben K, Clynen E, Sila DN, van Loey AMV, van Loey AM, Hendrickx ME. 2009. Carrot pectin methylesterase and its inhibitor from kiwi fruit: study of activity, stability and inhibition. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **10,** 601–609.

Jolie RP, Duvetter T, van Loey AMV, van Loey AM, Hendrickx ME. 2010. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research* **345,** 2583–2595.

Joubert DA, Slaughter AR, Kemp G, Becker JVW, Krooshof GH, Bergmann C, Benen J, Pretorius IS, Vivier MA. 2006. The grapevine polygalacturonase-inhibiting protein (VvPGIP1) reduces *Botrytis cinerea* susceptibility in transgenic tobacco and differentially inhibits fungal polygalacturonases. *Transgenic Research* **15,** 687–702.

Juge N. 2006. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science* **11,** 359–367.

Kabel MA, Waard P, Schols HA, Voragen AG. 2003. Location of O-acetyl substituents in xylo-oligosaccharides obtained from hydrothermally treated Eucalyptus wood. *Carbohydrate Research* **338,** 69–77.

Kahl J, Siemens DH, Aerts RJ, Gäbler R, Kühnemann F, Preston CA, Baldwin IT. 2000. Herbivore-induced ethylene suppresses a direct defense but not a putative indirect defense against an adapted herbivore. *Planta* **210,** 336–342.

Kanai M, Nishimura M, Hayashi M. 2010. A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of ABI5. *The Plant Journal* **62,** 936–947.

Kars I, Krooshof GH, Wagemakers L, Joosten R, Benen JA, van Kan JA. 2005. Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *The Plant Journal* **43,** 213–225.

Kauppinen S, Christgau S, Kofod L, Halkier T, Dorreich K, Daldoge H. 1995. Molecular cloning and characterization of a rhamnogalacturonan acetylesterase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Biological Chemistry* **270,** 27172–27178.

Kempema LA, Cui X, Holzer FM, Walling LL. 2007. *Arabidopsis* transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology* **143,** 849–865.

Kiefer L, York W, Darvill A, Albersheim P. 1989. Xyloglucan isolated from suspension-cultured sycamore cell walls is O-acetylated. *Phytochemistry* **28,** 2105–2107.

King D, Bergmann C, Orlando R, Benen JA, Kester HC, Visser J. 2002. Use of amide exchange mass spectrometry to study conformational changes within the endopolygalacturonase II–homogalacturonan–polygalacturonase inhibiting protein system. *Biochemistry* **41,** 10225–10233.

Kohorn BD, Kohorn SL. 2012. The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Frontier in Plant Science* **3,** 1–5.

Körner E, von Dahl CC, Bonaventure G, Baldwin IT. 2009. Pectin methylesterase Na*PME1* contributes to the emission of methanol during insect herbivory and to the elicitation of defence responses in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Experimental Botany* **60,** 2631–2640.

Kuśnierczyk A, Winge P, Jørstad TS, Troczyńska J, Rossiter JT, Bones AM. 2008. Towards global understanding of plant defence against aphids—timing and dynamics of early *Arabidopsis* defence responses to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack. *Plant, Cell and Environment* **31,** 1097–1115.

Lahaye M, Falourd X, Quemener B, Ralet M, Howad W, Dirlewanger E, Arús P. 2012. Cell wall polysaccharide chemistry of peach genotypes with contrasted textures and other fruit traits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60,** 6594–6605.

Lairez D, Cathala B, Monties B, Bedos-Belval F, Duran H, Gorrichon L. 2005. Aggregation during coniferyl alcohol polymerization in pectin solution: a biomimetic approach of the first steps of lignification. *Biomacromolecules* **6,** 763–774.

Lashbrook CC, Cai S. 2008. Cell wall remodeling in Arabidopsis stamen abscission zones. *Plant Signaling and Behavior* **3,** 733–736.

Laskowski M, Biller S, Stanley K, Kajstura T, Prusty R. 2006. Expression profiling of auxin-treated Arabidopsis roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant and Cell Physiology* **47,** 788–792.

Leake JR. 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* **127,** 171–216.

Leblová S, Perglerová E, Hlochová J. 1977. Comparative study of plant alcohol dehydrogenases. *Biologia Plantarum* **19,** 88–95.

Lee KB. 2007. Structure and development of the upper haustorium in the parasitic flowering plant *Cuscuta japonica* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* **94,** 737–745.

Lewis KC, Selzer T, Shahar C, Udi Y, Tworowski D, Sagi I. 2008. Inhibition of pectin methyl esterase activity by green tea catechins. *Phytochemistry* **69,** 2586–2592.

Li X, Wu HX, Southerton SG. 2011. Transcriptome profiling of *Pinus radiata* juvenile wood with contrasting stiffness identifies putative candidate genes involved in microfibril orientation and cell wall mechanics. *BMC Genomics* **12,** 1–16.

Li X, Wu HX, Southerton SG. 2012. Identification of putative candidate genes for juvenile wood density in *Pinus radiata*. *Tree Physiology* **32,** 1046–1057.

Li Y, Zou J, Li M, Bilgin DD, Vodkin LO, Hartman GL, Clough SJ. 2008. Soybean defense responses to the soybean aphid. *New Phytologist* **179,** 185–195.

Lietzke S, Scavetta R, Yoder M, Jurnak F. 1996. The refined three-dimensional structure of pectate lyase E from *Erwinia chrysanthemi* at 2.2 A resolution. *Plant Physiology* **111,** 73–92.

Lievens S, Goormachtig S, Holsters M. 2001. A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. *Nucleic Acids Research* **29,** 3459–3468.

Lievens S, Goormachtig S, Herman S, Holsters M. 2002. Patterns of pectin methylesterase transcripts in developing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15,** 164–168.

Lin TP, Liu CC, Chen SW, Wang WY. 1989. Purification and characterization of pectin methylesterase from *Ficus awkeotsang* makino achenes. *Plant Physiology* **91,** 1445–1453.

Lionetti V, Francocci F, Ferrari S, Volpi C, Bellincampi D, Galletti R, D'Ovidio R, De Lorenzo G, Cervone F. 2010. Engineering the cell wall by reducing de-methyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **107,** 616–621.

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

Lionetti V, Raiola A, Camardella L, Giovane A, Obel N, Pauly M, Favaron F, Cervone F, Bellincampi D. 2007. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **143,** 1871–1880.

Little D, Gouhier-Darimont C, Bruessow F, Reymond P. 2007. Oviposition by pierid butterflies triggers defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143,** 784–800.

Lohar DP, Sharopova N, Endre G, Peñuela S, Samac D, Town C, Silverstein KAT, Vandenbosch KA. 2006. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **140,** 221–234.

Losner-Goshen D, Portnoy VH, Mayer AM, Joel DM. 1998. Pectolytic activity by the haustorium of the parasitic plant *Orobanche* L. (Orobanchaceae) in host roots. *Annals of Botany* **81,** 319–326.

Louvet R, Rayon C, Domon J, *et al*. 2011. Major changes in the cell wall during silique development in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **72,** 59–67.

Lunn D, Phan TD, Tucker GA, Lycett GW. 2013. Cell wall composition of tomato fruit changes during development and inhibition of vesicle trafficking is associated with reduced pectin levels and reduced softening. *Plant Physiology and Biochemistry* **66,** 91–97.

Ly-Nguyen B, van Loey AM, Smout C, Verlent I, Duvetter T, Hendrickx ME. 2004. Effect of intrinsic and extrinsic factors on the

interaction of plant pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor from kiwi fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52,** 8144–8150.

Manabe Y, Nafisi M, Verhertbruggen Y, *et al*. 2011. Loss-of-function mutation of *REDUCED WALL ACETYLATION2* in *Arabidopsis* leads to reduced cell wall acetylation and increased resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **155,** 1068–1078.

Manfredini C, Sicilia F, Ferrari S, Pontiggia D, Salvi G, Caprari C, Lorito M, Lorenzo GD. 2005. Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **67,** 108–115.

Mareck A, Gaffé J, Morvan O, Alexandre C, Morvan C. 1995. Characterization of isoforms of pectin methylesterase of *Linum usitatissimum* using polyclonal antibodies. *Plant and Cell Physiology* **36,** 409–417.

Martínez MC, Achkor H, Persson B, Fernández MR, Shafqat J, Farrés J, Jörnvall H, Parés X. 1996. *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* **241,** 849–857.

Marty P, Jouan B, Bertheau Y, Vian B, Goldberg R. 1997. Charge density in stem cell walls of *Solanum tuberosum* genotypes and susceptibility to blackleg. *Phytochemistry* **44,** 1435–1441.

Mathieu Y, Armen K, Xia H, Guern J, Koller A. 1991. Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *The Plant Journal* **1,** 333–343.

Mauro M, Lorenzo G, Costantino P, Bellincampi D. 2002. Oligogalacturonides inhibit the induction of late but not of early auxin-responsive genes in tobacco. *Planta* **215,** 494–501.

Mayans O, Scott M, Connerton I, Gravesen T, Benen J, Visser J, Pickersgill R, Jenkins J. 1997. Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Current Biology* **5,** 677–689.

Mbéguié-A-Mbéguié D, Hubert O, Baurens F, Matsumoto T, Chillet M, Fils-Lycaon B, Sidibé-Bocs S. 2009. Expression patterns of cell wall-modifying genes from banana during fruit ripening and in relationship with finger drop. *Journal of Experimental Botany* **60,** 2021–2034.

McMillan GP, Hedley D, Fyffe L, Pérombelon MCM. 1993. Potato resistance to soft-rot erwinias is related to cell wall pectin esterification. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42,** 279–289.

Mercadante D, Melton L, Jameson G, Williams MK, De Simone A. 2013. Substrate dynamics in enzyme action: rotations of monosaccharide subunits in the binding groove are essential for pectin methylesterase processivity. *Biophysical Journal* **104,** 1731–1739.

Mertens JA, Bowman MJ. 2011. Expression and characterization of fifteen *Rhizopus oryzae* 99–880 polygalacturonase enzymes in *Pichia pastoris*. *Current Microbiology* **62,** 1173–1178.

Messiaen J, Read N, Cutsem P, Trewavas A. 1993. Cell wall oligogalacturonides increase cytosolic free calcium in carrot protoplasts. *Journal of Cell Science* **104,** 365.

Micheli F. 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* **6,** 414–419.

Micheli F, Sundberg B, Goldberg R, Richard L. 2000. Radial distribution pattern of pectin methylesterases across the cambial region of hybrid aspen at activity and dormancy. *Plant Physiology* **124,** 191–199.

Miller AR. 1986. Oxidation of cell wall polysaccharides by hydrogen peroxide: a potential mechanism for cell wall breakdown in plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **141,** 238–244.

Moerschbacher BM, Mierau M, Graeßner B, Noll U, Mort AJ. 1999. Small oligomers of galacturonic acid are endogenous suppressors of disease resistance reactions in wheat leaves. *Journal of Experimental Botany* **50,** 605–612.

Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **11,** 266–277.

Mollet J, Leroux C, Dardelle F, Lehner A. 2013. Cell wall composition, biosynthesis and remodeling during pollen tube growth. *Plants* **2,** 107–147.

Moloi M, van der Westhuizen A. 2006. The reactive oxygen species are involved in resistance responses of wheat to the Russian wheat aphid. *Journal of Plant Physiology* **163,** 1118–1125.

Monshausen GB, Miller ND, Murphy AS, Gilroy S. 2011. Dynamics of auxin-dependent Ca^{2+} and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. *The Plant Journal* **65,** 309–318.

Morris ER, Powell DA, Rees DA. 1982. Conformations and interactions of pectins. I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *Journal of Molecular Biology* **155,** 507–516.

Moscatiello R, Mariani P, Sanders D, Maathuis FJM. 2006. Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany* **57,** 2847–2865.

Müller K, Levesque-Tremblay G, Bartels S, Weitbrecht K, Wormit A, Usadel B, Haughn G, Kermode AR. 2013. Demethylesterification of cell wall pectins in Arabidopsis plays a role in seed germination. *Plant Physiology* **161,** 305–316.

Muñoz JA, Coronado C, Pérez-Hormaeche J, Kondorosi A, Ratet P, Palomares AJ. 1998. *MsPG3*, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa–*Rhizobium meliloti* interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95,** 9687–9692.

Narusaka Y, Narusaka M, Motoaki S, Ishida J, Shinozaki K, Nan Y, Park P, Shiraishi T, Kobayashi M. 2005. Cytological and molecular analyses of non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Alternaria alternata*. *Molecular Plant Pathology* **6,** 615–627.

Navazio L, Moscatiello R, Bellincampi D, Baldan B, Meggio F, Brini M, Bowler C, Mariani P. 2002. The role of calcium in oligogalacturonide-activated signalling in soybean cells. *Planta* **215,** 596–605.

Ngouémazong DE, Jolie RP, Cardinaels R, Fraeye I, van Loey AV, van Loey A, Moldenaers P, Hendrickx M. 2012. Stiffness of Ca^{2+}–pectin gels: combined effects of degree and pattern of methylesterification for various Ca^{2+} concentrations. *Carbohydrate Research* **348,** 69–76.

Nogota Y, Ohta H, Voragen A. 1993. Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry* **34,** 617–620.

Ochoa-Villarreal M, Aispuro-Hernández E, Vargas-Arispuro I, Martínez-Téllez MÁ. 2012. Plant cell wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives. In: De Souza Gomes A, ed. *Polymerization*. InTech, 64–89.

Oelofse D, Dubery IA, Meyer R, Arendse MS, Gazendam I, Berger DK. 2006. Apple polygalacturonase inhibiting protein1 expressed in transgenic tobacco inhibits polygalacturonases from fungal pathogens of apple and the anthracnose pathogen of lupins. *Phytochemistry* **67,** 255–263.

Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA. 2011. The rules of engagement in the legume–rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics* **45,** 119–144.

Oosterveld A, Beldman G, Searle-van Leeuwen, Voragen AGJ. 2000. Effect of enzymatic deacetylation on gelation of sugar beet pectin in the presence of calcium. *Carbohydrate Polymers* **43,** 249–256.

Orfila C, Degan FD, Jørgensen B, Scheller HV, Ray PM, Ulvskov P. 2012. Expression of mung bean pectin acetyl esterase in potato tubers: effect on acetylation of cell wall polymers and tuber mechanical properties. *Planta* **236,** 185–196.

Orozco-Cardenas M, Ryan C. 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96,** 6553–6557.

Osorio S, Alba R, Damasceno CMB, *et al*. 2011*b*. Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (nor, rin) and ethylene receptor (Nr) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiology* **157,** 405–425.

Osorio S, Bombarely A, Giavalisco P, Usadel B, Stephens C, Aragüez I, Medina-Escobar N, Botella MA, Fernie AR, Valpuesta V. 2011*a*. Demethylation of oligogalacturonides by FaPE1 in the fruits of the wild strawberry *Fragaria vesca* triggers metabolic and transcriptional changes associated with defence and development of the fruit. *Journal of Experimental Botany* **62,** 2855–2873.

Osorio S, Castillejo C, Quesada MA, Medina-Escobar N, Brownsey GJ, Suau R, Heredia A, Botella MA, Valpuesta V. 2008. Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). *The Plant Journal* **54,** 43–55.

Palin R, Geitmann A. 2012. The role of pectin in plant morphogenesis. *Biosystem* **109,** 397–402.

Palusa SG, Golovkin M, Shin SB, Richardson DN, Reddy AS. 2007. Organ-specific, developmental, hormonal and stress regulation of expression of putative pectate lyase genes in Arabidopsis. *New Phytologist* **174,** 537–550.

Pathak N, Mishra S, Sanwal GG. 2000. Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry* **54,** 147–152.

Pathak N, Sanwal GG. 1998. Multiple forms of polygalacturonase from banana fruits. *Phytochemistry* **48,** 249–255.

Payasi A, Sanwal GG. 2003. Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. *Phytochemistry* **63,** 243–248.

Paynel F, Schaumann A, Arkoun M, Douchiche O, Morvan C. 2009. Temporal regulation of cell-wall pectin methylesterase and peroxidase isoforms in cadmium-treated flax hypocotyl. *Annals of Botany* **104,** 1363–1372.

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

Peaucelle A, Louvet R, Johansen JN, Höfte H, Laufs P, Pelloux J, Mouille G. 2008. Arabidopsis phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall pectins. *Current Biology* **18,** 1943–1948.

Peaucelle A, Louvet R, Johansen JN, *et al*. 2011*b*. The transcription factor BELLRINGER modulates phyllotaxis by regulating the expression of a pectin methylesterase in Arabidopsis. *Development* **138,** 4733–4741.

Pelletier S, Van Orden J, Wolf S, *et al*. 2010. A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown Arabidopsis hypocotyls. *New Phytologist* **188,** 726–739.

Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz EJ. 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* **12,** 267–277.

Peña-Uribe C, García-Pineda E, Beltrán-Peña E, Cruz H. 2012. Oligogalacturonides inhibit growth and induce changes in S6K phosphorylation in maize (*Zea mays* L. var. Chalqueño). *Plant Growth Regulation* **67,** 151–159.

Peñuelas J, Filella I, Stefanescu C, Llusià J. 2005. Caterpillars of *Euphydryas aurinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) feeding on *Succisa pratensis* leaves induce large foliar emissions of methanol. *New Phytologist* **167,** 851–857.

Peretto R, Bonfante P, Bettini V, Favaron F, Alghisi P. 1995. Polygalacturonase activity and location in arbuscular mycorrhizal roots of *Allium porrum* L. *Mycorrhiza* **5,** 157–163.

Perfect SE, Green JR. 2001. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology* **2,** 101–108.

Perrot-Rechenmann C. 2010. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2,** 1–15.

Philippar K, Fuchs I, Luthen H, *et al*. 1999. Auxin-induced K^+ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96,** 12186–12191.

Philippar K, Ivashikina N, Ache P, Christian M, Luthen H, Palme K, Hedrich R. 2004. Auxin activates KAT1 and KAT2, two K+-channel genes expressed in seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **37,** 815–827.

Pickersgill R, Jenkins J, Harris G, Nasser W, Robert-Baudouy. 1994. The structure of Bacillus subtilis pectate lyase in complex with calcium. *Nature Structural Biology* **1,** 717–723.

Pickersgill R, Smith D, Worboys K, Jenkins J. 1998. Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. carotovora. *Journal of Biological Chemistry* **273,** 24660–24664.

Pilling J, Willmitzer L, Bucking H, Fisahn J. 2004. Inhibition of a ubiquitously expressed pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L. affects plant growth, leaf growth polarity, and ion partitioning. *Planta* **219,** 32–40.

Pilnik W, Rombouts FM. 1981. Pectic enzymes. In: Birch GG, Blakebrough N, Parker KJ. *Enzymes and food processing*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 105–128.

Popeijus H, Overmars H, Jones J, Blok V, Goverse A, Helder J, Schots A, Bakker J, Smant G. 2000. Enzymology: degradation of plant cell walls by a nematode. *Nature* **406,** 36–37.

Powell AL, van Kan J, Have ten A, Visser J, Greve LC, Bennett AB, Labavitch JM. 2000. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13,** 942–950.

Pressey R, Avants JK. 1973. Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. *Plant Physiology* **52,** 252–256.

Pressey R, Avants JK. 1977. Occurrence and properties of polygalacturonase in *Avena* and other plants. *Plant Physiology* **60,** 548–553.

Protsenko MA, Buza NL, Krinitsyna AA, Bulantseva EA, Korableva NP. 2008. Polygalacturonase-inhibiting protein is a structural component of plant cell wall. *Biochemistry (Moscow)* **73,** 1053–1062.

Pua EC, Ong CK, Liu P, Liu JZ. 2001. Isolation and expression of two pectate lyase genes during fruit ripening of banana (*Musa acuminata*). *Physiologia Plantarum* **113,** 92–99.

Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, *et al*. 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **40,** 290–301.

Puthoff D, Nettleton D, Rodermel S, Baum T. 2003. *Arabidopsis* gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *The Plant Journal* **33,** 911–921.

Qu T, Liu R, Wang W, An L, Chen T, Liu G, Zhao Z. 2011. Brassinosteroids regulate pectin methylesterase activity and AtPME41 expression in Arabidopsis under chilling stress. *Cryobiology* **63,** 111–117.

Qubbaj T, Reineke A, Zebitz C. 2005. Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **115,** 145–152.

Quesada MA, Blanco-Portales R, Pose S, Garcia-Gago JA, Jimenez-Bermudez S, Munoz-Serrano A, Caballero JL, Pliego-Alfaro F, Mercado JA, Munoz-Blanco J. 2009. Antisense down-regulation of the FaPG1 gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening. *Plant Physiology* **150,** 1022–1032.

Raiola A, Camardella L, Giovane A, Mattei B, de Lorenzo G, Cervone F, Bellincampi D. 2004. Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. *FEBS Letters* **557,** 199–203.

Raiola A, Lionetti V, Elmaghraby I, Immerzeel P, Mellerowicz E, Salvi G, Cervone F, Bellincampi D. 2011. Pectin methylesterase is induced in *Arabidopsis* upon infection and is necessary for a successful colonization by necrotrophic pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24,** 432–440.

Ralet M, Cabrera JC, Bonnin E, Quéméner B, Hellìn P, Thibault J. 2005. Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemistry* **66,** 1832–1843.

Ralet M, Crépeau M, Buchholt H, Thibault J. 2003. Polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties of sugar beet pectins differing in their degrees of methylation and acetylation. *Biochemical Engineering Journal* **16,** 191–201.

Randoux B, Renard-Merlier D, Mulard G, Rossard S, Duyme F, Sanssené J, Courtois J, Durand R, Reignault P. 2010. Distinct defenses induced in wheat against powdery mildew by acetylated and nonacetylated oligogalacturonides. *Phytopathology* **100,** 1352–1363.

Rautengarten C, Usadel B, Neumetzler L, Hartmann J, Büssis D, Altmann T. 2008. A subtilisin-like serine protease essential for mucilage release from Arabidopsis seed coats. *The Plant Journal* **54,** 466–480.

Rayle DL, Cleland RE. 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* **99,** 1271–1274.

Reca IB, Lionetti V, Camardella L, D'Avino R, Giardina T, Cervone F, Bellincampi D. 2012. A functional pectin methylesterase inhibitor protein (SolyPMEI) is expressed during tomato fruit ripening and interacts with PME-1. *Plant Molecular Biology* **79,** 429–442

Refregier G, Pelletier S, Jaillard D, Höfte H. 2004. Interaction between wall deposition and cell elongation in dark-grown hypocotyl cells in Arabidopsis. *Plant Physiology* **135,** 959–968.

Renard C, Jarvis M. 1999. Acetylation and methylation of homogalacturonans 2: effect on ion-binding properties and conformations. *Carbohydrate Polymers* **39,** 209–216.

Rencoret J, Gutierrez A, Nieto L, Jimenez-Barbero J, Faulds CB, Kim H, Ralph J, Martinez AT, Rio JC. 2011. Lignin composition and structure in young versus adult *Eucalyptus globulus* plants. *Plant Physiology* **155,** 667–682.

Rexova-Benkova L, Markovic O. 1976. Pectic enzymes. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **33,** 323–385.

Rhee SY, Osborne E, Poindexter P, Somerville C. 2003. Microspore separation in the quartet 3 mutants of Arabidopsis is impaired by a defect in a developmentally regulated polygalacturonase required for pollen mother cell wall degradation. *Plant Physiology* **133,** 1170–1180.

Ribeiro DM, Araujo WL, Fernie AR, Schippers JH, Mueller-Roeber B, 2012. Translatome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **63,** 2769–2786.

Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57,** 929–967.

Rober-Kleber N, Albrechtová JT, Fleig S, Huck N, Michalke W, Wagner E, Speth V, Neuhaus G, Fischer-Iglesias C. 2003. Plasma membrane H^+-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiology* **131,** 1302–1312.

Robert H, Friml J. 2009. Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology* **5,** 325–332.

Roongsattham P, Morcillo F, Jantasuriyarat C, *et al*. 2012. Temporal and spatial expression of polygalacturonase gene family members reveals divergent regulation during fleshy fruit ripening and abscission in the monocot species oil palm. *BMC Plant Biology* **12,** 1–15.

Rose J, Braam J, Fry S. 2002. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant and Cell Physiology* **43,** 1421–1435.

Ross HA, Morris WL, Ducreux LJM, *et al*. 2011*a*. Pectin engineering to modify product quality in potato. *Plant Biotechnology Journal* **9,** 848–856.

Ross HA, Wright KM, McDougall GJ, *et al*. 2011*b*. Potato tuber pectin structure is influenced by pectin methyl esterase activity and impacts on cooked potato texture. *Journal of Experimental Botany* **62,** 371–381.

Rustérucci C, Espunya MC, Díaz M, Chabannes M, Martínez MC. 2007. S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology* **143,** 1282–1292.

Rybel BD, Rybel B, Vassileva V, *et al*. 2010. A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Current Biology* **20,** 1697–1706.

Röckel N, Wolf S, Kost B, Rausch T, Greiner S. 2008. Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PMEI at the pollen tube tip involves PMEI endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *The Plant Journal* **53,** 133–143.

Saez-Aguayo S, Ralet MC, Berger A, Botran L, Ropartz D, Marion-Poll A, North HM. 2013. PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR6 promotes Arabidopsis mucilage release by limiting methylesterification of homogalacturonan in seed coat epidermal cells. *The Plant Cell* **25,** 308–323

Santiago-Doménech N, Jimenez-Bermudez S, Matas A, Rose J, Munoz-Blanco J, Mercado J, Quesada M. 2008. Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. *Journal of Experimental Botany* **59,** 2769–2779.

Santuari L, Scacchi E, Rodriguez-Villalon A, Salinas P, Dohmann EN, Brunoud G, Vernoux T, Smith R, Hardtke C. 2011. Positional information by differential endocytosis splits auxin response to drive Arabidopsis root meristem growth. *Current Biology* **21,** 1918–1923.

Sassi M, Lu Y, Zhang Y, *et al*. 2012. COP1 mediates the coordination of root and shoot growth by light through modulation of PIN1- and PIN2-dependent auxin transport in Arabidopsis. *Development* **139,** 3402–3412.

Sathiyaraj G, Srinivasan S, Subramanium S, Kim Y, Kim Y, Kwon W, Yang D. 2010. Polygalacturonase inhibiting protein: isolation, developmental regulation and pathogen related expression in *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Molecular Biology Reports* **37,** 3445–3454.

Sauer M, Kleine-Vehn J. 2011. AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. *The Plant Cell* **23,** 2033–2043.

Savatin DV, Ferrari S, Sicilia F, Lorenzo G. 2011. Oligogalacturonide–auxin antagonism does not require post-transcriptional gene silencing or stabilization of auxin response repressors in Arabidopsis. *Plant Physiology* **157,** 1163–1174.

Schacht T, Unger C, Pich A, Wydra K. 2011. Endo- and exopolygalacturonases of *Ralstonia solanacearum* are inhibited by polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) activity in tomato stem extracts. *Plant Physiology and Biochemistry* **49,** 377–387.

Schaller A, Stintzi A, Graff L. 2012. Subtilases—versatile tools for protein turnover, plant development, and interactions with the environment. *Physiologia Plantarum* **145,** 52–66.

Scheller HV, Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* **61,** 263–289.

Schols H, Voragen A. 1994. Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research* **256,** 83–95.

Seco R, Penuelas J, Filella I. 2007. Short-chain oxygenated VOCs: emission and uptake by plants and atmospheric sources, sinks, and concentrations. *Atmospheric Environment* **41,** 2477–2499.

Sexton TR, Henry RJ, Harwood CE, Thomas DS, McManus LJ, Raymond C, Henson M, Shepherd M. 2012. Pectin methylesterase genes influence solid wood properties of *Eucalyptus pilularis*. *Plant Physiology* **158,** 531–541.

Seyedarabi A, To TT, Ali S, Hussain S, Fries M, Madsen R, Clausen MH, Teixteira S, Brocklehurst K, Pickersgill RW. 2010. Structural insights into substrate specificity and the anti beta-elimination mechanism of pectate lyase. *Biochemistry* **49,** 539–546.

Sharma N, Rathore M, Sharma M. 2013. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **12,** 45–60.

Shen Z, Denton M, Mutti N, Pappan K, Kanost M, Reese J, Reeck G. 2003. Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. *Journal of Insect Science* **3,** 1–9.

Shen Z, Pappan K, Mutti NS, He Q-J, Denton M, Zhang Y, Kanost MR, Reese JC, Reeck GR. 2005. Pectinmethylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: cDNA isolation and sequencing, genetic origin, and expression of the recombinant enzyme. *Journal of Insect Science* **5,** 1–9.

Shevchik V, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. 1997. Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology* **24,** 1285–1301.

Shevchik EV, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. 2003. PaeX, a second pectin acetylesterase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology* **185,** 3091–3100.

Shi H, Zhu L, Zhou Y, Li G, Chen L, Li X. 2009. A cotton gene encoding a polygalacturonase inhibitor-like protein is specifically expressed in petals. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **41,** 316–324.

Shibuya N, Minami E. 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59,** 223–233.

Shishova M, Lindberg S. 2010. A new perspective on auxin perception. *Journal of Plant Physiology* **167,** 417–422.

Sicilia F, Fernandez-Recio J, Caprari C, De Lorenzo G, Tsernoglou D, Cervone F, Federici L. 2005. The polygalacturonase-inhibiting protein PGIP2 of *Phaseolus vulgaris* has evolved a mixed mode of inhibition of endopolygalacturonase PG1 of *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **139,** 1380–1388.

Siedlecka A, Wiklund S, Peronne M, Micheli F, Lesniewska J, Sethson I, Edlund U, Richard L, Sundberg B, Mellerowicz EJ. 2007. Pectin methyl esterase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood cells of Populus. *Plant Physiology* **146,** 554–565.

Sinitsyna OA, Fedorova EA, Semenova MV, Gusakov AV, Sokolova LM, Bubnova TM, Okunev ON, Chulkin AM, Vavilova EA, Vinetsky YP. 2007. Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. *Biochemistry* **72,** 565–571.

Spadoni S, Zabotina O, Di Matteo A, Mikkelsen JD, Cervone F, De Lorenzo G, Mattei B, Bellincampi D. 2006. Polygalacturonase-inhibiting protein interacts with pectin through a binding site formed by four clustered residues of arginine and lysine. *Plant Physiology* **141,** 557–564.

Srivastava S, Gupta SM, Sane AP, Nath P. 2012. Isolation and characterization of ripening related pectin methylesterase inhibitor gene from banana fruit. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **18,** 191–195.

Sun L, Van Nocker S. 2010. Analysis of promoter activity of members of the PECTATE LYASE-LIKE (PLL) gene family in cell separation in Arabidopsis. *BMC Plant Biology* **10,** 1–13.

Sun Y, Fan X, Cao D, *et al*. 2010. Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Developmental Cell* **19,** 765–777.

Swain S, Kay P, Ogawa M. 2011. Preventing unwanted breakups: using polygalacturonases to regulate cell separation. *Plant Signaling and Behavior* **6,** 93–97.

Swarup K, Benková E, Swarup R, *et al*. 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* **10,** 946–954.

Szabo LJ, Bushnell WR. 2001. Hidden robbers: the role of fungal haustoria in parasitism of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98,** 7654–7655.

Taniguchi Y, Ono A, Sawatani M, Nanba M, Kohno K, Usui M, Kurimoto M, Matuhasi T. 1995. *Cry j* I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. *Allergy* **50,** 90–93.

Tardy F, Nasser W, Robert-Baudouy J, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. 1997. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *Journal of Bacteriology* **179,** 2503–2511.

Terao A, Hyodo H, Satoh S, Iwai H. 2013. Changes in the distribution of cell wall polysaccharides in early fruit pericarp and ovule, from fruit set to early fruit development, in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Plant Research* **126,** 719–728

Themmen AP, Tucker GA, Grierson D. 1982. Degradation of isolated tomato cell walls by purified polygalacturonase *in vitro*. *Plant Physiology* **69,** 122–124.

Thibault JJ, Mercier C. 1979. *Aspergillus niger* endopolygalacturonase: 2. Characterization and some properties. *Journal of Food Biochemistry* **2,** 379–393.

Thonar C, Liners F, Van Cutsem P. 2006. Polymorphism and modulation of cell wall esterase enzyme activities in the chicory root during the growing season. *Journal of Experimental Botany* **57,** 81–89.

Tian G, Chen M, Zaltsman A, Citovsky V. 2006. Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Developmental Biology* **294,** 83–91.

Tjallingii WF, Esch TH. 1993. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology* **18,** 317–328.

Tromas A, Tromas R, Paponov I, Perrot-Rechenmann C. 2010. AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. *Trends in Plant Science* **15,** 436–446.

Turquois T, Rinaudo M, Taravel F, Heyraud A. 1999. Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. *Food Hydrocolloids* **13**. 255–262.

Tyler L, Bragg JN, Wu J, Yang X, Tuskan GA, Vogel JP. 2010. Annotation and comparative analysis of the glycoside hydrolase genes in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics* **11,** 1–21.

Uehara T, Sugiyama S, Masuta C. 2007. Comparative serial analysis of gene expression of transcript profiles of tomato roots infected with cyst nematode. *Plant Molecular Biology* **63,** 185–194.

Underwood W. 2012. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science* **3,** 85.

Vallarino JG, Osorio S. 2012. Signaling role of oligogalacturonides derived during cell wall degradation. *Plant Signaling and Behavior* **7,** 1447–1449.

Vanneste S, De Rybel B, Beemster GT, *et al*. 2005. Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **17,** 3035–3050.

Van Alebeek G, van Scherpenzeel K, Beldman G, Schols H, Voragen A. 2003. Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrates for pectin methylesterase of *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal* **372,** 211–218.

Van Brussel AAN, Bakhuizen R, van Spronsen PC, Spaink HP, Tak T, Lugtenberg BJJ, Kijne JW. 1992. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science Signaling* **257,** 70–72.

Van Pouderoyen G, Snijder H, Benen J, Dijkstra B. 2003. Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. *FEBS Letters* **554,** 462–466.

Van Santen Y, Benen J, Schröter K, Kalk K, Armand S, Visser J, Dijkstra B. 1999. 1.68-Å Crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **274,** 30474–30480.

Vercauteren I, de Almeida Engler J, De Groodt R, Gheysen G. 2002. An *Arabidopsis thaliana* pectin acetylesterase gene is upregulated in nematode feeding sites induced by root-knot and cyst nematodes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15,** 404–407.

Verlent I, Hendrickx M, Verbeyst L, van Loey A. 2007. Effect of temperature and pressure on the combined action of purified tomato pectinmethylesterase and polygalacturonase in presence of pectin. *Enzyme and Microbial Technology* **40,** 1141–1146.

Verlent I, Smout C, Duvetter T, Hendrickx ME, Van Loey A. 2005. Effect of temperature and pressure on the activity of purified tomato polygalacturonase in the presence of pectins with different patterns of methyl esterification. *Innovative Food Science amd Emerging Technologies* **6,** 293–303.

Verlent I, Van Loey A, Smout C, Duvetter T, Hendrickx ME. 2004. Purified tomato polygalacturonase activity during thermal and high-pressure treatment. *Biotechnology and Bioengineering* **86,** 63–71.

Vernoux T, Besnard F, Traas J. 2010. Auxin at the shoot apical meristem. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2,** 1–14.

Veronico P, Melillo MT, Saponaro C, Leonetti P, Picardi E, Jones JT. 2011. A polygalacturonase-inhibiting protein with a role in pea defence against the cyst nematode *Heterodera goettingiana*. *Molecular Plant Pathology* **12,** 275–287.

Videcoq P, Garnier C, Robert P, Bonnin E. 2011. Influence of calcium on pectin methylesterase behaviour in the presence of medium methylated pectins. *Carbohydrate Polymers* **86,** 1657–1664.

Vincken JP, Schols HA, Oomen RJFJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AGJ, Visser RGF. 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology* **132,** 1781–1789.

Vogel J. 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **11,** 301–307.

Vogel J, Raab T, Schiff C, Somerville S. 2002. *PMR6*, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in Arabidopsis. *The Plant Cell* **14,** 2095–2106.

Voiniciuc C, Dean GH, Griffiths JS, Kirchsteiger K, Hwang YT, Gillett A, Dow G, Western TL, Estelle M, Haughn GW. 2013. FLYING SAUCER1 is a transmembrane RING E3 ubiquitin ligase that regulates the degree of pectin methylesterification in Arabidopsis seed mucilage. *The Plant Cell* **25,** 944–959.

Volpi C, Janni M, Lionetti V, Bellincampi D, Favaron F, D'Ovidio R. 2011. The ectopic expression of a pectin methyl esterase inhibitor increases pectin methyl esterification and limits fungal diseases in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24,** 1012–1019.

Von Dahl CC, Hävecker M, Schlögl R, Baldwin IT. 2006. Caterpillar-elicited methanol emission: a new signal in plant–herbivore interactions? *The Plant Journal* **46,** 948–960.

Wang H, Guo Y, Lv F, Zhu H, Wu S, Jiang Y, Li F, Zhou B, Guo W, Zhang T. 2010. The essential role of *GhPEL* gene, encoding a pectate lyase, in cell wall loosening by depolymerization of the de-esterified pectin during fiber elongation in cotton. *Plant Molecular Biology* **72,** 397–406.

Wen B, Ström A, Tasker A, West G, Tucker GA. 2013. Effect of silencing the two major tomato fruit pectin methylesterase isoforms on cell wall pectin metabolism. *Plant Biology* **15,** 1025–1032

Whitham S, Quan S, Chang H, Cooper B, Estes B, Zhu T, Wang X, Hou Y. 2003. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets

of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal* **33,** 271–283.

Wi SG, Singh AP, Lee KH, Kim YS. 2005. The pattern of distribution of pectin, peroxidase and lignin in the middle lamella of secondary xylem fibres in alfalfa (*Medicago sativa*). *Annals of Botany* **95,** 863–868.

Wiethölter N, Graeßner B, Mierau M, Mort AJ, Moerschbacher BM. 2003. Differences in the methyl ester distribution of homogalacturonans from near-isogenic wheat lines resistant and susceptible to the wheat stem rust fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16,** 945–952.

Willats WG, Knox JP, Mikkelsen JD. 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology* **17,** 97–104.

Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* **47,** 9–27.

Williamson G. 1991. Purification and characterization of pectin acetylesterase from orange peel. *Phytochemistry* **30,** 445–449.

Wojtasik W, Kulma A, Kostyn K, Szopa J. 2011. The changes in pectin metabolism in flax infected with Fusarium. *Plant Physiology and Biochemistry* **49,** 862–872.

Wolf S, Hématy K, Höfte H. 2012*a*. Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **63,** 381–407.

Wolf S, Mouille G, Pelloux J. 2009*b*. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant* **2,** 851–860.

Wolf S, Mravec J, Greiner S, Mouille G, Höfte H. 2012*b*. Plant cell wall homeostasis is mediated by brassinosteroid feedback signaling. *Current Biology* **22,** 1732–1737.

Wolf S, Rausch T, Greiner S. 2009*a*. The N-terminal pro region mediates retention of unprocessed type-I PME in the Golgi apparatus. *The Plant Journal* **58,** 361–375.

Worden N, Park E, Drakakaki G. 2012. Trans-golgi network—an intersection of trafficking cell wall components. *Journal of Integrative Plant Biology* **54,** 875–886.

Wydra K, Beri H. 2006. Structural changes of homogalacturonan, rhamnogalacturonan I and arabinogalactan protein in xylem cell walls of tomato genotypes in reaction to *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68,** 41–50.

Wyss U, Zunke U. 1986. Observations on the behaviour of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. *Revue de Nématologie* **9,** 153–165.

Xie F, Murray JD, Kim J, Heckmann AB, Edwards A, Oldroyd GED, Downie JA. 2012. Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **109,** 633–638.

Yadav S, Yadav P, Yadav D, Yadav K. 2009. Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry* **44,** 1–10.

Yang C, Guo R, Jie F, Nettleton D, Peng J, Carr T, Yeakley J, Fan J, Whitham S. 2007. Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to *Turnip mosaic virus* infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20,** 358–370.

Yang XY, Zeng ZH, Yan JY, Fan W, Bian HW, Zhu MY, Yang JL, Zheng SJ. 2012. Association of specific pectin methylesterases with Al-induced root elongation inhibition in rice. *Physiologia Plantarum* **148,** 502–511.

Yoder M, Jurnak F. 1995. The refined three-dimensional structure of pectate lyase C from *Erwinia chrysanthemi* at 2.2 angstrom resolution (implications for an enzymatic mechanism). *Plant Physiology* **107,** 349–364.

Zhang GY, Feng J, Wu J, Wang XW. 2010. BoPMEI1, a pollen-specific pectin methylesterase inhibitor, has an essential role in pollen tube growth. *Planta* **231,** 1323–1334.

Zheng Y, Huang C, Liu W, Ko T, Xue Y, Zhou C, Guo R, Ma Y. 2012. Crystal structure and substrate-binding mode of a novel pectate lyase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **420,** 269–274.

Zonia L, Munnik T. 2011. Understanding pollen tube growth: the hydrodynamic model versus the cell wall model. *Trends in Plant Science* **16,** 347–352.

Communications scientifiques

- Articles scientifiques -

F. Sénéchal*, **C. Wattier***, C. Rustérucci, J. Pelloux (2014). **Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression and roles in plants**. *Journal of Experimental Botany* **65 (18)** : 5125-5160 (* co-first authors)

C. Wattier, A. Turbant, L. Sargos-Vallade, J. Pelloux, C. Rustérucci, A. Cherqui. **Polyphagous versus oligophagous aphids, is the plant ecotype determinant?** *Journal of Experimental Botany*. (en préparation)

- Communications affichées -

C. Wattier, A. Turbant, C. Pau-Roblot, J. Pelloux, A. Cherqui, C. Rustérucci (2013). **The impact of *Arabidopsis* ecotype on aphid feeding involves cell wall differences.** 13th Cell Wall Meeting, Nantes, France, 7-12 july

C. Wattier, F. Sénéchal, C. Pau-Roblot, J. Pelloux, A. Cherqui, C. Rustérucci (2012). **The role of AtPME17, a pectin methylesterase, in *Arabidopsis thaliana* - aphid interactions.** 23rd International Conference on *Arabidopsis* Research, Vienna, Austria, 3-7 july

C. Wattier, F. Sénéchal, I. Ismaeil, J. Pelloux, G. Prévost, A. Cherqui, C. Rustérucci (2010). **Rôle de gènes codant des protéines pariétales et de défense de la plante sur la physiologie des pucerons**. 7ème Conférence Internationale Francophone d'Entomologie, Louvain-La-Neuve, Belgique, 5-10 juillet

- Communications orales -

C. Wattier, F. Sénéchal, J. Pelloux, A. Cherqui et C. Rustérucci (2012). **Rôles de PME17, une pectine méthylestérase, dans les interactions plante/puceron**. Journée de la SFR Condorcet, Amiens, 12 juillet

C. Wattier, A. Turbant, J. Pelloux, A. Cherqui, C. Rustérucci (2011). **Rôles d'une pectine méthylestérase (PME) et d'un inhibiteur de PME dans la résistance d'*Arabidopsis* au puceron du pêcher (*Myzus persicae*)**. Réseau Français des Parois, Lille, 6-8 juin

C. Wattier, F. Sénéchal, J. Pelloux, A. Cherqui, C. Rustérucci (2010). **Effets d'un gène codant une protéine pariétale (pectine méthylestérase) dans l'interaction *Myzus persicae*/*Arabidopsis thaliana***. Réseau Français Biologie Adaptative des Pucerons, Lyon, 20-21 octobre

A. Cherqui, L. Brunissen, V. Le Roux, **C. Wattier**, S. Boquel, M. Martoub, C. Rustérucci, P. Giordanengo, A. Ameline (2010). **Biological interactions between potato plants and their aphids**. EPG Workshop, Madrid, Spain, 21-24 november

APHIDS AND PLANT CELL WALL: DIRECT OR INDIRECT INVOLVEMENT OF PECTIN METHYLESTERASES IN *ARABIDOPSIS THALIANA RESISTANCE*?

Christopher Wattier, 2013

Aphids are phloem-feeding insects that generally insert their mouthpart (stylets) through the plant cell wall layers to reach the sieve elements and uptake phloem sap. During stylets progression in the apoplasm, most cells are briefly punctured intracellularly for probing. Plant defense responses to an aphid infestation appear to be quantitatively and qualitatively different from responses to other biotic stresses. Plant acceptance by an aphid depends on the level of plant resistance established and on its ability to feed on a more or less restricted range of plants. The study of their feeding behavior, monitored using the electropenetrography technique, showed that a polyphagous aphid (*Myzus persicae*) might be more adapted to *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae family) than an oligophagous aphid specialist of this family (*Brevicoryne brassicae*), this latter being able to discriminate variations between natural ecotypes. These variations concern in particular the content of secondary metabolites that could be toxic or repellent, but also the structure of the plant cell wall.

Among the genes associated with cell wall modifications, some encoding pectin methylesterases (PMEs, EC 3.1.1.11) are induced during plant-aphid interactions. PMEs belong to a large multigenic family (66 isoforms in *A. thaliana*) and control the degree of methylesterification (DM) of the main pectic domain: the homogalacturonan (HG), an unbranched polymer of α-(1-4) linked D-galacturonic acid residues. The control of the DM of HGs determines the rheological properties of the cell wall (elasticity) and controls the accessibility of HG-degrading enzymes (polygalacturonases PGs and pectate lyases) able to change cell wall porosity and produce oligogalacturonides, endogenous defense inducers. PME activity is therefore likely to influence both the plant defense responses and the aphid probing behavior.

Using a multidisciplinary approach, we demonstrated that an aphid infestation (*M. persicae*) differently modifies cell wall structure and sugars composition of *A. thaliana* Col and WS ecotypes, activities of HG-modifying enzymes (PMEs and PGs), as well as the expression of some defense genes. The role of two pectin methylesterases (PME17 and PME3) and an inhibitor of PME (PMEI4) in *A. thaliana* - *Myzus persicae* interactions has been demonstrated using this wide range of approaches. Mutant and overexpression lines inversely affect the aphid trophic behavior (electropenetrography during 8 h) but don't affect its physiology (demographic parameters during 21 days). These effects are correlated with significant changes in term of cell wall structure and defense gene expression, underlining a pleiotropic effect specific to each PME and also of PMEI4. This work highlights the potential roles of plant cell wall and PMEs in the plant resistance against aphids and sheds new light on understanding the mechanisms of plant defense.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Aphids, Behavior, Plant cell wall, Pectin methylesterase

Université de Picardie Jules Verne • EA3900 BIOPI & FRE3498 EDYSAN • 33, rue St Leu • 80039 Amiens Cedex

PUCERONS ET PAROI VEGETALE : IMPLICATION DIRECTE OU INDIRECTE DE PECTINE METHYLESTERASES DANS LA RESISTANCE D'*ARABIDOPSIS THALIANA* ?

Christopher Wattier, 2013

Les pucerons sont des insectes phloémophages qui insèrent leur pièce buccale (stylets) au sein des parois afin d'atteindre les tubes criblés et de se nourrir de sève élaborée. Durant la progression des stylets dans l'apoplasme, un sondage est effectué par de brèves piqûres dans la plupart des cellules rencontrées. Les réponses de la plante aux dommages engendrés par une infestation aphidienne apparaissent qualitativement et quantitativement différentes des réponses à d'autres stress biotiques. Le puceron accepte plus ou moins la plante selon le niveau de résistance mis en place et selon sa capacité à se nourrir sur une gamme de plante-hôtes plus ou moins large. L'étude de leur comportement trophique *via* la technique de l'électropénétrographie montre qu'un puceron polyphage (*Myzus persicae*) semble plus adapté à *Arabidopsis thaliana* (famille des Brassicaceae) qu'un oligophage spécialiste de cette famille (*Brevicoryne brassicae*), ce dernier étant capable de discriminer des variations entre écotypes naturels. Ces variations concernent notamment la teneur en métabolites secondaires pouvant être répulsifs voire toxiques, mais aussi la structure de la paroi végétale.

Parmi les gènes associés à ces modifications structurales et aux réponses de défense de la plante à un stress aphidien, quelques pectine méthylestérases (PME, E.C. 3.1.1.11) sont induites durant les interactions plante-puceron. Les PME appartiennent à une famille multigénique (66 isoformes chez *Arabidopsis thaliana*) et contrôlent le degré de méthylestérification (DM) du principal domaine pectique : l'homogalacturonane (HG), un homopolymère constitués d'un enchaînement linéaire d'acides galacturoniques liés en α-(1-4). Le contrôle du DM des HG détermine les propriétés rhéologiques de la paroi (élasticité) et régule l'accessibilité d'enzymes dégradant les HG (polygalacturonases PG, pectate lyases) pouvant changer la porosité pariétale et produire des oligogalacturonides, éliciteurs endogènes de défense. L'activité des PME est donc susceptible d'influencer à la fois les réponses de défense de la plante et le comportement trophique du puceron.

En utilisant une approche multidisciplinaire, nous avons démontré qu'une infestation par le puceron du pêcher (*M. persicae*) modifie différemment selon l'écotype sauvage d'*A. thaliana* (WS ou Col) la structure et la composition en sucres de la paroi, l'activité d'enzymes modifiant les HG (PME, PG) mais aussi l'expression de certains gènes de défense. Le rôle de deux pectine méthylestérases (PME17 et PME3) et d'un inhibiteur de PME (PMEI4) dans l'interaction *A. thaliana* / *M. persicae* a été mis en évidence en utilisant cette diversité d'approches. Des lignées mutantes ou surexpresseur présentent des effets totalement opposés sur le comportement trophique du puceron (électropénétrographie pendant 8 h) mais n'affectent pas sa physiologie (paramètres démographiques pendant 3 semaines). Ces effets sont corrélés à d'importantes variations en terme de structure pariétale et d'expression de gènes de défense, démontrant un effet pléïotropique propre à chacune des PME, mais aussi du PMEI4. Ces travaux soulignent les rôles potentiels de la paroi végétale et des PMEs dans la résistance contre les pucerons et apportent un nouvel éclairage sur la compréhension des mécanismes de défense de la plante.

Mots-clés : *Arabidopsis thaliana*, Puceron, Comportement, Paroi végétale, Pectine méthylestérase

Université de Picardie Jules Verne • EA3900 BIOPI & FRE3498 EDYSAN • 33, rue St Leu • 80039 Amiens Cedex