



**HAL**  
open science

# Rôle des extensines et leur glycosylation dans la défense racinaire

Romain Castilleux

► **To cite this version:**

Romain Castilleux. Rôle des extensines et leur glycosylation dans la défense racinaire. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Rouen Normandie, 2017. Français. NNT: . tel-02302069

**HAL Id: tel-02302069**

**<https://normandie-univ.hal.science/tel-02302069>**

Submitted on 1 Oct 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

## THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

### Rôle des extensines et leur glycosylation dans la défense racinaire

Présentée et soutenue par  
**Romain CASTILLEUX**

Thèse soutenue publiquement le 21 décembre 2017  
devant le jury composé de

Mme Sílvia COIMBRA	Professeur, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal	Rapporteur
M Christophe DUNAND	Professeur, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV), UMR 5546-UPS/CNRS, Université Paul Sabatier, Toulouse	Rapporteur
Mme Agnès ATTARD	Chargé de recherche, UMR Institut Sophia Agrobiotech – INRA 1355-CNRS 7254-UNSA, Sophia-Antipolis	Examineur
M Eric NGUEMA-ONA	Chef de projet, Centre Mondial de l'Innovation, Groupe Roullier, Saint Malo	Examineur
Mme Maïté VICRE	Maître de conférences, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV), EA4358, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M Azeddine DRIOUICH	Professeur, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV), EA4358, Université de Rouen Normandie	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Maïté VICRE et Azeddine DRIOUICH, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV), EA4358, Université de Rouen Normandie









Normandie Université

## THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

### Rôle des extensines et leur glycosylation dans la défense racinaire

Présentée et soutenue par  
**Romain CASTILLEUX**

Thèse soutenue publiquement le 21 décembre 2017  
devant le jury composé de

Mme Sílvia COIMBRA	Professeur, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal	Rapporteur
M Christophe DUNAND	Professeur, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV), UMR 5546-UPS/CNRS, Université Paul Sabatier, Toulouse	Rapporteur
Mme Agnès ATTARD	Chargé de recherche, UMR Institut Sophia Agrobiotech – INRA 1355-CNRS 7254-UNSA, Sophia-Antipolis	Examineur
M Eric NGUEMA-ONA	Chef de projet, Centre Mondial de l'Innovation, Groupe Roullier, Saint Malo	Examineur
Mme Maïté VICRE	Maître de conférences, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV), EA4358, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M Azeddine DRIOUICH	Professeur, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV), EA4358, Université de Rouen Normandie	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Maïté VICRE et Azeddine DRIOUICH, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV), EA4358, Université de Rouen Normandie



FED 4277  
Normandie-Végétal





## Remerciements

Merci à Sílvia Coimbra, Professeur de l'université de Porto, pour avoir accepté d'être membre de mon jury et de rapporter sur ma thèse.

Merci à Christophe Dunand, Professeur au Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV, UMR 5546-UPS/CNRS) de Toulouse, pour avoir accepté d'être rapporteur sur ma thèse. Je vous remercie également, ainsi que Philippe Ranocha, pour votre collaboration et votre expertise sur le projet « peroxydases ».

Merci à Agnès Attard, Chargée de recherche à l'institut Sophia Agrobiotech (INRA 1355-CNRS 7254) de Sophia Antipolis, pour avoir acceptée d'être examinatrice. Je vous remercie également pour votre collaboration sur le projet, pour m'avoir fait partager votre expertise sur *Phytophthora parasitica* et pour m'avoir si bien accueilli lors de mon séjour à Sophia Antipolis.

Merci à Eric Nguema-Ona, Chef de projet au sein du groupe CMI-Roullier, d'avoir accepté d'être examinateur. Je te remercie également pour ton implication, tes conseils et ton suivi du projet.

Merci à Azeddine Driouich et à Maïté Vicré, respectivement Professeur et Maître de conférences au laboratoire GlycoMEV (EA 4358) de Rouen, pour m'avoir accepté en thèse et encadré pendant ces trois années pendant lesquelles j'ai le sentiment d'avoir extrêmement progressé. Merci Azeddine pour la confiance que vous m'avez accordée, votre implication, votre investissement, votre disponibilité, vos conseils très précieux et pour les discussions scientifiques enrichissantes. Je vous remercie également de m'avoir mis en contact avec Zoë Popper il y a 7 ans, ce qui m'a permis d'effectuer un stage qui a été fondateur pour moi. Merci Maïté pour ta patience, tes conseils et pour m'avoir poussé à valoriser mes résultats, notamment lors du congrès du Réseau Français de la Paroi (RFP) à Orléans qui fût une très bonne expérience.

Merci au groupe CMI-Roullier et à la Région Normandie pour avoir financé et soutenu ce projet de thèse à travers la Structure Fédérative de Recherche « Normandie Végétal » (FED 4277).



## Remerciements

Merci à Jean-Claude Yvin et Mustapha Arkoun, respectivement Directeur Recherche et Développement et Chef de projet au sein du groupe CMI-Roullier à St Malo, pour votre soutien, votre suivi du projet et vos conseils avisés.

Merci à Barbara Plancot, Post-Doc au laboratoire GlycoMEV (EA 4358) de Rouen, pour son implication dans le projet, ses conseils, ses trucs et astuces et sa bonne humeur.

Merci à Bruno Gügi, Maître de conférences au laboratoire GlycoMEV (EA 4358) de Rouen, pour son implication dans le projet, son investissement, son expertise en GC, son aide récurrente et ses discussions scientifiques et non-scientifiques. Je te remercie également pour ta contribution quotidienne, bien qu'inégale, à l'humour (oui, il y a certainement une histoire d'hôpital et de charité là-dedans).

Merci à Corinne Loutelier-Bourhis, Maître de conférences au laboratoire IRCOF COBRA (UMR6014 et FR3038, CNRS) de Rouen, pour son aide précieuse dans l'analyse et l'exploitation des résultats en GC-MS, ainsi que pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Merci à la plateforme PRIMACEN pour la mise à disposition des équipements de biologie moléculaire et surtout de microscopie confocale qui m'ont beaucoup servi. Je remercie particulièrement Ludovic Galas, Damien Schapman et Alexis Lebon pour leur disponibilité et leurs conseils.

Merci à Jérôme Leprince et Benjamin Lefranc, respectivement Chargé de recherche et Ingénieur d'étude au laboratoire DC2N (Inserm U982) de Rouen, pour avoir synthétisé et fourni la flagelline 22.

Merci aux différents stagiaires ayant, de près ou de loin, travaillé et contribué sur ce projet. Je remercie spécialement Marc Ropitiaux, Marie Chambard et Angèle Tocqueville, respectivement en thèse pour les deux premiers et technicienne pour cette dernière au sein du laboratoire GlycoMEV (EA 4358) de Rouen.

Merci à l'Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EdNBISE) pour son suivi et les formations extrêmement intéressantes qui ont été proposées. Cela m'a été très utile pendant la thèse et je suis certain que cela m'aidera encore après.

Merci à Patrice Lerouge, Professeur et Directeur du laboratoire GlycoMEV (EA 4358) de Rouen, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Si j'ai choisi cette Licence et ce Master, c'est un peu à cause de vous et vos cours de biochimie.

Merci à Jean-Claude Mollet et Arnaud Lehner, respectivement Professeur et Maître de conférences au laboratoire GlycoMEV (EA 4358) de Rouen, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet de 6 mois au laboratoire et pour le compte du groupe CMI-Roullier. Sans cela, il n'est pas certain que j'aurais eu la chance de réaliser ce projet de thèse.

Many thanks to my former supervisors Totte Niittylä, Principal Investigator at the Umeå Plant Science Centre (UPSC, Sweden) and José-María Romero, Principal Investigator at the Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF) in Sevilla (Spain), for welcoming me within your laboratory for my Master internship. It was an amazing experience and I learnt a lot.

Special thanks to Zoë Popper, Principal Investigator at the National University of Ireland in Galway (Ireland), for welcoming me within your laboratory for a summer internship. I learnt so much working with you. This internship was the beginning of everything and made me want to go to Research and the PhD. Thank you so much.

Merci à Isabelle Boulogne, Maître de conférences au laboratoire GlycoMEV (EA 4358) de Rouen, pour son implication, son aide, son dynamisme, ses conseils avisés, sa gentillesse et sa disponibilité. Cela a été un vrai plaisir de travailler avec toi.

Merci à Sophie, Gaëlle, Carole Plasson et Carole Burel pour leur aide et leurs conseils au quotidien. Merci à Gérald pour son soutien précieux dans les petites tracasseries administratives et ton attention (bon courage pour ton nouveau poste!). Merci à Marie-Laure pour ses conseils et sa gentillesse, à Yasmina et Charlène pour leur sourire et leurs conseils, à Muriel pour sa bonne humeur et son dynamisme contagieux, à Marie-Christine pour son aide en BM, à Alain, Estelle, Laurence pour leur gentillesse.

Je ne vais pas citer tout le monde (ça doit déjà être presque fait) car les remerciements sont déjà longs et je ne veux pas prendre le risque d'oublier quelqu'un. Alors merci à tous les membres du laboratoire GlycoMEV pour leur bonne humeur et leur énorme gentillesse. C'était un vrai plaisir de travailler avec vous, dans un environnement aussi agréable, presque

## Remerciements

familial. J'espère avoir la chance de retrouver une ambiance aussi bonne et conviviale dans ma vie professionnelle. Un grand merci pour tout.

Je ne pouvais pas faire ses remerciements sans parler des doctorants/post-docs du laboratoire. Que de moments inoubliables passés avec vous, ce fût une merveilleuse aventure ponctuée de magnifiques rencontres. Je ne m'attendais pas à croiser un champagnol, déjà c'était statistiquement improbable. J'ai aussi été surpris de croiser une abeille se massant le pectoral, un perroquet chantant des chansons paillardes, Bambi se recueillant avec un cerf et une mouche dans un cimetière de poissons, une pile électrique vivante et même l'Elue. Sans oublier cet homme protéine amoureux des avions et d'Al Bundy, cette petite dame qui vit dans une douche, cette cycliste vendeuse de Pesto à la pistache, cet agent secret canadien au service du grand Ricky Budô ou encore ce redoutable dragon Gérard Padgou. J'ai même découvert le chocolat en poudre Milka ! J'ai aussi pu revoir une brayonne amatrice de thé qui m'avait suivi depuis tout petit (ou l'inverse). Je n'aurais jamais cru non plus voir tant de rose, trop de rose. Et que dire de cette voix sensuyelle expliquant en détail la vie aux gens ou de ces anecdotes intéressantes sur le Nesquik et son bel homme joyeux drille aux mille déguisements. Sans oublier la légendaire GlycoMEV Team of Basketball, toujours invaincue, avec un survivant dont la sagesse et le calme sont jordanesques (mais qui doit encore travailler son bras roulé !!!) et un joueur décisif qui nous a offert cet unique succès tellement exceptionnel. Un grand merci pour tous ces moments magiques, pleins de poésie (pensée à la Nouvelle-Guinée), empreints de subtilité (le maître mot) et qui ne m'ont jamais mis mal à l'aise. Et Awawiwawo !

Une petite dédicace à celle dont l'esprit est pur et dont le corps est un temple. Merci pour ta sagesse et pour l'hibiscus. C'est super bon l'hibiscus !

Enfin, j'aimerais remercier mes amis, mes proches et ma famille qui me supportent pendant toutes ces années, et ce n'est pas une mince affaire ! Merci pour votre soutien, votre gentillesse, votre humour (parce que l'humour c'est drôle des fois !) et votre présence en toute circonstance. Vous avez toujours été là pour moi. Merci pour tout.





# Préambule

Les plantes font constamment face à des agressions d'agents pathogènes (bactéries, champignons, oomycètes...) pouvant provoquer des pathologies graves et entraîner des pertes agricoles importantes. Dans l'optique du plan Ecophyto visant à réduire l'usage de produits phytosanitaires chimiques polluants, nocifs et parfois inefficaces, de nouvelles méthodes de lutte contre les pathogènes doivent être développées (Lechenet *et al.*, 2017). Une meilleure connaissance des interactions plante/microorganisme, notamment au niveau de la paroi cellulaire végétale, apparaît donc nécessaire.

Les extensines sont des glycoprotéines de la paroi impliquées dans une grande diversité de processus essentiels et notamment la protection de la plante (Merkouropoulos & Shirsat, 2003; Deepak *et al.*, 2010; Sujkowska-Rybkowska & Borucki, 2014; Zhang *et al.*, 2016). **Ce rôle dans la défense sera présenté dans la seconde partie de l'introduction sous la forme d'une revue qui est en préparation pour être soumise au journal « Journal of Experimental Botany ».** Toutefois, la manière dont les extensines contribuent à la réponse immunitaire végétale n'est pas encore bien connue et reste à élucider. Il est en effet généralement admis que celles-ci permettent un renforcement de la paroi en se liant entre elles de manière intra- et inter-moléculaire : le « cross-linking ». Dans ce projet de thèse, nous avons entrepris d'étudier l'impact de la glycosylation des extensines ainsi que les peroxydases, deux acteurs permettant ce « cross-linking ». Nous avons ainsi pu établir pour la première fois un lien entre la glycosylation des extensines et la défense racinaire de la plante. **Ces résultats seront présentés dans le premier chapitre de résultats sous la forme d'un article scientifique qui a été soumis au journal « Plant Physiology ».** Nous avons par ailleurs essayé de mettre en évidence les peroxydases spécifiques responsables du cross-linking des extensines chez *Arabidopsis thaliana*. Ces travaux préliminaires réalisés en collaboration avec le Pr. Christophe Dunand et le Dr. Philippe Ranocha du Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV, UMR 5546-UPS/CNRS) de Toulouse font l'objet du deuxième chapitre de résultats. De tous ces travaux découle l'idée que les extensines n'agissent pas seules dans la défense racinaire mais pourraient interagir avec d'autres composés de la paroi tels que les pectines ou les ArabinoGalactanes Protéines (AGPs). Etudier cette potentielle synergie pourrait être particulièrement intéressant à l'avenir d'autant que notre laboratoire dispose déjà d'une

certaine expertise et d'outils performants pour l'analyse des pectines et des AGPs (Nguema-Ona *et al.*, 2007, 2012; Cannesan *et al.*, 2012; Koroney *et al.*, 2016). **A ce titre, nous avons d'ailleurs récemment soumis un chapitre de livre qui sera publié prochainement (Castilleux *et al.*, accepté) et décrivant différents protocoles de localisation, d'extraction et de caractérisation des AGPs.** Ce chapitre sera présenté en annexe.

Un autre volet de ma thèse s'intéressant en particulier à une plante d'intérêt agronomique, le soja, n'est pas présenté dans ce manuscrit pour des raisons de confidentialité. J'ai ainsi réalisé des analyses biochimiques dans le cadre d'un projet porté par le groupe industriel CMI-Roullier (CMI : Centre Mondial de l'Innovation) en collaboration avec le laboratoire (sous la responsabilité du Pr. Azeddine Driouich et du Dr. Maïté Vicré) visant à étudier la nutrition azotée. Les résultats préliminaires obtenus, encore confidentiels, ont été suffisamment encourageants pour que des suites à ce projet soient envisagées entre le laboratoire et le groupe CMI-Roullier. J'ai également participé à la caractérisation de la racine du soja, et plus particulièrement à l'ensemble regroupant les cellules bordantes et le mucilage permettant de protéger la racine et que l'on appelle le RET (Root Extracellular Trap) (Driouich *et al.*, 2013). Ces travaux sont en lien avec un volet de la thèse de Marc Ropitiaux, dirigée par le Pr. Azeddine Driouich, le Dr. Sophie Bernard et le Dr. Isabelle Boulogne au sein de notre laboratoire, et seront bientôt soumis à publication dans un journal scientifique.

Au cours de ces trois années, j'ai eu la chance de pouvoir contribuer à d'autres projets plus ou moins liés à ma thèse mais qui n'ont pas pu être valorisés dans ce manuscrit pour des raisons là aussi stratégiques et de confidentialité. Ces projets font l'objet de collaborations établies par le Dr. Maïté Vicré et le Pr. Azeddine Driouich avec des partenaires académiques internationaux. J'ai ainsi collaboré avec le Dr. Przemyslaw Ociepa de l'université de Southampton (Royaume-Uni) en effectuant des observations au microscope confocal dans le cadre de son projet s'intéressant au rôle des pectines méthyl-estérases dans le développement racinaire d'*Arabidopsis thaliana*. Une autre collaboration a été mise en place avec le Dr. Wynston Woodenberg de l'université du KwaZulu-Natal (Afrique du Sud) afin de réaliser des extractions et des analyses pariétales d'embryons de graines de Cycadales : *Encephalartos natalensis*. Ce fut en même temps l'occasion de partager notre savoir-faire. Cette coopération, impliquant également le Dr. Bruno Gügi, maître de conférences en charge des analyses de la paroi par chromatographie en phase gazeuse, ainsi qu'Angèle Tocqueville

alors en stage et depuis devenue technicienne au laboratoire, devrait déboucher sur une publication scientifique. Enfin, avec Julie Despres, doctorante au laboratoire travaillant sous la direction du Dr. Marie-Laure Follet-Gueye et du Pr. Azeddine Driouich, nous avons élaboré un manuel d'utilisation d'ImageJ, GIMP et autres logiciels de traitement d'image pouvant servir dans l'analyse et la valorisation de résultats. Ce tutoriel a été mis à disposition de la communauté et est présenté ici en annexe, à la fin de ce manuscrit.





Romain CASTILLEUX  
 4 rue Adrien Pasquier  
 76000 Rouen  
 06.08.60.65.53  
 romain.castilleux@gmail.com

## Curriculum Vitae

28 ans  
 Permis B  
 Anglais courant  
 Espagnol opérationnel

### PARCOURS UNIVERSITAIRE

- Formation actuelle depuis octobre 2014

#### Doctorat en biologie végétale

« Rôle des extensines et leur glycosylation dans la défense racinaire »  
 Laboratoire GlycoMEV (EA 4358), Université de Rouen Normandie  
 Cofinancement par la Région Normandie et le groupe CMI-Roullier



- 2011 - 2013

**Master en Sciences Végétales**, Université de Rouen



- 2008-2011

**Licence de Biochimie et Biologie Moléculaire**, Université de Rouen



### EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES

- Avr – Sep 2014

#### Chargé de recherche

« Effet d'extraits naturels sur l'induction des mécanismes de défense chez la tomate et *Arabidopsis thaliana* »  
 Laboratoire GlycoMEV EA 4358, Collaboration avec le groupe Roullier



- Fév - Juin 2013

#### Stage Master 2

« Caractérisation de l'Invertase Neutre chez le Peuplier »  
 Umeå Plant Science Centre (UPSC), Umeå (Suède)



- Fév - Juin 2012

#### Stage Master 1

« Etude de la Sucrose Phosphate Synthase/Phosphatase chez *Arabidopsis thaliana* »  
 Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF), Séville



- Juil – Sep 2011

#### Stage Volontaire

« Impact du CO<sub>2</sub> et de la température sur la paroi cellulaire d'une algue verte : *Chara sp.* »  
 Botany and Plant Science, NUI Galway (Irlande)



## PUBLICATIONS

**Castilleux R**, Ropitiaux M, Manasfi Y, Bernard S, Vicré-Gibouin M and Driouich A. (Accepted) **Contributions to arabinogalactan proteins analysis**. In: Popper ZA, ed. *The Plant Cell Wall. Methods in Molecular Biology*. New York: Springer Press.

**Castilleux R**, Plancot B, Gügi B, Attard A, Loutelier-Bourhis C, Lefranc B, Nguema-Ona E, Arkoun M, Yvin JC, Driouich A and Vicré M (Soumis) **Extensin arabinosylation involvement in root response to elicitor and pathogenic oomycetes**.

**Castilleux R**, Plancot B, Ropitiaux M, Carreras A, Leprince J, Boulogne I, Follet-Gueye ML, Popper ZA, Driouich A and Vicré M (En préparation) **Root defence: how important are cell wall extensins?**

## COMMUNICATIONS ORALES

Driouich A, **Castilleux R**, Ropitiaux M, Bernard S, Boulogne I, Follet-Gueye ML and Vicré M. **The root anti-microbial compounds as protectants for stored products**. *11<sup>th</sup> Conference of the IOBC/WPRS*, Ljubljana, 3<sup>rd</sup>-5<sup>th</sup> July 2017.

**Castilleux R**, Plancot B, Attard A, Lefranc B, Leprince J, Arkoun M, Nguema-Ona E, Yvin JC, Driouich A and Vicré-Gibouin M. **Involvement of extensin arabinosylation in root defence**. *11<sup>e</sup> journées du Réseau Français des Parois (RFP)*, Orléans, 27<sup>th</sup>-29<sup>th</sup> June 2017

**Castilleux R**, Plancot B, Attard A, Leprince J, Arkoun M, Nguema-Ona E, Yvin JC, Driouich A and Vicré-Gibouin M. **Role of extensin arabinosylation in root-microbe interaction**. *20<sup>e</sup> journées de l'Ecole Doctorale de l'EdNBISE*, Le Havre, 16<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> March 2017.

Ropitiaux M, **Castilleux R**, Bernard S, Lucas G, Boulogne I, Arkoun M, Yvin JC, Follet-Gueye ML, Vicré-Gibouin M and Driouich A. **The Root Extracellular Trap: a network at the heart of root defense**. *20<sup>e</sup> journées de l'Ecole Doctorale de l'EdNBISE*, Le Havre, 16<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> March 2017.

Driouich A, Ropitiaux M, **Castilleux R**, Follet-Gueye ML and Vicré-Gibouin M. **Root defense, role of the root extracellular matrix**. *XIV Cell Wall Meeting*, Chania, 12<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> June 2016.

Ropitiaux M, **Castilleux R**, Bernard S, Lucas G, Follet-Gueye ML, Vicré-Gibouin M and Driouich A. **The Root Extracellular Trap: a network at the heart of root defense**. *8<sup>e</sup> journée scientifique du GRR VASI*, Mont-Saint-Aignan, 20<sup>th</sup> May 2016.

Vicré-Gibouin M, Koroney AS, Plancot B, **Castilleux R**, Ropitiaux M, Plasson C, Follet-Gueye ML and Driouich A. **A la frontière sol-racines : les Border-Like-Cells fêtent leurs 10 ans**. *7<sup>e</sup> journée scientifique du GRR VASI*, Val-de-Reuil, 22<sup>nd</sup> May 2015.

## COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

**Castilleux R**, Plancot B, Attard A, Lefranc B, Leprince J, Arkoun M, Nguema-Ona E, Yvin JC, Driouich A and Vicré-Gibouin M. **Cell wall extensins: role in root-microbe interaction. 1<sup>e</sup> journée de la SFR Normandie Végétal**, Mont Saint Aignan, 11th July 2017

**Ropitiaux M**, **Castilleux R**, Bernard S, Lucas-Durambur G, Boulogne I, Arkoun M, Yvin JV, Follet-Gueye ML, Vicré M and Driouich A. **Cell Immunity : Plant versus Mammals, are RET and NET alike? 1<sup>e</sup> journée de la SFR Normandie Végétal**, Mont Saint Aignan, 11th July 2017

**Ociepa P**, Hocq L, **Castilleux R**, Koroney A, Vicré-Gibouin M, Driouich A, Pelloux J, Lerouge P and Marchant A. **Investigating the role of PME activity modulation in regulating root development in Arabidopsis. Plant Cell Wall Gordon Conference and Seminar**, Boston, 12<sup>th</sup>- 17<sup>th</sup> July 2015.

**Albi T**, **Castilleux R**, Ruiz MT and Romero JM. **Enzimas implicadas en la síntesis de sacarosa en plantas: caracterización bioquímica de las distintas isoformas de sacarosa fosfato fosfatasa de Arabidopsis thaliana. XI Reunión de Biología Molecular de Plantas**, Segovia 14<sup>th</sup>-16<sup>th</sup> June 2012.

**Castilleux R** and **Popper Z**. **Chara cell walls: biodiversity and biochemical characterization. Irish Plant Scientists Association Meeting**, Dublin 3<sup>rd</sup>-5<sup>th</sup> April 2012.

## FORMATIONS SUIVIES

### EDNBISE:

- ✓ Maîtriser sa communication professionnelle auprès des acteurs du monde socio-économique
- ✓ Monter et mener un projet de recherche
- ✓ Développer son réseau professionnel
- ✓ Initiation à la lecture rapide
- ✓ Aide à la rédaction de thèse
- ✓ Animer et conduire une réunion
- ✓ Mener sa thèse comme un projet
- ✓ Manager l'innovation dans les organisations
- ✓ Biostatistiques
- ✓ Prévention et secours civiques Niveau 1

### Université de Rouen – Normandie

- ✓ Conduite d'autoclaves

### Plateforme PRIMACEN (label IBISA):

- ✓ Microscope confocal inversé (Leica sp2)
- ✓ q-PCR (ABI PRISM 7500)



# Sommaire

Remerciements .....	3
Préambule .....	9
<i>Curriculum Vitae</i> .....	13
Liste des Figures .....	20
Liste des Tableaux .....	23
Liste des Abréviations .....	24
1 Introduction générale .....	29
1.1 La défense des plantes .....	29
1.2 Spécificité de la défense des racines .....	33
1.3 Interaction <i>Phytophthora parasitica</i> – racine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	36
1.4 La paroi cellulaire végétale: premier rempart cellulaire contre les pathogènes .....	38
1.4.1 Les Pectines .....	38
1.4.2 Les ArabinoGalactane Protéines .....	40
1.4.3 Les Extensines.....	42
1.5 Article 1: Root defence: how important are cell wall extensins? .....	47
1.6 Objectifs de thèse .....	85
2 Matériel et Méthodes .....	91
2.1 Matériel végétal.....	91
2.2 Culture d' <i>Arabidopsis thaliana in vitro</i> .....	92
2.2.1 Stérilisation des graines .....	92
2.2.2 Préparation du milieu de culture .....	92
2.2.3 Semis des graines in vitro .....	93
2.3 Phénotypage racinaire d' <i>A. thaliana</i> .....	93
2.3.1 Mesure de la longueur racinaire .....	93
2.3.2 Observation des cellules apparentées aux cellules bordantes (BLCs) .....	93
2.3.3 Mise en évidence du mucilage .....	93
2.4 Elicitation et traitement des racines .....	94
2.4.1 Elicitation avec la flagelline 22 .....	94
2.4.2 Traitement des racines avec des anticorps monoclonaux anti-extensines .....	94
2.5 Immunolocalisation d'épitopes associés aux extensines et aux pectines .....	95

2.6	<i>Phytophthora parasitica</i> .....	96
2.6.1	Souches de <i>Phytophthora parasitica</i> .....	96
2.6.2	Préparation du milieu de culture .....	96
2.6.3	Repiquage en milieu solide .....	97
2.6.4	Repiquage en milieu liquide .....	97
2.6.5	Production de zoospores.....	97
2.6.6	Inoculation de racines d' <i>A. thaliana</i> avec des zoospores de <i>P. parasitica</i> .....	98
2.7	Extraction des Résidus Insolubles dans l'Alcool (AIR) .....	98
2.8	Analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) .....	99
2.8.1	Dérivation des échantillons.....	99
2.8.2	Analyse en GC-FID .....	99
2.9	Analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).....	100
2.9.1	Dérivation des échantillons.....	100
2.9.2	Analyse en GC-MS .....	101
2.10	Analyses statistiques .....	102
3	Résultats.....	107
3.1	Article 2: Extensin arabinosylation involvement in root response to elicitors and pathogenic oomycetes. ....	107
3.2	Caractérisation préliminaire de mutants affectés dans la production de peroxydases.....	167
3.2.1	Introduction.....	167
3.2.2	Résultats .....	169
3.2.3	Conclusion .....	177
4	Discussion générale et perspectives .....	183
5	Références bibliographiques .....	195
	Annexes .....	209
	Annexe 1 : Article 3 : Contributions to arabinogalactan proteins analysis .....	209
	Annexe 2: Manuel d'utilisation d'ImageJ, GIMP et autres logiciels de traitement d'image.....	231
	Annexe 3 : Poster présenté à la 1 <sup>e</sup> journée de la SFR « Normandie Végétal », Cell Wall extensins: role in root-microbe interaction .....	275





## Liste des Figures

Figure 1 : Schéma représentant la PAMP-Triggered Immunity (PTI).....	30
Figure 2 : Schéma représentant la reconnaissance de la flagelline 22 par le récepteur FLS2 engendrant une réponse immunitaire chez la plante.....	30
Figure 3 : Schéma représentant la PTI et l'Effector-Triggered Immunity (ETI) chez les plantes. ....	32
Figure 4 : Modèle en zig-zag proposé par Jones & Dangl (2006).....	33
Figure 5 : Niveau d'expression de PR1 chez des racines et des feuilles de maïs infectées par <i>Colletotrichum graminicola</i> . ....	34
Figure 6 : Modèle du Root Extracellular Trap (RET) proposé par Driouich <i>et al.</i> (2013). ....	36
Figure 7 : Cycle de vie de <i>Phytophthora parasitica</i> .....	37
Figure 8 : Structure des différentes pectines.....	39
Figure 9 : Structure des AGPs.....	41
Figure 10 : Schéma du cross-linking des extensines via les résidus tyrosines. ....	42
Figure 11 : Schéma de la glycosylation des extensines.....	44
Figure 12 : Protocole du fournisseur pour l'utilisation des tubes pour ultrafiltration Amicon® Ultra 0.5 (Millipore®).....	95
Figure 13 : Longueur des racines de « mutants peroxydases » de la première série après 7 jours de culture. ....	169
Figure 14 : Longueur des racines de « mutants peroxydases » de la seconde série après 7 jours de culture. ....	170
Figure 15 : Longueur des racines de « mutants peroxydases » de la troisième série après 7 jours de culture. ....	171
Figure 16 : Cellules apparentées aux cellules bordantes (BLC) chez les « mutants peroxydases » de la seconde et la troisième série après 7 jours de culture. ....	172
Figure 17 : Coloration négative à l'encre de Chine du mucilage au niveau de la pointe racinaire chez les « mutants peroxydases » de la seconde série après 7 jours de culture. ..	173

Figure 18 : Accumulation des zoospores de *Phytophthora parasitica* (souche 310) chez les « mutants peroxydases » de la première série après 3 heures d'inoculation..... 174

Figure 19 : Accumulation des zoospores de *Phytophthora parasitica* (souche 310) chez les « mutants peroxydases » de la troisième série après 3 heures d'inoculation. .... 175

Figure 20 : Immunomarquages avec l'anticorps anti-extensine LM1 sur la pointe racinaire de plantules sauvages d'*Arabidopsis thaliana* et du double mutant *p33*\**p34*. .... 177

Figure 21 : Modèle illustrant l'impact de l'arabinosylation sur l'organisation de la paroi et les sécrétions racinaires..... 184

Figure 22 : Modèle illustrant l'impact de l'arabinosylation des extensines sur la colonisation de la racine d'*Arabidopsis thaliana* par l'oomycète *Phytophthora parasitica*. .... 187



## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Liste des mutants affectés dans la glycosylation des extensines et utilisés dans ce projet. ....	91
Tableau 2 : Liste des mutants « peroxydases » utilisés dans ce projet. ....	92
Tableau 3 : Liste des mutants « peroxydases » utilisés dans la présente étude. ....	168

## Liste des Abréviations

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**AGP** : ArabinoGalactane Protéine

**AGPE** : ArabinoGalactane Protéine-Extensine

**AIR** : Alcohol Insoluble residues

**ARN** ou **RNA** : Acide RiboNucléique

**BAK1** : Brassinosteroid-insensitive 1-Associated Receptor Kinase 1

**BC** : Border Cell

**BLC** : Border-Like Cell

**DAMP** : Damage-Associated Molecular Pattern

**DMSO** : DiMéthylSulfOxyde

**ETI** : Effector-Trigged Immunity

**ETS** : Effector-Trigged Susceptibility

**ExAD** : Extensin Arabinose Deficient transferase

**FITC** : Fluorescéine IsoThioCyanate

**Flg22** : Flagelline 22

**FLS2** : FLagellin Sending 2

**GC-FID** : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à un Détecteur à Ionisation de Flamme

**GC-MS** : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse

**GPI** : GlycosylPhosphatidylInositol

**HPAT1-3** : HydroxyProline ArabinosylTransferases 1 à 3

**HRGP** : Hydroxyproline-Rich GlycoProteins

**MAMP** : Microbe-Associated Molecular Pattern

**NAMP** : Nematode-Associated Molecular Pattern

**NASC** : Nottingham Arabidopsis Stock Centre

**NET** : Neutrophil Extracellular Trap

**P4H** : Prolyl-4-Hydroxylase

**PAMP** : Pathogen-Associated Molecular Pattern

**PBS** : Phosphate-Buffered Saline

**PBST** : Phosphate-Buffered Saline with Tween 20

**PR** : Pathogenesis Related

**PRP** : hydroxyproline/Proline-Rich Proteins

**PRR** : Pattern Recognition Receptor

**PTI** : PAMP-Triggered Immunity

**RE** ou **ER** : Réticulum Endoplasmique

**RET** : Root Extracellular Trap

**RG-I** : RhamnoGalacturonane de type I

**RG-II** : RhamnoGalacturonane de type II

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**RRA1-3** : Reduced Residual Arabinose 1 à 3

**SGT1** : Serine-GalactosylTransferase 1

**XEG113** : XyloEndoGlucanase 113





# Introduction générale





# 1 Introduction générale

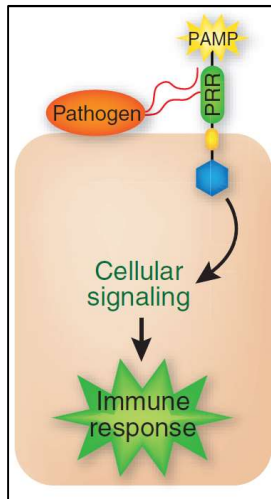
## 1.1 La défense des plantes

Les plantes font continuellement l'objet d'agressions d'agents pathogènes (bactéries, champignons, oomycètes...) occasionnant des maladies et engendrant des pertes agricoles considérables. Pour faire face à ces attaques, les plantes ont développé un certain nombre de mécanismes de défense leur permettant d'assurer leur protection. En effet, les cellules végétales présentent la particularité d'être entourée par une barrière physico-chimique de structure complexe, la paroi cellulaire. Cette paroi dont la composition et le mode d'action seront détaillés par la suite, permet ainsi d'empêcher la pénétration du pathogène ou tout du moins réduire et ralentir sa progression. Cela s'opère par une rigidification de la paroi avec notamment le dépôt de molécules de callose ou de lignine mais aussi l'intervention d'autres molécules pariétales telles que les extensines.

La plupart du temps, la présence d'un pathogène, et plus généralement d'un micro-organisme, va être repérée grâce à des signaux particuliers détectés par la plante. Ces signaux peuvent être des molécules issues d'un pathogène et sont alors appelées des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) (Boller & Felix, 2009; Choi & Klessig, 2016; Yu *et al.*, 2017). Elles peuvent aussi provenir d'un micro-organisme au sens large qu'il soit bénéfique, pathogène ou neutre, auquel cas elles sont définies en tant que MAMPs (Microbe-Associated Molecular Pattern) (Boller & Felix, 2009; Millet *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2017). Ces molécules peuvent également résulter de la dégradation de la paroi de la plante elle-même et sont par conséquent considérées comme des DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern) (Boller & Felix, 2009; Souza *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017). Enfin, certaines molécules décrites plus récemment ont pour origine les nématodes et sont dénommées NAMPs (Nematode-Associated Molecular Pattern) (Manosalva *et al.*, 2015; Choi & Klessig, 2016).

Ces MAMPs, PAMPs, NAMPs ou DAMPs peuvent être de nature très diverse et émaner aussi bien de structures entourant la cellule comme le peptidoglycane, la chitine, les lipopolysaccharides ou des fragments de pectines que de produits de sécrétion comme des antibiotiques, des antifongiques, de l'ADN, des métabolites, des sidérophores, des biosurfactants ou des composés volatiles organiques (Boller & Felix, 2009; Lanoue *et al.*, 2010;

Millet *et al.*, 2010; Beauregard *et al.*, 2013; Choi & Klessig, 2016; Kong *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017). Ces composés sont reconnus par la cellule végétale via des récepteurs spécifiques nommés PRRs (Pattern Recognition Receptor) et vont avoir un effet éliciteur engendrant une réponse immunitaire rapide et efficace : la PTI (PAMP-Triggered Immunity) (Pieterse *et al.*, 2009; Katagiri & Tsuda, 2010; Yu *et al.*, 2017) (**Figure 1**).



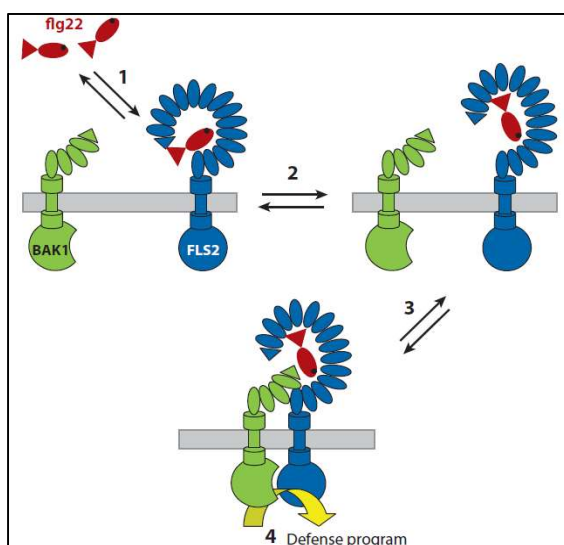
**Figure 1 : Schéma représentant la PAMP-Triggered Immunity (PTI).**

Le PAMP est reconnu par la cellule végétale via un récepteur PRR, déclenchant ainsi une cascade de signalisation aboutissant à une réponse immunitaire de type PTI.

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern ; PRR: Pattern Recognition Receptor.

D'après Pieterse *et al.* (2009).

Dans le cas d'une élicitation avec la flagelline 22, ce peptide de 22 acides aminés et d'origine bactérienne est reconnu au niveau du récepteur transmembranaire FLS2 (Flagellin-Sensing 2). Cela entraîne alors un changement de la conformation de ce récepteur qui va pouvoir alors interagir avec un autre récepteur transmembranaire, BAK1 (Brassinosteroid-insensitive 1-Associated Receptor Kinase 1) et cette interaction va engendrer une cascade de signalisation aboutissant *in fine* au déclenchement d'une réponse immunitaire chez la plante (Boller & Felix, 2009) (**Figure 2**).



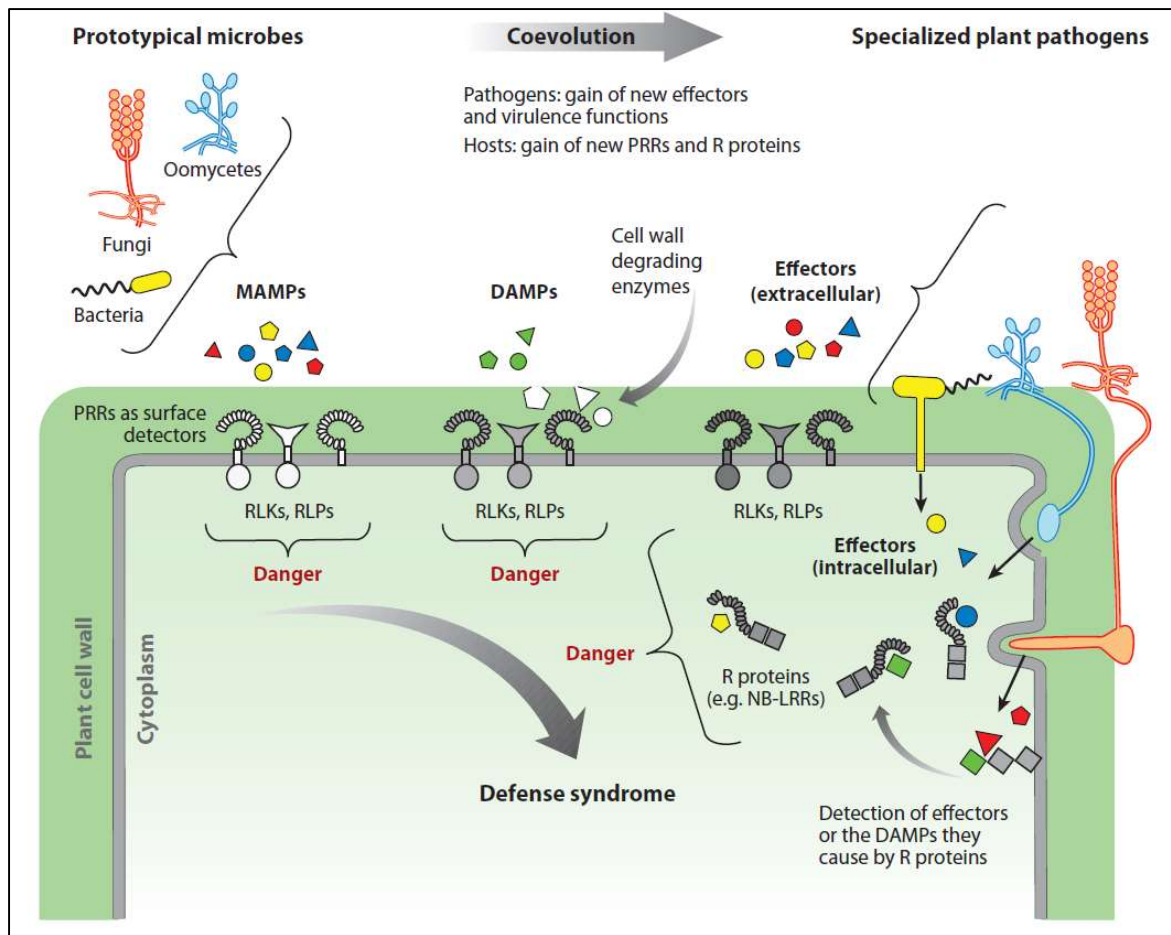
**Figure 2 : Schéma représentant la reconnaissance de la flagelline 22 par le récepteur FLS2 engendrant une réponse immunitaire chez la plante.**

La flagelline 22 est d'abord reconnue par un récepteur transmembranaire FLS2 (FLagellin-Sensing 2). Ce récepteur va alors changer de conformation et pouvoir interagir avec un autre récepteur transmembranaire, BAK1 (Brassinosteroid-insensitive 1-Associated Receptor Kinase 1). Cette interaction déclenche une cascade de signalisation permettant une réponse immunitaire chez la plante. D'après Boller & Felix, (2009).

La réponse à une élicitation peut se traduire, entre autres, par un renforcement de la paroi *via* le dépôt de lignine ou de callose, un polymère de glucoses liés en  $\beta$ -1-3, par la production d'espèces réactives de l'oxygène aussi appelées ROS (Reactive Oxygen Species), une libération importante de calcium au niveau du cytosol, la fermeture des stomates et la surexpression de gènes liés à la défense codant, entre autres, pour les protéines PR (Pathogenesis-Related) ou les phytoalexines (Pieterse *et al.*, 2009; Muthamilarasan & Prasad, 2013).

Néanmoins, la PTI peut dans certains cas être contournée ou inhibée par les pathogènes grâce à la libération d'effecteurs très spécifiques activant l'ETS (Effector-Triggered Susceptibility). En retour, la cellule ne sera pas nécessairement démunie puisqu'elle peut reconnaître et contrecarrer ces effecteurs grâce à des récepteurs intracellulaires : les protéines R (Résistance). Cette réponse constitue l'ETI (Effector-Triggered Immunity) et se traduit par des réponses similaires à la PTI mais plus rapides et de plus grande ampleur (Pieterse *et al.*, 2009; Katagiri & Tsuda, 2010).

Souvent, l'ETI aboutit à une réponse hypersensible qui se caractérise par une mort cellulaire programmée. La compatibilité des effecteurs et de ces protéines R résulte de la coévolution de la plante et du pathogène, ce qui va déterminer lequel des deux prendra le dessus sur l'autre (Jones & Dangl, 2006; Katagiri & Tsuda, 2010; Gouveia *et al.*, 2017) (**Figure 3**). Cette lutte est parfaitement résumée dans le modèle en « zig-zag » proposé par Jones & Dangl, 2006 (**Figure 4**).

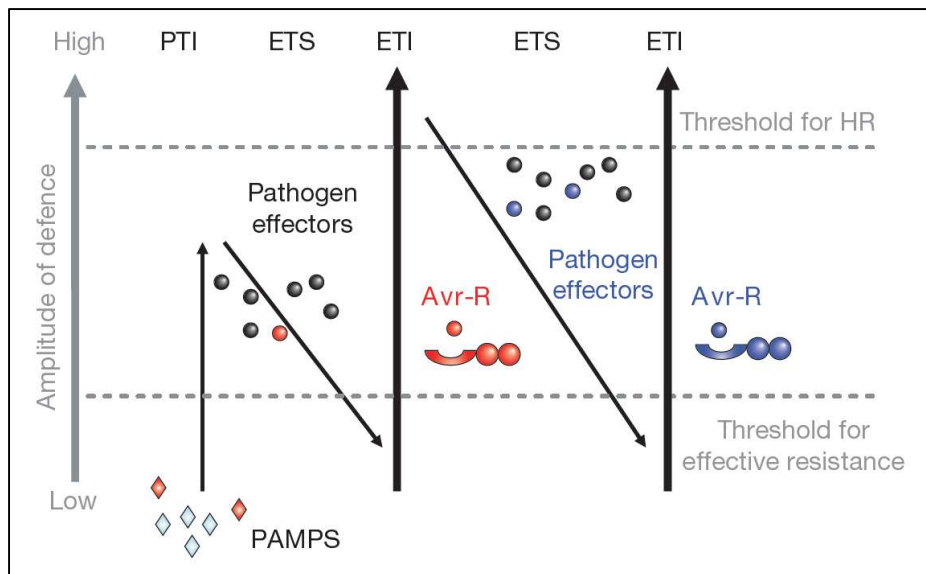


**Figure 3 : Schéma représentant la PTI et l'Effector-Triggered Immunity (ETI) chez les plantes.**

Les MAMPs, PAMPs et DAMPs sont reconnus par des récepteurs membranaires PRRs et vont être perçus comme des signaux de danger pour la plante. Les pathogènes vont évoluer au contact de la plante et produire des effecteurs spécifiques afin de contrecarrer les défenses mises en place. Dans le même temps, les plantes vont elles aussi s'adapter pour se protéger de ces effecteurs grâce notamment aux protéines de résistance R.

MAMP: Microbe-Associated Molecular Patterns; DAMP: Damage-Associated Molecular Patterns ; RLK: Receptor-Like Kinase; RLP: Receptor-Like Protein; NB-LRR: Nucleotide Binding-site–Leucine-Rich Repeat.

D'après Boller & Felix, (2009).



**Figure 4 : Modèle en zig-zag proposé par Jones & Dangl (2006).**

Les PAMPs sont reconnus par la plante, laquelle va déclencher la PTI afin de se défendre. Le pathogène peut contrer la PTI en délivrant des effecteurs qui vont alors activer l'ETS. Suivant la coévolution entre les deux acteurs de cette interaction, la plante peut reconnaître ces effecteurs et déclencher une réponse de défense plus importante et adaptée : l'ETI. Cette réponse peut à nouveau être contrée par le pathogène avec d'autres effecteurs qui peuvent eux-mêmes être reconnus par la plante et contrés. L'ETI s'accompagne souvent d'une réponse hypersensible engendrant la mort cellulaire.

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern ; PTI: PAMP-Triggered Immunity ; ETS: Effector-Triggered Susceptibility ; ETI: Effector-Triggered Immunity ; HR: Hypersensitive Response.

D'après Jones & Dangl, (2006).

Ajoutons que la complexité de la réponse immunitaire des plantes est régulée par des phytohormones telles que l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène (Berens *et al.*, 2017).

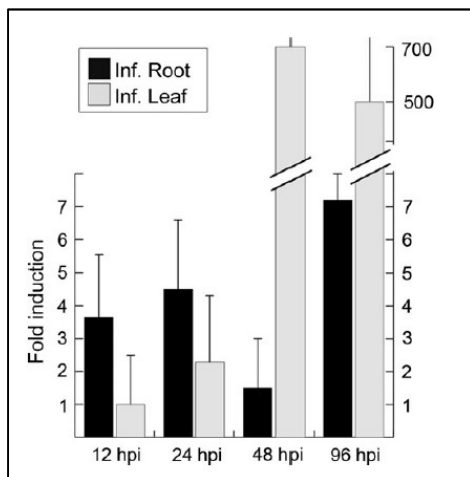
Toutefois, la plupart des études menées sur la défense des plantes a été réalisée sur les parties aériennes. Or, les problématiques ne sont pas les mêmes selon le tissu ou l'organe, l'exemple le plus évident étant la différence entre la racine et les parties aériennes.

## 1.2 Spécificité de la défense des racines

La racine est un organe souterrain servant d'ancrage à la plante et assurant des fonctions vitales telles que l'absorption d'eau et de nutriments. Son environnement suppose de nombreuses interactions avec une grande diversité d'organismes et de micro-organismes bénéfiques, neutres ou pathogènes, vivant dans le sol et composant ainsi la rhizosphère. Ces interactions sont autant de facteurs biotiques qui vont provoquer des réactions de défense chez la plante. Ainsi, pour faire face à ces menaces particulières la plante a mis en place un

ensemble de défenses spécifiques au niveau de la racine (Erb *et al.*, 2009; Balmer & Mauch-Mani, 2013; Driouich *et al.*, 2013). Toutefois, ces mécanismes de défense racinaire restent très peu étudiés à ce jour et ne sont pas encore complètement élucidés.

Les travaux réalisés jusqu'ici sur la défense au niveau racinaire indiquent que celle-ci présente des différences par rapport aux parties aériennes (Balmer & Mauch-Mani, 2013). En effet, une différence d'expression des gènes codant pour les protéines PR a été par exemple révélée entre le système racinaire et les parties aériennes du hêtre après inoculation par l'oomycète pathogène *Phytophthora citricola* (Schlink, 2010). Une différence de transcription a également été relevée chez le riz après inoculation avec le champignon *Magnaporthe oryzae* (Marcel *et al.*, 2010) ou encore chez le maïs attaqué au niveau des feuilles par le papillon *Spodoptera littoralis* (Erb *et al.*, 2009). Chez le maïs, des variations au niveau de l'expression de certaines protéines PR, notamment PR1 (**Figure 5**), ainsi que de la quantité de certaines phytohormones telles que l'acide jasmonique, l'acide salicylique et l'acide abscissique ont été décrites entre les feuilles et les racines en réponse à une infection par l'ascomycète *Colletotrichum graminicola* (Balmer *et al.*, 2013). De plus, les auteurs ont noté que la réponse à ce pathogène était plus rapide chez la racine et que la progression de la maladie y était atténuée.



**Figure 5 : Niveau d'expression de PR1 chez des racines et des feuilles de maïs infectées par *Colletotrichum graminicola*.**

*L'expression du gène codant pour la protéine PR1 est différenciellement induite selon l'organe infecté. Une surexpression plus tardive et bien plus importante est observée chez les feuilles infectées en comparaison avec les racines infectées.*

*D'après Balmer et al. (2013).*

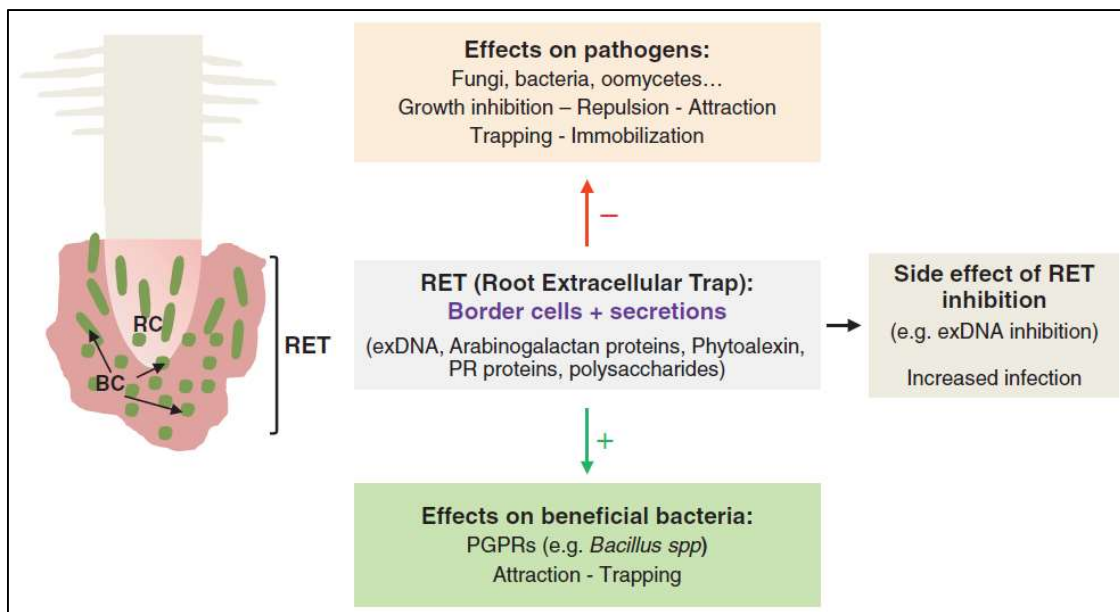
Chez *Arabidopsis thaliana*, l'inoculation de l'oomycète *Hyaloperonospora parasitica* au niveau des feuilles entraîne différentes réactions de défense telles qu'un burst oxydatif et une réponse hypersensible alors que ces réponses ne sont pas détectées au niveau de la racine lorsque cette dernière est inoculée par le même pathogène (Hermanns *et al.*, 2003).

La réponse immunitaire de la plante n'est pas seulement spécifique d'un organe mais peut l'être aussi au niveau du tissu. En effet, des élicitations ont été réalisées avec la flagelline 22 sur des racines de mutants d'*Arabidopsis thaliana* chez lesquels le gène codant pour le récepteur FLS2 n'est exprimé spécifiquement qu'au niveau de certains tissus ou compartiments de la racine. Il a été montré que cette élicitation était ainsi perçue spécifiquement au niveau de ces différents tissus de la racine et qu'elle entraînait une réponse immunitaire comme la production de ROS ou l'induction de gènes de défense (Wyrsh *et al.*, 2015). Par ailleurs, l'élicitation de la racine entière d'*A. thaliana* avec la flagelline 22 aboutit à des réponses localisées avec par exemple des dépôts de callose uniquement au niveau de la zone d'élongation (Millet *et al.*, 2010). En revanche, la même élicitation avec la chitine engendre des dépôts de callose dans une autre zone de la racine, la zone de différenciation (Millet *et al.*, 2010). Cela suggère qu'il y a bien une compartimentation des réponses de défense au niveau de la racine. Cette notion de réponse tissu-spécifique au niveau racinaire n'est pas surprenante dans la mesure où les pathogènes attaquent de manière préférentielle une certaine zone de la racine, en général la zone d'élongation. C'est le cas entre autres chez le pathosystème *Arabidopsis thaliana* – *Phytophthora parasitica* (Attard *et al.*, 2010) ou encore *Pisum sativum* – *Aphanomyces euteiches* (Cannesan *et al.*, 2011). Dans ce dernier pathosystème, l'inoculation de racines de pois avec l'oomycète *A. euteiches* entraîne une production différente selon le compartiment racinaire d'une phytoalexine, la pisatine. En effet, une importante concentration de pisatine a été retrouvée au niveau de la zone de différenciation tandis que cette production était moindre au niveau de la zone d'élongation ou dans les cellules frontières (Cannesan *et al.*, 2011).

Ces cellules frontières, terme regroupant les cellules bordantes (BC : Border Cells) ou apparentées (BLC : Border-Like Cells), constituent un compartiment spécifique de la racine et sont particulièrement impliquées dans la défense (Hawes *et al.*, 2000, 2003; Vicré *et al.*, 2005; Driouich *et al.*, 2010, 2013) (voir **Figure 6** pour leur localisation). Ces cellules produites par le méristème apical de la racine, viables et métaboliquement actives offrent en effet à la racine une protection physique et chimique. Cela se traduit par une interaction directe avec les microorganismes de la rhizosphère en agissant comme leurres ou comme répulsifs vis-à-vis des pathogènes et par la production de différentes molécules de défense telles que des phytoalexines, des AGPs (ArabinoGalactan Protein) et de l'ADN extracellulaire (Hawes *et al.*,



2000; Wen *et al.*, 2007, 2009; Cannesan *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2012; Baetz & Martinoia, 2014; Tran *et al.*, 2016). En 2013, un modèle inspiré d'un mécanisme de défense chez les mammifères : le NET (Neutrophil Extracellular Trap) a été proposé afin d'illustrer et d'expliquer cette protection particulière de la racine. Les BC/BLC agiraient ainsi de concert avec les différentes sécrétions racinaires pour attirer les micro-organismes bénéfiques et éloigner, immobiliser et/ou éliminer les pathogènes. Ce modèle a été baptisé « Root Extracellular Trap » (RET) (Driouich *et al.*, 2013) (**Figure 6**).



**Figure 6 : Modèle du Root Extracellular Trap (RET) proposé par Driouich *et al.* (2013).**

Le RET est constitué des cellules bordantes et de molécules sécrétées ayant des propriétés structurantes et/ou antimicrobiennes. Celui-ci participe à la défense de la racine en la protégeant de pathogènes et en interagissant avec des microorganismes bénéfiques.

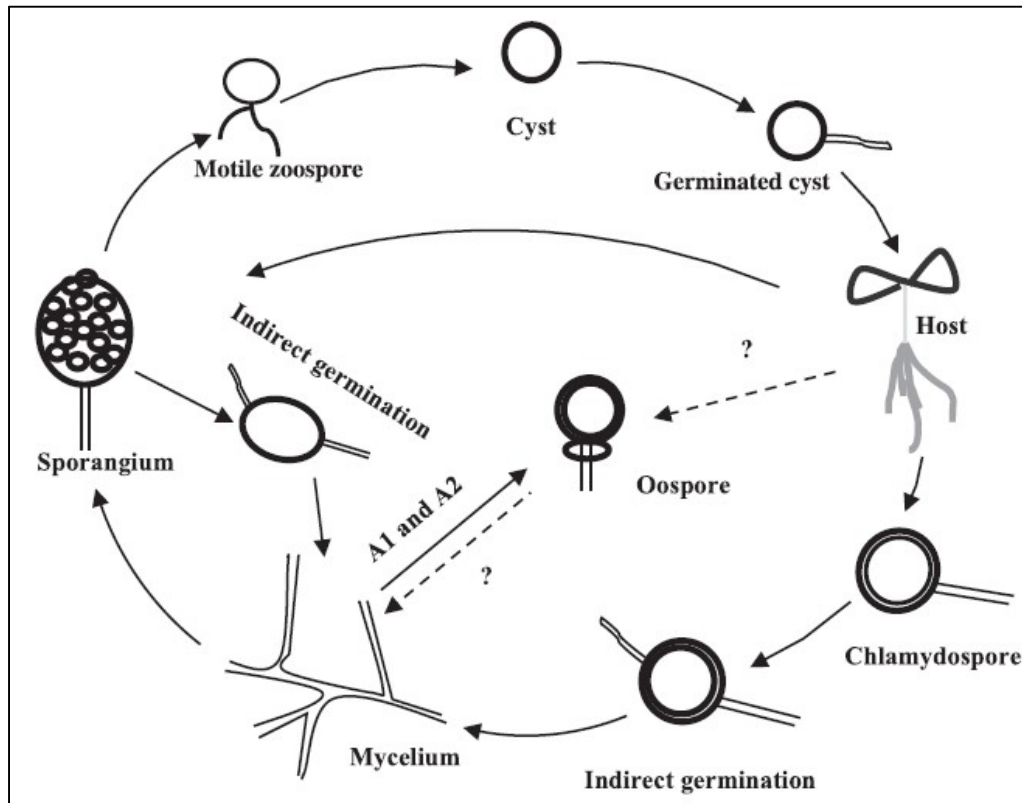
BC: Border Cells ; exDNA: extracellular DNA ; PR proteins: Pathogenesis-Related proteins ; PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria ; RC: Root Cap.

D'après Driouich *et al.* (2013).

### 1.3 Interaction *Phytophthora parasitica* – racine d'*Arabidopsis thaliana*

*Phytophthora parasitica* est un oomycète tellurique utilisé comme modèle pour étudier les interactions plante-oomycète notamment grâce à son très large spectre d'hôtes. En effet, *P. parasitica* est capable d'infecter plus de 60 familles de plantes et notamment *Arabidopsis thaliana* (Attard *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2015). Pour attaquer les racines des plantes, le mycélium de cet oomycète libère de ses sporanges des formes mobiles d'infection dépourvues de paroi, se déplaçant dans l'eau grâce à deux flagelles et que

l'on appelle des zoospores (Meng *et al.*, 2014) (voir cycle de vie de *P. parasitica*, **Figure 7**). Pour atteindre et infecter la plante, les zoospores ont mis en place trois stratégies différentes, à savoir le chimiotactisme, l'électrotactisme et l'auto-aggrégation (Walker & van West, 2007).



**Figure 7 : Cycle de vie de *Phytophthora parasitica*.**

Le mycélium de *P. parasitica* produit des sporanges (appelés ici « sporangium »), lesquels vont libérer les zoospores. Ces derniers vont coloniser l'hôte, s'enkyster et germer. L'oomycète va alors se développer en formant des hyphes et des structures apparentées aux haustoria. A terme, de nouveaux sporanges seront formés à la surface de la plante infectée. Lorsque les conditions ne sont pas favorables, les hyphes vont produire des chlamydospores présentant une paroi épaisse, plusieurs noyaux et capables de survivre plusieurs années dans le sol. Le mycélium de *P. parasitica* est également capable de produire des oospores permettant la reproduction sexuée de l'oomycète.

D'après Meng *et al.* (2014).

Chez *A. thaliana*, les zoospores s'accumulent préférentiellement au niveau d'une zone particulière de la racine, la zone d'élongation (Attard *et al.*, 2008, 2010). Une fois cette zone atteinte, les zoospores vont s'enkyster à la surface et germer pour former un tube dont la pointe se différenciera en un appressorium permettant la pénétration de la racine (Attard *et al.*, 2010). Le pathogène va alors se développer en formant un hyphe et des structures apparentées aux haustoria ou suçoirs, permettant dans un premier temps une croissance biotrophe puis ensuite nécrotrophe au sein des tissus de la plante hôte (Attard *et al.*, 2010).

*P. parasitica* va ainsi se propager le long du système racinaire et finir par infecter la plante entière, provoquant comme symptômes des nécroses au niveau des feuilles (Attard *et al.*, 2010).

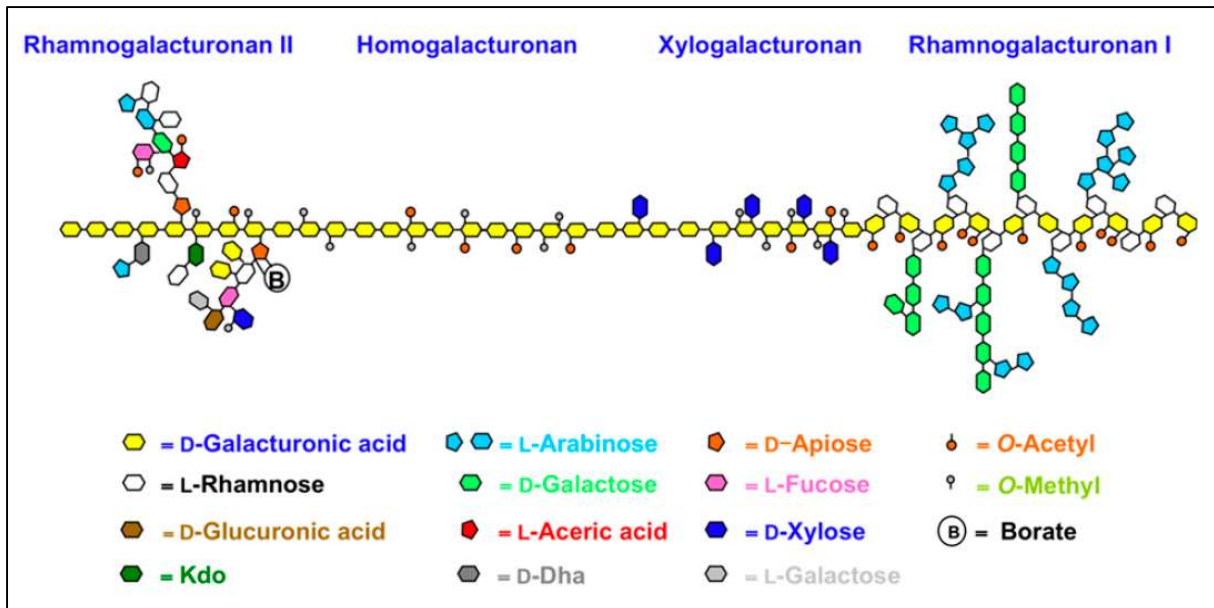
## 1.4 La paroi cellulaire végétale: premier rempart cellulaire contre les pathogènes

La paroi végétale est l'un des premiers remparts contre les pathogènes et est composée principalement de cellulose, hémicelluloses, pectines et de glycoprotéines. La cellulose est un polymère de  $\beta$ -(1,4)-D-glucose organisé sous la forme de microfibrilles et qui confère une grande rigidité à la paroi (Somerville, 2006). Ces microfibrilles de cellulose interagissent avec les hémicelluloses formant ainsi un réseau. Parmi les hémicelluloses, le xyloglucane est majoritaire dans la paroi des eudicotylédones et est composé d'un squelette de  $\beta$ -(1,4)-glucane substitué par des résidus xyloses en  $\alpha$ -(1,6) ou par des chaînes latérales pouvant contenir des résidus xyloses, galactoses et fucoses (Scheller & Ulvskov, 2010). Plus minoritaires, les xylanes sont constitués d'un squelette de  $\beta$ -(1,4)-xylanes parfois substitués par des résidus arabinoses et/ou acides glucuroniques, formant alors des arabinoxylanes et des glucuronoarabinoxylanes (Scheller & Ulvskov, 2010). Enfin, des  $\beta$ -(1,4)-mannanes parfois substitués par des résidus de glucose (glucomannanes) et galactose (galactoglucomannanes) sont principalement retrouvés dans les graines ou dans le bois, et servent comme polysaccharide de réserve (Dhugga, 2004; Schröder *et al.*, 2009; Voiniciuc *et al.*, 2015).

Ce réseau cellulose – hémicellulose est enrobé dans une matrice composée majoritairement de polysaccharides tels que les pectines et de glycoprotéines comme les ArabinoGalactane Protéines (AGPs) et les extensines.

### 1.4.1 Les Pectines

Les pectines sont des polysaccharides ayant un rôle entre autres, dans l'adhésion et l'élongation cellulaire ainsi que la défense (Caffall & Mohnen, 2009). Elles présentent un squelette composé d'acides galacturoniques liés en  $\alpha$ -(1,4) (**Figure 8**) et sont réparties en quatre classes : les homogalacturonanes, les xylogalacturonanes, les RhamnoGalacturonanes de type I (RG-I) et de type II (RG-II).



**Figure 8 : Structure des différentes pectines.**

*D'après Harholt et al. (2010).*

Les homogalacturonanes sont les pectines dont la structure est la moins complexe puisqu'ils sont uniquement constitués du squelette principal d'acides galacturoniques qui est plus ou moins méthylestérifié et parfois O-acétylé. Selon leur degré de méthylestérification, les homogalacturonanes peuvent interagir avec des ions calcium pour former ce que l'on appelle des structures en « boîte à œufs » et être ainsi capables de former un gel. Ceci va avoir un rôle dans l'adhésion cellulaire et une influence sur la flexibilité de la paroi indispensable à la croissance et la modulation de la forme cellulaire (Caffall & Mohnen, 2009). Les homogalacturonanes sont liés de manière covalente avec d'autres pectines telles que les RG-I et les RG-II, et possiblement « cross-linkés » avec le xyloglucane (Caffall & Mohnen, 2009).

Les xylogalacturonanes sont des pectines présentant un squelette similaire aux homogalacturonanes et qui est substitué par des résidus xylooses en  $\beta$ -(1,3). Cette substitution permettrait au xylogalacturonane d'être moins sensible à la dégradation par les enzymes libérées lors d'une attaque d'un pathogène (Jensen *et al.*, 2008).

Le RG-I est composé d'une chaîne linéaire constituée en alternance de résidus acides galacturoniques liés en  $\alpha$ -(1,4) et de rhamnosés liés en  $\alpha$ -(1,2). Sur le carbone 4 des résidus rhamnosés peuvent se greffer des chaînes latérales d' $\alpha$ -(1,5)-arabinanes, de  $\beta$ -(1,4)-galactanes ou d'arabinogalactanes de type I (chaîne de galactanes liés en  $\alpha$ -(1,3)) ou de type

II (chaîne de  $\beta$ -(1,3)-galactanes liés au niveau du carbone 6 avec un à trois galactoses et se terminant parfois par un résidu arabinose) (Lerouge *et al.*, 1993; Caffall & Mohnen, 2009).

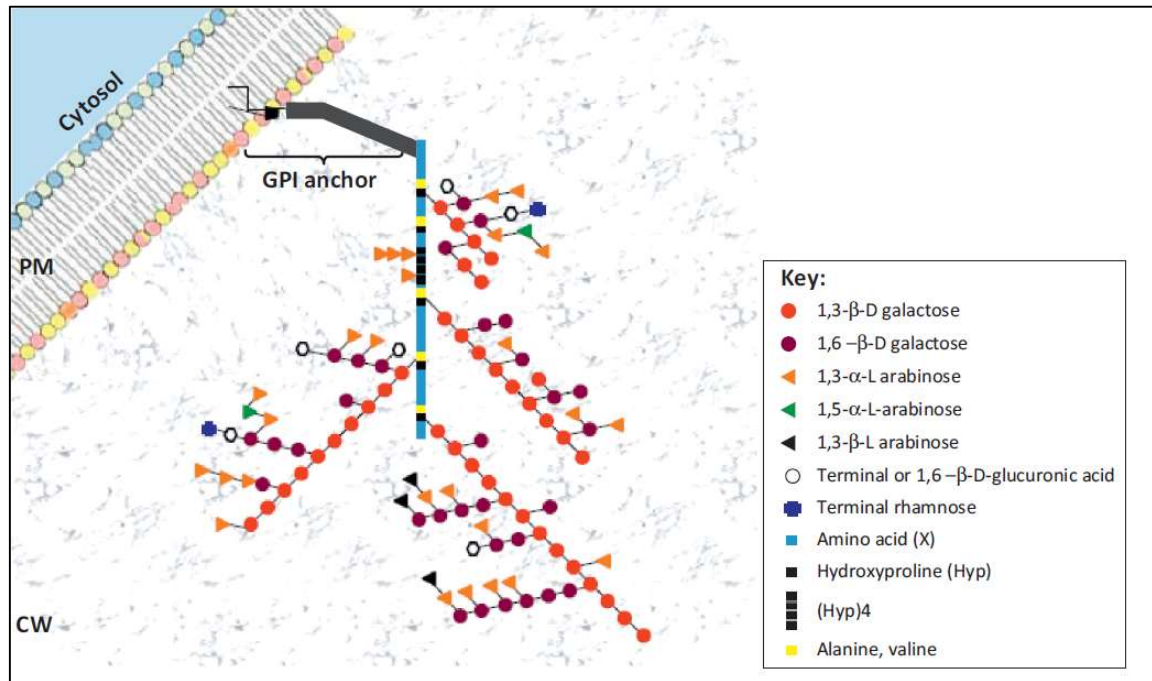
Enfin, le RG-II est une pectine dont la structure très conservée est bien plus complexe et comprend plusieurs monosaccharides assez rares voire uniques. Il se compose en effet d'un squelette d' $\alpha$ -(1,4)-galacturonanes sur lequel sont insérées quatre chaînes latérales différentes nommées A, B, C et D. Ces chaînes latérales contiennent une grande diversité de monosaccharides et de liaisons. Un résidu apiose est par exemple retrouvé sur les chaînes A et B, un résidu Kdo (acide 2-keto-3-deoxy-D-manno-2-octulosonique) sur la chaîne C et un résidu Dha (acide 2-keto-3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosarique) sur la chaîne D. En outre, le RG-II peut se dimériser via une liaison diester de borate au niveau du résidu apiose de la chaîne A, ce qui permettrait de renforcer la paroi (O'Neill *et al.*, 2001; Caffall & Mohnen, 2009; Dumont *et al.*, 2014).

#### 1.4.2 Les ArabinoGalactane Protéines

Outre les différents polysaccharides décrits ci-dessus, la paroi contient également des glycoprotéines telles que les Hydroxyproline-Rich GlycoProteins (HRGPs). Cette famille des HRGPs regroupe les ArabinoGalactane Protéines (AGPs), les hydroxyproline/Proline-Rich Proteins (PRPs) et les extensines. Les PRPs ont un taux de glycosylation extrêmement variable et peu de choses sont connues à ce jour sur leur *O*-glycosylation et leur interaction avec les autres composés pariétaux (Hijazi *et al.*, 2014). Leur structure contient des motifs répétés de 2 à 3 résidus proline ou hydroxyproline et est également riche en valine, lysine et tyrosine (Showalter *et al.*, 2016). Les PRPs ont un rôle dans le renforcement de la paroi, la réponse à un stress hydrique, le développement et dans la défense (Bradley *et al.*, 1992; Brisson *et al.*, 1994; Battaglia *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2014).

Les AGPs sont des glycoprotéines hautement glycosylées composées d'un squelette protéique riche en prolines/hydroxyprolines, alanines, sérines et thréonines, et d'une partie glycanique comptant pour environ 90% de la masse totale – on parle ainsi de protéoglycane. Cette portion glycosylée est principalement constituée de  $\beta$ -(1,3)-galactose mais aussi de  $\beta$ -(1,6)-galactose et d'arabinoses liés en  $\alpha$ -(1,3),  $\alpha$ -(1,5) ou en  $\beta$ -(1,3). D'autres monosaccharides comme le rhamnose, le fucose, l'acide glucuronique ou le xylose peuvent également être retrouvés mais dans des proportions bien plus faibles (Showalter, 2001; Seifert & Roberts,

2007; Nguema-Ona *et al.*, 2014). Les AGPs sont parfois liées avec une ancre GPI (GlycosylPhosphatidyInositol) permettant une fixation à la membrane plasmique (Youl *et al.*, 1998; Svetek *et al.*, 1999) (**Figure 9**).



**Figure 9 : Structure des AGPs.**

Les AGPs sont des protéoglycanes contenant majoritairement de l'arabinose et du galactose. D'autres monosaccharides tels que l'acide glucuronique et le rhamnose sont également présents mais en plus faible proportion.

D'après Nguema-Ona *et al.* (2013).

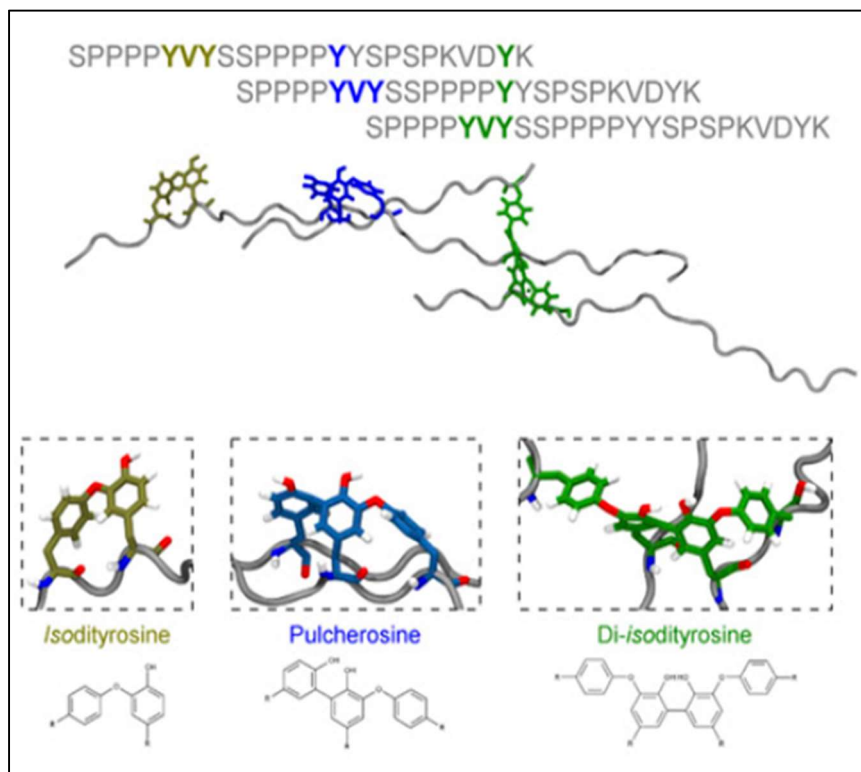
Toutefois, la localisation des AGPs n'est pas uniquement pariétale puisque ces protéoglycanes ont aussi été mis en évidence dans les sécrétions racinaires (Knee *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2012; Cannesan *et al.*, 2012; Koroney *et al.*, 2016). La mise en évidence des AGPs est facilitée par la disponibilité d'anticorps monoclonaux spécifiques mais aussi et surtout, par l'utilisation du réactif  $\beta$ -D-glucosyl Yariv, lequel lie et précipite spécifiquement les AGPs (Yariv *et al.*, 1967; Kitazawa *et al.*, 2013). Cela a permis d'établir des protocoles expérimentaux permettant la localisation, l'extraction et la caractérisation des AGPs que nous avons décrits récemment (Castilleux *et al.*, accepté) (voir l'annexe 1 dans ce manuscrit).

La structure et la composition des AGPs varient selon les espèces et les conditions, traduisant ainsi la diversité de leurs fonctions notamment dans l'embryogénèse, l'orientation du tube pollinique, la croissance et la morphologie cellulaire mais aussi dans la défense (Seifert & Roberts, 2007; Ellis *et al.*, 2010; Nguema-Ona *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2015). Différents

travaux ont en effet rapporté l'importance des AGPs dans l'interaction entre la racine et les micro-organismes pathogènes ou bénéfiques, cela pouvant expliquer la grande richesse en AGPs du système racinaire (Vicré *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2012; Nguema-Ona *et al.*, 2013). Elles sont, par exemple, capables chez le pois d'attirer les zoospores de l'oomycète pathogène *Aphanomyces euteiches* et de provoquer leur enkystement (Cannesan *et al.*, 2012). Elles permettraient aussi d'attirer *Rhizobium* sp. afin de favoriser l'association de la racine avec cette bactérie bénéfique (Vicré *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2011). Au vu de leur importance dans la défense racinaire, les AGPs ont par conséquent été intégrées et citées en exemple lors de l'établissement du modèle du RET (Driouich *et al.*, 2013).

### 1.4.3 Les Extensines

Les extensines sont des glycoprotéines pariétales constituées d'une partie hydrophile contenant des répétitions de séquences caractéristiques Serine-(Hydroxyproline)<sub>3-4</sub> qui vont être *O*-glycosylées, et d'une partie hydrophobe comprenant des séquences Valine-Tyrosine-Lysine (V-Y-K) ou Tyrosine-X-Tyrosine (Y-X-Y) qui vont être le lieu de « cross-linking » (Lamport *et al.*, 2011; Velasquez *et al.*, 2012) (**Figure 10**).

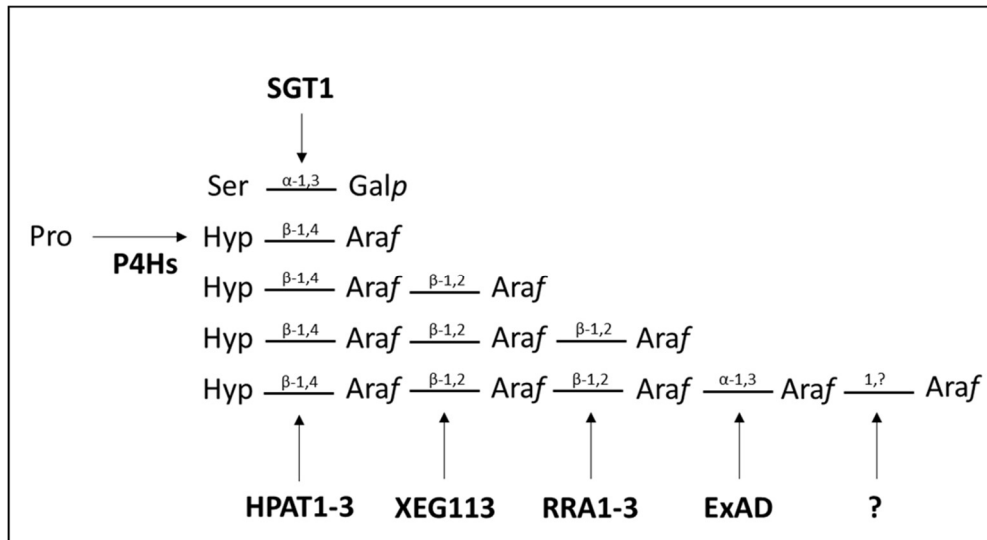


**Figure 10 : Schéma du « cross-linking » des extensines via les résidus tyrosines.** Les résidus Proline (P) peuvent être hydroxylés pour former des résidus Hydroxyproline (O). D'après Velasquez *et al.* (2015)

Ce « cross-linking » des extensines est catalysé par des peroxydases spécifiques comme cela a été montré chez la tomate et le lupin (Schnabelrauch *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2015). Ces peroxydases spécifiques appartiendraient potentiellement à la classe III, néanmoins, leur rôle exact reste encore peu connu. Par ailleurs, le « cross-linking » nécessite aussi une conformation particulière des extensines qui est conférée par la partie glycosylée (Velasquez *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015).

La O-glycosylation des extensines se déroule principalement dans le Réticulum Endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. Dans le RE, les résidus prolines sont hydroxylés en hydroxyprolines par les Prolyl-4-Hydroxylases (P4Hs) (Velasquez *et al.*, 2011; Fragkostefanakis *et al.*, 2014) puis un résidu galactose est inséré en  $\alpha$ -(1,4) sur une sérine grâce à la Serine-GalactosylTransferase 1 (SGT1) (Saito *et al.*, 2014). Par la suite dans l'appareil de Golgi, plusieurs arabinoses vont être successivement greffés sur les résidus hydroxyprolines. Le premier arabinose est lié en  $\beta$ -(1,4) par les HydroxyProline ArabinosylTransferases 1 à 3 (HPAT1-3) (Ogawa-Ohnishi *et al.*, 2013), le second en  $\beta$ -(1,2) par les enzymes Reduced Residual Arabinose 1 à 3 (RRA1-3) (Egelund *et al.*, 2007), le troisième en  $\beta$ -(1,2) par la XyloEndoGlucanase 113 (XEG113) (Gille *et al.*, 2009) et le quatrième en  $\alpha$ -(1,3) par la Extensin Arabinose Deficient transférase (ExAD) (Møller *et al.*, 2017). A ce jour, l'enzyme transférant le cinquième arabinose n'a pas encore été mise en évidence (**Figure 11**). Une fois leur synthèse achevée, les extensines sont transportées par des vésicules golgiennes jusqu'à la surface cellulaire et s'insèrent dans la paroi.





**Figure 11 : Schéma de la glycosylation des extensines.**

Les résidus prolines (Pro) sont d'abord hydroxylés en hydroxyprolines (Hyp). Un galactopyranose (Galp) est ensuite transféré sur le résidu sérine et plusieurs arabinofuranoses (Araf) sur les hydroxyprolines. Les liaisons des sucres ainsi que les enzymes impliquées dans la glycosylation des extensines sont indiquées sur le schéma.

P4Hs: Prolyl-4-Hydroxylases ; SGT1: Serine-GalactosylTransferase 1 ; HPAT1-3: HydroxyProline ArabinosylTransferase 1 to 3 ; XEG113: XyloEndoGlucanase 113 ; ExAD: Extensin Arabinose Deficient transferase.

D'après Velasquez et al. (2012).

Les extensines sont connues pour être impliquées dans différents processus essentiels chez la plante. Elles sont en effet nécessaires dans le développement embryonnaire (Zhang et al., 2008) comme l'atteste par exemple le mutant *rsh* d'*A. thaliana* dont la mutation porte sur un gène codant pour l'extensine 3 et est létale (Hall & Cannon, 2002). Les extensines interviennent également dans l'élongation cellulaire et notamment dans la croissance apicale des poils absorbants (Velasquez et al., 2011; Nguema-Ona et al., 2014; Velasquez et al., 2015). De fait, la plupart des mutants « extensines » d'*A. thaliana* présente des poils absorbants plus courts au niveau de la racine par rapport à ceux de plantes sauvages (Baumberger et al., 2001, 2003; Velasquez et al., 2011). Récemment, il a été proposé que les extensines participent à la morphologie des cellules bordantes en permettant, en synergie avec le xyloglucane, une modulation de l'élongation cellulaire (Mravec et al., 2017). Par ailleurs, les extensines ont aussi un rôle structural permettant l'assemblage de la paroi (Cannon et al., 2008; Pereira et al., 2011; Lampion et al., 2011; Chormova & Fry, 2016). Cela se traduirait, entre autres, par une interaction ionique avec le réseau pectique (MacDougall et al., 2001; Cannon et al., 2008). Enfin, les extensines sont aussi impliquées dans la protection de la plante (Merkouropoulos &

Shirsat, 2003; Deepak *et al.*, 2010; Sujkowska-Rybkowska & Borucki, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Ce rôle dans la défense est décrit en détail sous la forme d'une revue dans la seconde partie du chapitre Introduction de ce manuscrit (Castilleux *et al.*, en préparation).



## 1.5 Article 1: Root defence: how important are cell wall extensins?

**Castilleux R, Plancot B, Ropitiaux M, Carreras A, Leprince J, Boulogne I, Follet-Gueye ML, Popper ZA, Driouich A, Vicré M** (En préparation) Root defence: how important cell wall extensins are?

Article en préparation pour soumission au journal « Journal of Experimental Botany ».

Les extensines sont des glycoprotéines pariétales intervenant dans différentes fonctions biologiques telles que le développement embryonnaire (Hall & Cannon, 2002; Zhang *et al.*, 2008), l'élongation cellulaire (Velasquez *et al.*, 2011; Nguema-Ona *et al.*, 2014; Velasquez *et al.*, 2015), l'assemblage de la paroi (Cannon *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2011; Lamport *et al.*, 2011; Chormova & Fry, 2016) mais aussi la défense (Merkouropoulos & Shirsat, 2003; Deepak *et al.*, 2010; Sujkowska-Rybkowska & Borucki, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Néanmoins, le rôle exact des extensines dans l'immunité végétale, et plus particulièrement dans la protection de la racine, reste à ce jour encore mal connu. Bien que des travaux de synthèse abordant l'implication des extensines dans la défense ont été publiés, ceux-ci se sont surtout intéressés de manière globale à la famille des HRGPs et se sont relativement peu focalisés sur les extensines (Deepak *et al.*, 2010; Rashid, 2016). Nous avons ainsi décidé de rédiger une revue dressant exclusivement l'état des connaissances sur le rôle des extensines dans la défense végétale, et plus précisément au niveau de la racine. Cette revue sera soumise au journal « Journal of Experimental Botany ».

Nous y soulignons que les extensines sont très répandues dans le règne des Plantes et se retrouvent impliquées dans différents types d'interactions, que ce soit avec des pathogènes ou des micro-organismes bénéfiques. Nous avons également compilé les résultats publiés faisant usage des anticorps anti-extensines disponibles, en conditions normales mais aussi après traitement, élicitation ou inoculation des plantes. Cela a permis à la fois d'avoir une idée sur la répartition chez les espèces végétales des épitopes reconnus par ces anticorps et de montrer que certains épitopes pouvaient servir de marqueurs d'une réaction de défense. Ces données sont d'autant plus intéressantes que la structure des épitopes reconnus par ces anticorps n'a pas encore été mise en évidence. Par ailleurs, nous avons détaillé l'importance des extensines dans la protection de la racine et mis en lumière que les extensines n'étaient

pas seulement retrouvées au sein de la paroi mais aussi dans les sécrétions racinaires. Nous proposons par conséquent un modèle afin d'illustrer le rôle structural des extensines et son effet sur l'organisation de la paroi et les sécrétions racinaires.

En conclusion, la participation des extensines dans la défense des plantes apparaît cruciale et des travaux supplémentaires s'avèrent nécessaires afin de mieux comprendre leur mode d'action au sein de la paroi et dans les sécrétions racinaires.

# **Root immunity: how important are cell wall extensins?**

**Romain Castilleux<sup>1</sup>, Barbara Plancot<sup>1</sup>, Marc Ropitiaux<sup>1</sup>, Alexis Carreras<sup>1</sup>, Jérôme Leprince<sup>2</sup>, Isabelle Boulogne<sup>1</sup>, Marie-Laure Follet-Gueye<sup>1</sup>, Zoë A. Popper<sup>3</sup>, Azeddine Driouich<sup>1\*</sup> and Maïté Vicré<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Normandie Université, UNIROUEN, Laboratoire Glyco-MEV EA 4358, Fédération de Recherche "Normandie Végétal" FED 4277, 76000 Rouen, France

<sup>2</sup>INSERM U1239, Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Normandie Université, 76000 Rouen, France

<sup>3</sup>Botany and Plant Science and The Ryan Institute for Environmental, Marine and Energy Research, School of Natural Sciences, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland.

\*Equal contribution of the senior authors.

**E-mail addresses:**

romain.castilleux@gmail.com

barbara.plancot@univ-rouen.fr

marc.ropitiaux@univ-rouen.fr

alexis.carreras@hotmail.com

jerome.leprince@univ-rouen.fr

isabelle.boulogne@univ-rouen.fr

marie-laure.follet-gueye@univ-rouen.fr

zoe.popper@nuigalway.ie

azeddine.driouich@univ-rouen.fr

maite.vicre@univ-rouen.fr

**Corresponding author:**

maite.vicre@univ-rouen.fr

+33 235 146 768



# Root immunity: how important are cell wall extensins?

## Highlight:

This review describes the importance of cell wall extensins in plant defence, more specifically in root-microbe interactions, and discusses their potential role in root secretions.

## Abstract:

Extensins are cell wall glycoproteins, belonging to the Hydroxyproline-Rich GlycoProtein (HRGP) family, which are involved in many biological functions, including plant growth and defence. Several reviews have described the implication of HRGPs in plant immunity but little focus has been given specifically to cell wall extensins. Yet, a large set of recently published data indicates that extensins play an important role in plant protection, especially in root-microbe interactions. Here, we summarize the current knowledge on this topic and discuss the importance of extensins in root defence. We first provide an overview of the distribution of extensin epitopes recognised by different monoclonal antibodies among plants and discuss the relevance of some of these epitopes as markers of the root defence response. We also highlight the implication of extensins in different types of plant interactions elicited by either pathogenic or beneficial microorganisms. We then present and discuss the specific importance of extensins in root secretions as these glycoproteins are not only found in the cell walls but are also released into the root mucilage. Finally, we propose a model to illustrate the impact of cell wall extensin on root secretions.

*Keywords: Cell wall, plant defence, cell wall epitope, extensins, monoclonal antibodies, pectins, root secretions, root-microbiome interactions*



## Introduction

Extensins are cell wall glycoproteins belonging to the Hydroxyproline-Rich GlycoProtein (HRGP) family like ArabinoGalactan Proteins (AGPs) and Proline/hydroxyproline-Rich Proteins (PRP). They are *O*-glycosylated on specific Serine-(Hydroxyproline)<sub>4-5</sub> motifs of the protein core (see glycan structure in Fig. S1); *O*-glycosylation is carried out in the Endoplasmic Reticulum (ER) and the Golgi apparatus. In the ER, the proline residues are first hydroxylated by Prolyl-4-Hydroxylases (P4Hs) (Velasquez *et al.*, 2011; Fragkostefanakis *et al.*, 2014) before transfer of a galactose residue to the serine residue by Serine-GalactosylTransferase 1 (SGT1) (Saito *et al.*, 2014). Then, in the Golgi, several arabinose residues are sequentially added onto the hydroxyproline residues. The first arabinose is added by HydroxyProline ArabinosylTransferase 1 to 3 (HPAT1-3) (Ogawa-Ohnishi *et al.*, 2013), the second by Reduced Residual Arabinose 1 to 3 (RRA1-3) (Egelund *et al.*, 2007), the third by XyloEndoGlucanase 113 (XEG113) (Gille *et al.*, 2009) and the fourth by Extensin Arabinose Deficient transferase (ExAD) (Velasquez *et al.*, 2012; Møller *et al.*, 2017). To date, the glycosyltransferase that transfers the fifth arabinose has not been determined.

*O*-glycosylation is required for the intra- and/or inter-molecular cross-linking of extensin through isodityrosine, pulcherosine or di-isodityrosine linkages (Smith *et al.*, 1986; Held *et al.*, 2004; Lamport *et al.*, 2011), by providing the correct conformation to the glycoprotein (Schnabelrauch *et al.*, 1996; Velasquez *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). This cross-linking is catalyzed by specific extensin peroxidases. However, only a few of them have been identified and characterized so far (Brownleader *et al.*, 1995; Schnabelrauch *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2015). Extensins can interact with other cell wall components such as pectins (MacDougall *et al.*, 2001; Nuñez *et al.*, 2009; Valentin *et al.*, 2010; Leroux *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Neumetzler *et al.*, 2012; Chormova and Fry, 2016) and hemicelluloses (Gille *et al.*, 2009), thus impacting significantly the overall architecture and structural organization of the cell wall.

It is well known that extensins display significant structural variation, and there are additionally hybrid-extensins and extensin-motif containing proteins as reviewed by Borassi *et al.* (2016). Furthermore, the diversity of extensins is related to some extent to the diversity of organisms among the Plant Kingdom as shown by an interesting bioinformatics study

performed by Liu *et al.* (2016). In this study, the authors analysed and classified extensins from sequenced genomes of algae, bryophytes, lycophytes, gymnosperms, monocots and various eudicots. They showed that extensin structure differs among different major taxonomic groups, suggesting that structural modifications may be associated with major evolutionary events such as plant vascularization and terrestrialization (Liu *et al.*, 2016).

Using immunocytochemical techniques together with genetic approaches, the presence of extensin, extensin genes and/or extensin epitopes has been reported to occur ubiquitously within plants (Table 1). Extensins are involved in a wide range of processes such as embryo development (Hall and Cannon, 2002; Zhang *et al.*, 2008), root hair growth (Ringli, 2010; Velasquez *et al.*, 2011, 2015), cell wall assembly and structure (Cannon *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2011; Lamport *et al.*, 2011; Chormova and Fry, 2016) and biotic and abiotic stress responses (Merkouropoulos and Shirsat, 2003; Deepak *et al.*, 2010; Sujkowska-Rybkowska and Borucki, 2014; Zhang *et al.*, 2016). In the past years, many of these biological functions, especially the structural role of extensins in plant cell walls, have been extensively investigated and reviewed (Lamport *et al.*, 2011; Velasquez *et al.*, 2012; Hijazi *et al.*, 2014). In contrast, the involvement of extensins in plant defence has been relatively much less well documented (Deepak *et al.*, 2010; Rashid, 2016), although recent reports have revealed the importance of extensins in plant protection against pathogens. In this review, we summarize the current knowledge on extensin involvement in biotic stress, focusing specifically on root-microbe interactions, and propose a model to explain the effect of cell wall extensins on root secretions.

## **Extensin epitopes as potential defence markers**

Extensin epitopes have been detected in a large spectrum of plants using commercially available specific monoclonal antibodies (mAbs) including LM1, JIM11, JIM12, JIM19 and JIM20 (Smallwood *et al.*, 1994, 1995; Knox *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995). These mAbs are powerful tools to detect and localize extensin epitopes although to date the recognised structure, typically a short sequence of sugar residues, (known as the epitope) remains largely unknown. Recently, a novel anti-extensin antibody, LM3, was used in several studies. The epitope recognised by LM3 was detected in *Pisum sativum* (pea) roots, exhibiting a strong signal as compared to immunolabelling with the mAb LM1 (Mravec *et al.*, 2017). The epitope

recognised by LM3 was also reported to occur in extracts from *Buxus sempervirens* (box), *Viscum album* (mistletoe), *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* (tomato) and *Taiwania cryptomerioides* (a conifer) based on immuno-glycan microarray analyses (Feng *et al.*, 2014). In these extracts, the LM3 signal pattern was similar to that obtained with JIM20 but differed from the pattern obtained with JIM11 and JIM12. Currently, little information is available for LM3 compared to the other mAbs known to recognise epitopes associated with extensins. In Fig. 1, we propose an overview of the epitope distribution for each mAb according to the current literature. LM1, JIM11, JIM12 and JIM20 epitopes appear to have a widespread occurrence in various plant species and tissues with differences at the organ level observed between plant species. For instance, although JIM12 and LM1 epitopes were detected in roots of *A. thaliana* (Velasquez *et al.*, 2011; Plancot *et al.*, 2013; Castilleux *et al.*, unpublished), these epitopes could not be seen in the roots of *Benincasa hispida* (wax gourd) (Xie *et al.*, 2011) and *Musa* spp. AAA (banana) (Wu *et al.*, 2017). A few studies have used the JIM19 mAb and the associated epitopes have been reported only in a few cases including in rice callus extracts (Desikan *et al.*, 1999) and roots of carrot (*Daucus carota*), pea (*Pisum sativum*) and onion (*Allium cepa*) (Casero *et al.*, 1998). Interestingly, the signal intensity and/or epitope distribution of LM1, JIM11 and JIM20 were reported to differ in response to elicitation, wounding and pathogen inoculation or following enzyme treatments that can also result in release of potential elicitors/DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) (Fig. 1). These results suggest that extensin epitope exposure/recognition can be modified following different treatments, implying a remodelling of extensin structure and/or its interaction with other components within the cell wall. This emphasizes the importance of extensins in plant immunity and suggests that epitopes recognised by the mAbs LM1, JIM11 and JIM20 could serve as markers of plant defence response as previously proposed for JIM11 in the pathosystem banana - *Fusarium oxysporum* (Wu *et al.*, 2017). In contrast, based on the currently available data, epitopes recognised by the mAbs JIM12 and JIM19 appear to be less promising markers of such a response.

## Extensins in plant defence

Extensins were found to be involved in various plant interactions (Table 2) such as plant parasitism, symbiosis or pathogenic attacks by bacteria, fungi, oomycetes and nematodes. In many cases, extensin epitope distribution and extensin gene expression were indeed

modified. In the case of plant parasitism, epitopes associated with extensins were detected in both the host plant, *Pelargonium zonale*, and the parasite haustoria of *Cuscuta reflexa* (Striberny and Krause, 2015). Labelling with the mAbs JIM11, JIM12 and JIM20 was observed predominantly within the site of infection but was not observed, or only weakly, in uninfected areas, indicating the importance of extensins for both the host and the parasite in this type of interaction. Thus, it is likely that extensin structure and/or biosynthesis are altered specifically in infected areas during the interaction. Extensins were also described to be involved in response to physical stresses (e.g., wounding). Indeed, upregulation of extensin gene transcripts has been reported in wounded soybean (*Glycine max*) root (Ahn *et al.*, 1998), potato (*Solanum tuberosum*) tubers (Neubauer *et al.*, 2012) and banana (*Musa* sp.) roots (Wu *et al.*, 2017). In the latter, the overexpression of extensin genes was coupled with an increase in fluorescence intensity when the roots were immunolabelled with JIM11 and JIM20 antibodies. Similarly, removal of *Brassica campestris* (field mustard) leaves was shown to lead to the induction of JIM12 and JIM20 signals in petioles (Davies *et al.*, 1997). In *Arabidopsis thaliana*, GUS analysis showed increased expression of the *ext3* gene specifically at the wounded sites of leaves (Hall and Cannon, 2002), whereas the *ext1* gene expression was induced in localized areas where stems and leaves were wounded (Merkouropoulos and Shirsat, 2003). Thus, overexpression of extensin genes in response to physical stress could result in an increase of the biosynthesis and secretion of extensins into the cell wall, making it stronger and more resistant to induced damage.

In plants, defence responses can be induced through the application of molecules acting as elicitors including MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns), DAMPs and hormones (Table 2). When *A. thaliana* seedlings were treated with either salicylic acid or methyl jasmonate, two hormones involved in plant defence, GUS analysis revealed the induction of the *ext1* gene throughout the plant (Merkouropoulos and Shirsat, 2003). Similar results were reported for *Nicotiana tabacum* (tobacco) leaves treated with various hormones including salicylic acid, abscisic acid and ethylene, in which microarray analysis indicated induction of an extensin-like gene (Zhang *et al.*, 2016). Interestingly, Jackson *et al.* (2001) showed that, following treatment of grapevine (*Vitis vinifera*) callus cultures with a mycelium extract enriched in wall glucans from the oomycete *Phytophthora megasperma*, strengthening of the cell wall occurred through insolubilization of the extensin GvP1. In contrast, this effect

was not observed when the callus cultures were treated with salicylic acid (Jackson *et al.*, 2001).

The role of extensins in response to pathogen attack was also investigated in a range of plant species (Table 2). In the seventies, Esquerré-Tugayé and collaborators quantified hydroxyproline tetra- and tri-arabinosides of extensin in the cell wall of *Cucumis melo* (musk melon) infected with the fungus *Colletotrichum lagenarium* and found a significant increase of these fragments in infected plants (Esquerré-Tugayé and Mazau, 1974). The authors also found a correlation between hydroxyproline accumulation in the cell wall and the development of symptoms on infected plants (Esquerré-Tugayé *et al.*, 1979). In addition, treatment of *C. melo* seedlings with ethylene was found to cause a rise in the content of HRGPs and a reduced susceptibility to the disease. More recently, tissue printing techniques, that enable localisation of the epitopes, revealed that JIM11 epitopes were induced in *Brassica campestris* petioles inoculated with *Xanthomonas campestris* (Davies *et al.*, 1997). Induction was stronger when *X. campestris* strains with an incompatible interaction were used. This pathogen was also employed by Merkouropoulos and Shirsat (2003) on *A. thaliana* seedlings. GUS and Northern blot analyses revealed higher expression of the *ext1* gene in inoculated seedlings, specifically at the infection sites. Interestingly, when this same gene was overexpressed in *A. thaliana* plants, infection with *Pseudomonas syringae* DC3000 resulted in fewer symptoms than in non-overexpressing plants (Wei and Shirsat, 2006). The authors pointed out that although plants overexpressing the *ext1* gene were infected, the spread of the pathogen was largely limited. Likewise, overexpression of an extensin-like gene in *Solanum lycopersicum* (tomato) resulted in a reduction of symptoms induced by *Clavibacter michiganensis* (Balaji and Smart, 2012).

Taken together, these studies emphasize that extensins play an important role in plant defence through strengthening the cell wall, facilitating attachment of symbiotic organisms, preventing tissue damage or limiting pathogen invasion and propagation. Nevertheless, most of these studies were conducted on aerial parts of plants whereas recent works highlight that the immune response can differ between leaves and roots (Attard *et al.*, 2010; Balmer *et al.*, 2013). In addition, the RNA-seq data from *A. thaliana* grown under normal conditions (*i.e.* without biotic or abiotic stresses) reported by Widman *et al.* (2014) showed that a significant number (2424) of genes differed in their expression between shoots and roots. Interestingly,

the authors observed that among the root overexpressed genes, at least 9 encode extensin proteins, suggesting specific roles of these glycoproteins in root tissues.

## Extensins in root-microbe interactions

A few studies have described the role of extensins in root symbiotic interactions. A potential involvement of extensins was reported in the *P. sativum*–*R. leguminosarum* symbiotic interaction that occurs in root nodules (Reguera *et al.*, 2010; Sujkowska-Rybkowska and Borucki, 2014). In 2010, Reguera *et al.* used the mAb MAC265, which recognises chimeric AGP-Extensins (AGPEs) (VandenBosch *et al.*, 1989; Pattathil *et al.*, 2010), to perform Western blots on *Pisum sativum* nodules (Reguera *et al.*, 2010). Stronger intensity of a band coupled with the appearance of a new specific band were detected in nodule fractions infected with *Rhizobium leguminosarum* compared to fractions obtained from non-infected nodules. Moreover, immunolabelling with the MAC265 antibody was weaker in the absence of boron, a central element for the dimerization of the RhamnoGalacturonan II (RG-II) in the cell wall (O'Neill *et al.*, 2001). The authors proposed that AGPEs could interact with RG-II, thereby reinforcing the cell wall within the infection thread. Interestingly, extensins were recently hypothesized to act as chaperones for RG-II, enabling the dimerization of the latter through borate diester bridges (Chormova and Fry, 2016). This supports further the hypothesis that extensins may be used as templates for pectin assembly *in muro*, essential for cell wall structure and function. Extensin occurrence and distribution have also been investigated in the symbiotic interaction between pea and *R. leguminosarum* by using immunolabeling with the LM1 antibody (Sujkowska-Rybkowska and Borucki, 2014). The authors clearly showed the presence of LM1 epitopes (associated with extensins) in infected nodules and argued that extensins might be involved in the attachment of *Rhizobium* to nodules.

Other publications also give suggestive evidence for the involvement of extensins in root-pathogen interactions. Firstly, it is important to note that the *ext1* gene described earlier as involved in plant defence response, is predominantly expressed in roots (Merkouropoulos and Shirsat, 2003). In 1993, Niebel *et al.* performed RNA gel blot analysis on *N. tabacum* infected by the root knot nematode *Meloidogyne javanica* for 1 and 2 weeks and found that an extensin gene, *Pext8*, was strongly induced. Moreover, immunostaining with an anti-extensin antibody on root sections displayed a stronger signal in the infected tissue (Niebel *et*

*al.*, 1993). These analyses were completed by electron microscopy observations showing that extensin epitopes were mostly localized within the cell wall and in the intercellular space of cells in contact with or close to the pathogen location (Niebel *et al.*, 1993). This suggests a possible reinforcement of the cell wall through a cross-linking of extensins in response to the pathogenic infection in order to limit its propagation. Immunolabelling carried out on *Musa* sp. and *Benincasa hispida* roots revealed the presence of epitopes, recognised by the mAbs JIM11 and JIM20, associated with extensins (Xie *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2017). In *Musa* sp. roots, the JIM11 fluorescence intensity was enhanced following inoculation with *Fusarium oxysporum* (Wu *et al.*, 2017), whereas in *Benincasa hispida* roots the majority of the signal vanished after treatment with fusaric acid or infection by *Fusarium oxysporum* (Xie *et al.*, 2011). In addition, this treatment and inoculation triggered respectively a stronger signal in the phloem and appearance of signal localised to the rhizodermis (Xie *et al.*, 2011). These unexpected results were subsequently corroborated by the immunolabelling observations on *A. thaliana* and *Linum usitatissimum* (flax) roots made by Plancot *et al.* (2013). Specifically, LM1 epitopes were found to be associated with the cell wall of flax and Arabidopsis root Border-Like Cells (BLCs) (Plancot *et al.*, 2013). BLCs are living cells derived from root caps known to be released into the rhizosphere and involved in the protection of the root from pathogen attacks (Hawes *et al.*, 2003; Vicré *et al.*, 2005; Driouich *et al.*, 2010). Plancot *et al.* (2013) also showed that upon treatment of the roots with the bacterial elicitor flagellin 22, LM1 labelling almost completely disappeared. The authors hypothesised that elicitation with flagellin 22 induced a significant reorganisation of polymers containing LM1 epitopes making these inaccessible to the antibody *in muro*. Such a reorganisation would include extensin network insolubilization and/or interaction with other components within the cell wall which would impact the whole wall architecture in response to elicitation. This is in agreement with the results obtained by Jackson *et al.* (2001) for grapevine callus and supports the hypothesis that extensins have a role in strengthening the cell wall during infection to limit pathogen invasion.

## **Extensins in root secretions**

Several reports have shown that extensins are also found in the extracellular medium outside the wall. In 1989, Kawasaki detected extensins in the culture medium of *N. tabacum* suspension cells suggesting that these HRGPs might be secreted. Extensins and extensin-like

molecules were also found to be a constituent of the oleogum resins secreted by *Boswellia serrata* and *B. carteri* roots (Herrmann *et al.*, 2012). In addition, a protein recognised by the anti-extensin antibody JIM12 was found by Western blot analysis in the culture medium of salt-stressed *Dactylis glomerata* embryogenic cultures but not in non-stressed cultures (Zagorchev and Odjakova, 2011). The authors speculated that extensins might be secreted as a response and adaptation to the stress. Similar results were found in the case of pathogen attack simulation on *Solanum tuberosum* (Koroney *et al.*, 2016). Whereas epitopes associated with extensins were detected at the root surface and in the mucilage, Western blot of exudates including the mucilage gave a much stronger signal with the LM1 antibody after treatment with an elicitor derived from *Pectobacterium atrosepticum* (Koroney *et al.*, 2016). This indicates that the root immune response includes an increased secretion of extensins into the extracellular mucilage. Similarly, Plancot *et al.* (2013) showed that root secretions of flax and Arabidopsis contained extensin LM1 epitopes. Additional immunolocalization studies with anti-extensin antibodies indicated the presence of extensin epitopes in root mucilage of other species including *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile (Zygophyllaceae), pea (*P. sativum*, Fabaceae) and soybean (*Glycine max*, Fabaceae) (Ropitiaux *et al.*, unpublished, Carreras *et al.*, unpublished and Fig. 2). Thus extensins seem also to occur in the root mucilage along with AGPs, pectic polysaccharides, secondary metabolites, antimicrobial compounds and extracellular DNA (Wen *et al.*, 2007, 2009; Driouich *et al.*, 2013; Baetz and Martinoia, 2014; York *et al.*, 2016; Koroney *et al.*, 2016; Weiller *et al.*, 2016). Together with the root cap, the border cells or border-like cells and other secretions, the mucilage would form the Root Extracellular Trap (RET), a protective network proposed by Driouich *et al.* (2013), by analogy with the Neutrophil Extracellular Trap (NET) occurring in mammals. The RET would thus attract beneficial microbe and “trap”, repel and/or eliminate the pathogens, thus playing a key role in root defence.

Localization of extensins in root secretions, and not only within cell walls, is of particular interest, suggesting that these glycoproteins may have other functions in plant defence in addition to reinforcement of the cell wall to limit pathogen penetration. Future research will be required to assess the role(s) of secreted extensins in root defence. Nevertheless, it is tempting to hypothesize that secreted extensins could have a structural role, enabling reinforcement of the mucilage network by interacting with other cell wall



components that are quantitatively important components of root secretions such as pectins or AGPs (proteoglycans of the HRGP family like extensins). They may also play a role as a scaffolding component within the mucilage. Association between pectins and AGPs has indeed already been demonstrated (Oosterveld *et al.*, 2002; Immerzeel *et al.*, 2006; Cannesan *et al.*, 2012). Furthermore, several studies showed that extensins could also interact with pectins (MacDougall *et al.*, 2001; Cannon *et al.*, 2008; Nuñez *et al.*, 2009; Valentin *et al.*, 2010; Reguera *et al.*, 2010; Leroux *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Neumetzler *et al.*, 2012; Chormova and Fry, 2016). This is supported by immunolocalization of pectin epitopes in *A. thaliana* mutants affected in extensin arabinosylation, *xeg113* and *rra2* (Fig. 3). Using the anti-pectin monoclonal antibody LM19, a signal was observed along the wild-type root surrounded by a thin mucilage. However, the intensity was enhanced and a very thick halo of labelled mucilage was detected in the two mutants, especially in *xeg113*. It has been demonstrated that complete arabinosylation of extensins is required for the correct conformation of these glycoproteins allowing the formation of the cross-links essential for cell wall assembly and organization (Schnabelrauch *et al.*, 1996; Velasquez *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). In the model proposed in Fig. 4, we hypothesize that incorrect arabinosylation of extensins in the *rra2* and *xeg113* mutants alters their conformation, resulting in a modified cell wall architecture and leading to “leak” of pectins into the mucilage. However, the possibility of higher secretions of pectins in response to alteration of cell wall organization in the mutants cannot be excluded.

Further work will be required to establish precisely how associations occur between extensins and other cell wall components including pectins. We could also speculate that secreted extensins might play a direct role in the interaction between the root and microbes either by attracting or repelling them similarly to the scenario shown for AGPs (Xie *et al.*, 2012; Cannesan *et al.*, 2012; Nguema-Ona *et al.*, 2013). In any case, secreted extensins are likely to contribute significantly to the protective function of the mucilage whose composition is remodeled during infection and in response to elicitation.

## Conclusion

The contribution of extensins to plant defence is becoming well established but many challenging questions remain to be solved. These include: How extensins are incorporated

within the cell wall and what are the other cell wall polymers associated with? How do they coordinate the assembly of the cell wall? Is the diversity of extensin structures related to specific functions in the context of root defence? Why extensins also occur in root mucilage, and how they contribute to its organization and function? Do they have specific roles in roots, especially in root-microbe interactions (pathogens versus beneficials)? Clearly, further work is required to better understand the impact of extensins on the structure and function of the cell wall and mucilage in relation with root defence.

## **Acknowledgments**

This work was supported by La Région de Haute Normandie, la Structure Fédérative de Recherche « Normandie Végétal » (FED 4277), the University of Rouen Normandie and le groupe CMI-Roullier. Microscopy images were obtained on PRIMACEN (<http://www.primacen.fr>), the Cell Imaging Platform of Normandy, Faculty of Sciences, University of Rouen Normandie, 76821 Mont Saint Aignan.

## References

- Ahn JH, Choi Y, Kim S-G, Kwon YM, Choi YD, Lee JS.** 1998. Expression of a soybean hydroxyproline-rich glycoprotein gene is correlated with maturation of roots. *Plant Physiology* **116**, 671–679.
- Ahn JH, Choi Y, Kwon YM, Kim S-G, Choi YD, Lee JS.** 1996. A novel extensin gene encoding a hydroxyproline-rich glycoprotein requires sucrose for its wound-inducible expression in transgenic plants. *The Plant Cell* **8**, 1477–1490.
- Attard A, Gourgues M, Callemeyn-Torre N, Keller H.** 2010. The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytologist* **187**, 449–460.
- Baetz U, Martinoia E.** 2014. Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science* **19**, 90–98.
- Balaji V, Smart CD.** 2012. Over-expression of *snakin-2* and *extensin-like* protein genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *Transgenic Research* **21**, 23–37.
- Balmer D, de Papajewski DV, Planchamp C, Glauser G, Mauch-Mani B.** 2013. Induced resistance in maize is based on organ-specific defence responses. *The Plant Journal* **74**, 213–225.
- Baumberger N, Ringli C, Keller B.** 2001. The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development* **15**, 1128–1139.
- Baumberger N, Steiner M, Ryser U, Keller B, Ringli C.** 2003. Synergistic interaction of the two paralogous *Arabidopsis* genes *LRX1* and *LRX2* in cell wall formation during root hair development. *The Plant Journal* **35**, 71–81.
- Betekhtin A, Rojek M, Milewska-Hendel A, Gawecki R, Karcz J, Kurczynska E, Hasterok R.** 2016. Spatial distribution of selected chemical cell wall components in the embryogenic callus of *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE* **11**, e0167426.
- Borassi C, Sede AR, Mecchia MA, Salgado Salter JD, Marzol E, Muschietti JP, Estevez JM.** 2016. An update on cell surface proteins containing extensin-motifs. *Journal of Experimental Botany* **67**, 477–487.
- Brownleader MD, Ahmed N, Trevan M, Chaplin MF, Dey PM.** 1995. Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiology* **109**, 1115–1123.

**Bucher M, Schroeer B, Willmitzer L, Riesmeier JW.** 1997. Two genes encoding extensin-like proteins are predominantly expressed in tomato root hair cells. *Plant molecular biology* **35**, 497–508.

**Cannesan MA, Durand C, Burel C, Gangneux C, Lerouge P, Ishii T, Laval K, Follet-Gueye M-L, Driouich A, Vire-Gibouin M.** 2012. Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. *Plant Physiology* **159**, 1658–1670.

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

**Casero PJ, Casimiro I, Knox JP.** 1998. Occurrence of cell surface arabinogalactan-protein and extensin epitopes in relation to pericycle and vascular tissue development in the root apex of four species. *Planta* **204**, 252–259.

**Cassab GI, Nieto-Sotelo J, Cooper JB, van Holst G-J, Varner JE.** 1985. A developmentally regulated hydroxyproline-rich glycoprotein from the cell walls of soybean seed coats. *Plant physiology* **77**, 532–535.

**Chen Y, Dong W, Tan L, Held M, Kieliszewski M.** 2015. Arabinosylation plays a crucial role in extensin cross-linking *in vitro*. *Biochemistry Insights* **8(S2)**, 1–13.

**Chormova D, Fry SC.** 2016. Boron bridging of rhamnogalacturonan-II is promoted *in vitro* by cationic chaperones, including polyhistidine and wall glycoproteins. *New Phytologist* **209**, 241–251.

**Davies HA, Daniels MJ, Dow JM.** 1997. Induction of extracellular matrix glycoproteins in *Brassica* petioles by wounding and in response to *Xanthomonas campestris*. *Molecular plant-microbe interactions* **10**, 812–820.

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

**Deepak S, Shailasree S, Kini RK, Muck A, Mithöfer A, Shetty SH.** 2010. Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defence. *Journal of Phytopathology* **158**, 585–593.

**Desikan R, Hagenbeek D, Neill SJ, Rock CD.** 1999. Flow cytometry and surface plasmon resonance analyses demonstrate that the monoclonal antibody JIM19 interacts with a rice cell surface component involved in abscisic acid signalling in protoplasts. *FEBS letters* **456**, 257–262.

- Dong W, Kieliszewski M, Held MA.** 2015. Identification of the pI 4.6 extensin peroxidase from *Lycopersicon esculentum* using proteomics and reverse-genomics. *Phytochemistry* **112**, 151–159.
- Drriouich A, Durand C, Cannesan M-A, Percoco G, Vicro-Gibouin M.** 2010. Border cells versus border-like cells: are they alike? *Journal of Experimental Botany* **61**, 3827–3831.
- Drriouich A, Follet-Gueye M-L, Vicro-Gibouin M, Hawes M.** 2013. Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 489–495.
- Egelund J, Obel N, Ulvskov P, Geshi N, Pauly M, Bacic A, Petersen BL.** 2007. Molecular characterization of two *Arabidopsis thaliana* glycosyltransferase mutants, *rra1* and *rra2*, which have a reduced residual arabinose content in a polymer tightly associated with the cellulosic wall residue. *Plant Molecular Biology* **64**, 439–451.
- Esquerré-Tugayé M-T, Lafitte C, Mazau D, Toppan A, Touzé A.** 1979. Cell surfaces in plant-microorganism interactions II. Evidence for the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. *Plant Physiology* **64**, 320–326.
- Esquerré-Tugayé M-T, Mazau D.** 1974. Effect of a fungal disease on extensin, the plant cell wall glycoprotein. *Journal of Experimental Botany* **25**, 509–513.
- Fan C, Li Y, Hu Z, et al.** 2017. Ectopic expression of a novel *OsExtensin-like* gene consistently enhances plant lodging resistance by regulating cell elongation and cell wall thickening in rice. *Plant Biotechnology Journal*.
- Feng T, Nyffenegger C, Højrup P, Vidal-Melgosa S, Yan K-P, Fangel JU, Meyer AS, Kirpekar F, Willats WG, Mikkelsen JD.** 2014. Characterization of an extensin-modifying metalloprotease: N-terminal processing and substrate cleavage pattern of *Pectobacterium carotovorum* Prt1. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**, 10077–10089.
- Fernandes JC, Goulao LF, Amâncio S.** 2016. Immunolocalization of cell wall polymers in grapevine (*Vitis vinifera*) internodes under nitrogen, phosphorus or sulfur deficiency. *Journal of Plant Research* **129**, 1151–1163.
- Fragkostefanakis S, Sedeek KEM, Raad M, Zaki MS, Kalaitzis P.** 2014. Virus induced gene silencing of three putative prolyl 4-hydroxylases enhances plant growth in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Molecular Biology* **85**, 459–471.
- Gille S, Hänsel U, Ziemann M, Pauly M.** 2009. Identification of plant cell wall mutants by means of a forward chemical genetic approach using hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 14699–14704.

**Hall Q, Cannon MC.** 2002. The cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein RSH is essential for normal embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**, 1161–1172.

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

**Held MA, Tan L, Kamyab A, Hare M, Shpak E, Kieliszewski MJ.** 2004. Di-isodityrosine is the intermolecular cross-link of isodityrosine-rich extensin analogs cross-linked *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 55474–55482.

**Herrmann A, König S, Lechtenberg M, Sehlbach M, Vakhrushev SY, Peter-Katalinic J, Hensel A.** 2012. Proteoglycans from *Boswellia serrata* Roxb. and *B. carteri* Birdw. and identification of a proteolytic plant basic secretory protein. *Glycobiology* **22**, 1424–1439.

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

**Hirao T, Fukatsu E, Watanabe A.** 2012. Characterization of resistance to pine wood nematode infection in *Pinus thunbergii* using suppression subtractive hybridization. *BMC plant biology* **12**, 1.

**Immerzeel P, Eppink MM, de Vries SC, Schols HA, Voragen AGJ.** 2006. Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins. *Physiologia Plantarum* **128**, 18–28.

**Jackson PAP, Galinha CIR, Pereira CS, Fortunato A, Soares NC, Amancio SBQ, Ricardo CPP.** 2001. Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. *Plant Physiology* **127**, 1065–1076.

**Kawasaki S.** 1989. Extensin secreted into the culture medium by tobacco cells I. Purification and some properties. *Plant and cell physiology* **30**, 259–265.

**Knox JP, Peart J, Neill SJ.** 1995. Identification of novel cell surface epitopes using a leaf epidermal strip assay system. *Planta* **196**, 266–270.

**Koroney AS, Plasson C, Pawlak B, Sidikou R, Driouich A, Menu-Bouaouiche L, Vicré-Gibouin M.** 2016. Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*. *Annals of Botany* **118**, 797–808.

**Kwasniewski M, Janiak A, Mueller-Roeber B, Szarejko I.** 2010. Global analysis of the root hair morphogenesis transcriptome reveals new candidate genes involved in root hair formation in barley. *Journal of Plant Physiology* **167**, 1076–1083.

**Lampart DTA, Kieliszewski MJ, Chen Y, Cannon MC.** 2011. Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiology* **156**, 11–19.

**Leroux O, Knox JP, Masschaele B, Bagniewska-Zadworna A, Marcus SE, Claeys M, van Hoorebeke L, Viane RLL.** 2011. An extensin-rich matrix lines the carinal canals in *Equisetum ramosissimum*, which may function as water-conducting channels. *Annals of Botany* **108**, 307–319.

**Liu X, Wolfe R, Welch LR, Domozych DS, Popper ZA, Showalter AM.** 2016. Bioinformatic identification and analysis of extensins in the plant kingdom. *PLoS ONE* **11**, e0150177.

**MacDougall AJ, Brett GM, Morris VJ, Rigby NM, Ridout MJ, Ring SG.** 2001. The effect of peptide–pectin interactions on the gelation behaviour of a plant cell wall pectin. *Carbohydrate Research* **335**, 115–126.

**Merkouropoulos G, Barnett DC, Shirsat AH.** 1999. The Arabidopsis extensin gene is developmentally regulated, is induced by wounding, methyl jasmonate, abscisic and salicylic acid, and codes for a protein with unusual motifs. *Planta* **208**, 212–219.

**Merkouropoulos G, Shirsat AH.** 2003. The unusual Arabidopsis extensin gene *atExt1* is expressed throughout plant development and is induced by a variety of biotic and abiotic stresses. *Planta* **217**, 356–366.

**Møller SR, Yi X, Velásquez SM, et al.** 2017. Identification and evolution of a plant cell wall specific glycoprotein glycosyl transferase, ExAD. *Scientific Reports* **7**, 45341.

**Mravec J, Guo X, Hansen AR, et al.** 2017. Pea border cell maturation and release involve complex cell wall structural dynamics. *Plant Physiology* **174**, 1051–1066.

**Nejat N, Vadamalai G, Dickinson M.** 2012. Expression patterns of genes involved in the defense and stress response of *Spiroplasma citri* infected Madagascar periwinkle *Catharanthus roseus*. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 2301–2313.

**Neubauer JD, Lulai EC, Thompson AL, Suttle JC, Bolton MD.** 2012. Wounding coordinately induces cell wall protein, cell cycle and pectin methyl esterase genes involved in tuber closing layer and wound periderm development. *Journal of Plant Physiology* **169**, 586–595.

**Neumetzler L, Humphrey T, Lumba S, et al.** 2012. The *FRIABLE1* gene product affects cell adhesion in Arabidopsis. *PLoS ONE* **7**, e42914.

**Nguema-Ona E, Vitré-Gibouin M, Cannesan M-A, Driouich A.** 2013. Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions. *Trends in Plant Science* **18**, 440–449.

**Niebel A, Engler JDA, Tire C, Engler G, Van Montagu M, Gheysen G.** 1993. Induction patterns of an extensin gene in tobacco upon nematode infection. *The Plant Cell* **5**, 1697–1710.

**Nuñez A, Fishman ML, Fortis LL, Cooke PH, Hotchkiss AT.** 2009. Identification of extensin protein associated with sugar beet pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 10951–10958.



- Ogawa-Ohnishi M, Matsushita W, Matsubayashi Y.** 2013. Identification of three hydroxyproline *O*-arabinosyltransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology* **9**, 726–730.
- O’Neill MA, Eberhard S, Albersheim P, Darvill AG.** 2001. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan ii for *Arabidopsis* growth. *Science* **294**, 846–849.
- Oosterveld A, Voragen AG, Schols HA.** 2002. Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. *Carbohydrate Polymers* **49**, 407–413.
- Pattathil S, Avci U, Baldwin D, et al.** 2010. A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. *Plant Physiology* **153**, 514–525.
- Pereira CS, Ribeiro JM, Vatulescu AD, Findlay K, MacDougall AJ, Jackson PA.** 2011. Extensin network formation in *Vitis vinifera* callus cells is an essential and causal event in rapid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced reduction in primary cell wall hydration. *BMC plant biology* **11**, 1.
- Plancot B, Santaella C, Jaber R, Kiefer-Meyer MC, Follet-Gueye M-L, Leprince J, Gattin I, Souc C, Driouich A, Vire-Gibouin M.** 2013. Deciphering the responses of root border-like cells of *Arabidopsis* and flax to pathogen-derived elicitors. *Plant Physiology* **163**, 1584–1597.
- Price NJ, Pinheiro C, Soares CM, Ashford DA, Ricardo CP, Jackson PA.** 2003. A biochemical and molecular characterization of LEP1, an extensin peroxidase from lupin. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 41389–41399.
- Rashid A.** 2016. Defense responses of plant cell wall non-catalytic proteins against pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **94**, 38–46.
- Reguera M, Abreu I, Brewin NJ, Bonilla I, Bolaños L.** 2010. Borate promotes the formation of a complex between legume AGP-extensin and Rhamnogalacturonan II and enhances production of *Rhizobium* capsular polysaccharide during infection thread development in *Pisum sativum* symbiotic root nodules: Boron mediated legume-*Rhizobium* cell surface interactions. *Plant, Cell & Environment* **33**, 2112–2120.
- Ribeiro JM, Pereira CS, Soares NC, Vieira AM, Feijó JA, Jackson PA.** 2006. The contribution of extensin network formation to rapid, hydrogen peroxide-mediated increases in grapevine callus wall resistance to fungal lytic enzymes. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2025–2035.
- Ringli C.** 2010. The hydroxyproline-rich glycoprotein domain of the *Arabidopsis* LRX1 requires Tyr for function but not for insolubilization in the cell wall: Characterization of the LRX1 extensin domain. *The Plant Journal* **63**, 662–669.
- Saito F, Suyama A, Oka T, Yoko-o T, Matsuoka K, Jigami Y, Shimma Y.** 2014. Identification of novel peptidyl serine  $\alpha$ -galactosyltransferase gene family in plants. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 20405–20420.

- Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizedeh H, Lamport D.** 1996. Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val—Tyr—Lys as putative intermolecular cross-link site. *The Plant Journal* **9**, 477–489.
- Shailasree S, Kini KR, Deepak S, Kumudini BS, Shetty HS.** 2004. Accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in pearl millet seedlings in response to *Sclerospora graminicola* infection. *Plant Science* **167**, 1227–1234.
- Shetty NP, Jensen JD, Knudsen A, Finnie C, Geshi N, Blennow A, Collinge DB, Jorgensen HJL.** 2009. Effects of -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4287–4300.
- Showalter AM, Bell JN, Cramer CL, Bailey JA, Varner JE, Lamb CJ.** 1985. Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 6551–6555.
- Showalter AM, Keppler BD, Liu X, Lichtenberg J, Welch LR.** 2016. Bioinformatic identification and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology* **16**, 229.
- Smallwood M, Beven A, Donovan N, Neill SJ, Peart J, Roberts K, Knox JP.** 1994. Localization of cell wall proteins in relation to developmental anatomy of the carrot root apex. *The Plant Journal* **5**, 237–246.
- Smallwood M, Martin H, Knox JP.** 1995. An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma-membrane glycoproteins. *Planta* **196**, 510–522.
- Smith JJ, Muldoon EP, Willard JJ, Lamport DT.** 1986. Tomato extensin precursors P1 and P2 are highly periodic structures. *Phytochemistry* **25**, 1021–1030.
- Striberny B, Krause K.** 2015. Cell wall glycoproteins at interaction sites between parasitic giant dodder (*Cuscuta reflexa*) and its host *Pelargonium zonale*. *Plant Signaling & Behavior* **10**, e1086858.
- Sujeeth N, Deepak S, Shailasree S, Kini RK, Shetty SH, Hille J.** 2010. Hydroxyproline-rich glycoproteins accumulate in pearl millet after seed treatment with elicitors of defense responses against *Sclerospora graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **74**, 230–237.
- Sujkowska-Rybkowska M, Borucki W.** 2014. Accumulation and localization of extensin protein in apoplast of pea root nodule under aluminum stress. *Micron* **67**, 10–19.
- Valentin R, Cerclier C, Geneix N, Aguié-Béghin V, Gaillard C, Ralet M-C, Cathala B.** 2010. Elaboration of extensin–pectin thin film model of primary plant cell wall. *Langmuir* **26**, 9891–9898.

**VandenBosch KA, Bradley DJ, Knox JP, Perotto S, Butcher GW, Brewin NJ.** 1989. Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *The EMBO Journal* **8**, 335–341.

**Velasquez SM, Marzol E, Borassi C, et al.** 2015. Low sugar is not always good: impact of specific O-glycan defects on tip growth in Arabidopsis. *Plant Physiology* **168**, 808–813.

**Velasquez SM, Ricardi MM, Dorosz JG, et al.** 2011. O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science* **332**, 1401–1403.

**Velasquez M, Salter JS, Dorosz JG, Petersen BL, Estevez JM.** 2012. Recent advances on the posttranslational modifications of EXTs and their roles in plant cell walls. *Frontiers in plant science* **3**, 93.

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

**Wang M, Heimovaara-Dijkstra S, Meulen RM, Knox JP, Neill SJ.** 1995. The monoclonal antibody JIM19 modulates abscisic acid action in barley aleurone protoplasts. *Planta* **196**, 271–276.

**Wei G, Shirsat AH.** 2006. Extensin over-expression in Arabidopsis limits pathogen invasiveness. *Molecular Plant Pathology* **7**, 579–592.

**Weiller F, Moore JP, Young P, Driouich A, Vivier MA.** 2016. The Brassicaceae species *Heliophila coronopifolia* produces root border-like cells that protect the root tip and secrete defensin peptides. *Annals of Botany* **119**, 803–813.

**Wen F, VanEtten HD, Tsapralis G, Hawes MC.** 2007. Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. *Plant Physiology* **143**, 773–783.

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

**Widman N, Feng S, Jacobsen SE, Pellegrini M.** 2014. Epigenetic differences between shoots and roots in Arabidopsis reveals tissue-specific regulation. *Epigenetics* **9**, 236–242.

**Wu Y, Fan W, Li X, et al.** 2017. Expression and distribution of extensins and AGPs in susceptible and resistant banana cultivars in response to wounding and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports* **7**, 42400.

**Xie D, Ma L, Šamaj J, Xu C.** 2011. Immunohistochemical analysis of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins in the roots of resistant and susceptible wax gourd cultivars in response to

*Fusarium oxysporum* f. sp. *Benincasae* infection and fusaric acid treatment. *Plant Cell Reports* **30**, 1555–1569.

**Xie F, Williams A, Edwards A, Downie JA.** 2012. A plant arabinogalactan-like glycoprotein promotes a novel type of polar surface attachment by *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 250–258.

**Xu C, Takáč T, Burbach C, Menzel D, Šamaj J.** 2011. Developmental localization and the role of hydroxyproline rich glycoproteins during somatic embryogenesis of banana (*Musa* spp. AAA). *BMC plant biology* **11**.

**York LM, Carminati A, Mooney SJ, Ritz K, Bennett MJ.** 2016. The holistic rhizosphere: integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots. *Journal of Experimental Botany* **67**, 3629–3643.

**Yoshida Y, Aoki C, Iuchi S, Nanjo T, Seki M, Sekiguchi F, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2001. Characterization of four extensin genes in *Arabidopsis thaliana* by differential gene expression under stress and non-stress conditions. *DNA research* **8**, 115–122.

**Yu L, Zhou Y, Knox JP.** 2011. Ginseng root water-extracted pectic polysaccharides originate from secretory cavities. *Planta* **234**, 487–499.

**Zagorchev L, Odjakova M.** 2011. Hydroxyproline rich proteins in salt adapted embryogenic suspension cultures of *Dactylis Glomerata* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **25**, 2321–2328.

**Zhang X, Ma H, Qi H, Zhao J.** 2014. Roles of hydroxyproline-rich glycoproteins in the pollen tube and style cell growth of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Plant Physiology* **171**, 1036–1045.

**Zhang C, Pan S, Chen H, Cai T, Zhuang C, Deng Y, Zhuang Y, Zeng Y, Chen S, Zhuang W.** 2016. Characterization of *NtREL1*, a novel root-specific gene from tobacco, and upstream promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts. *Plant Cell Reports* **35**, 757–769.

**Zhang X, Ren Y, Zhao J.** 2008. Roles of extensins in cotyledon primordium formation and shoot apical meristem activity in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Experimental Botany* **59**, 4045–4058.

**Table 1: Overview of the occurrence of extensins and/or extensin epitopes amongst different plant species.**

Species	Tissues	Antibodies/GUS	Biochemistry	Molecular biology	References
<i>Allium cepa</i>	Roots	JIM11, JIM12, JIM20			(Casero <i>et al.</i> , 1998)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2-, 4-week-old rosette leaves, mature roots			Northern blot	(Merkouropoulos <i>et al.</i> , 1999)
	Roots, stem, leaves			Northern blot	(Yoshida <i>et al.</i> , 2001)
	Root tip, border-like cells	LM1			(Plancot <i>et al.</i> , 2013)
	Roots	GUS analysis		Northern blot	(Baumberger <i>et al.</i> , 2001, 2003)
	Embryos, roots, nodes, siliques	GUS analysis, GFP construct		Northern blot	(Hall and Cannon, 2002)
	Whole plant	JIM11, JIM20, LM3			(Feng <i>et al.</i> , 2014)
<i>Benincasa hispida</i>	Roots	JIM11, JIM20			(Xie <i>et al.</i> , 2011)
<i>Boswellia</i> spp.	Root oleogum		Proteoglycan purification and characterization		(Herrmann <i>et al.</i> , 2012)
<i>Brachypodium distachyon</i>	Embryogenic callus	JIM11, JIM12			(Betekhtin <i>et al.</i> , 2016)
<i>Buxus sempervirens</i>	Whole plant	JIM11, JIM12, JIM20, LM3			(Feng <i>et al.</i> , 2014)
<i>Catharanthus roseus</i>	Leaves			qRT-PCR	(Nejat <i>et al.</i> , 2012)
<i>Cuscuta reflexa</i>	Haustorium	JIM11, JIM12, JIM20			(Striberny and Krause, 2015)
<i>Daucus carota</i>	Roots	JIM11, JIM12, JIM19, JIM20			(Smallwood <i>et al.</i> , 1994; Casero <i>et al.</i> , 1998)
<i>Equisetum ramosissimum</i>	Internodes	LM1, JIM20			(Leroux <i>et al.</i> , 2011)
<i>Glycine max</i>	Hypocotyls, roots			RNA slot blot	(Ahn <i>et al.</i> , 1996)
	Seed coats		Hydroxyproline-arabinosides detection		(Cassab <i>et al.</i> , 1985)
<i>Hordeum vulgare</i>	Roots			Sequencing, homology analyses and qRT-PCR	(Kwasniewski <i>et al.</i> , 2010)
<i>Linum usitatissimum</i>	Border-like cells	LM1			(Plancot <i>et al.</i> , 2013)
<i>Musa</i> spp. AAA	Embryogenic cells	JIM11, JIM20			(Xu <i>et al.</i> , 2011)
	Roots				(Wu <i>et al.</i> , 2017)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Roots	11D2		RNA gel blot analysis	(Niebel <i>et al.</i> , 1993)
	Roots	GUS		Microarray	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
	Embryos	JIM11, JIM20			(Zhang <i>et al.</i> , 2008)

	Stigma, style ovary	JIM11, JIM12, JIM20			(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
<i>Panax ginseng</i>	Roots	LM1, JIM20			(Yu <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pelargonium zonale</i>	Stem	JIM11, JIM12, JIM20			(Striberny and Krause, 2015)
<i>Pinus thunbergii</i>	Stem tissue			Sequencing, homology analyses and qRT-PCR	(Hirao <i>et al.</i> , 2012)
<i>Pisum sativum</i>	Nodules	LM1			(Sujkowska-Rybkowska and Borucki, 2014)
	Roots, border cells	LM1, LM3, JIM20			(Mravec <i>et al.</i> , 2017)
	Roots	JIM11, JIM12, JIM19, JIM20			(Casero <i>et al.</i> , 1998)
<i>Populus trichocarpa</i>				Bioinformatics approach	(Showalter <i>et al.</i> , 2016)
<i>Oryza sativa</i>	Roots, stem, leaves			Microarray analysis	(Fan <i>et al.</i> , 2017)
	Callus	JIM19, JIM20			(Desikan <i>et al.</i> , 1999)
<i>Raphanus sativus</i>	Roots	JIM11, JIM12, JIM19, JIM20			(Casero <i>et al.</i> , 1998)
<i>Solanum lycopersicum</i>	Root hair			RNA blot	(Bucher <i>et al.</i> , 1997)
	Shoots, roots	JIM11			(Fragkostefanakis <i>et al.</i> , 2014)
	Whole plant	JIM11, JIM20, LM3			(Feng <i>et al.</i> , 2014)
<i>Solanum tuberosum</i>	Exudates from tubers			qRT-PCR	(Neubauer <i>et al.</i> , 2012)
	Root exudates	JIM11			(Koroney <i>et al.</i> , 2016)
<i>Taiwania cryptomerioides</i>	Whole plant	JIM11, JIM20, LM3			(Feng <i>et al.</i> , 2014)
<i>Triticum aestivum</i>	Leaves	LM1			(Shetty <i>et al.</i> , 2009)
<i>Viscum album</i>	Whole plant	JIM11, JIM12, JIM20, LM3			(Feng <i>et al.</i> , 2014)
<i>Vitis vinifera</i>	Callus cells and culture media		Extraction of extensin-enriched fraction and purification		(Jackson <i>et al.</i> , 2001)
	Callus cells	JIM11, JIM12	Extensin quantification		(Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)
	Callus, epicotyls, roots	JIM11			(Pereira <i>et al.</i> , 2011)
	Internodes	LM1			(Fernandes <i>et al.</i> , 2016)

**Table 2: Involvement of extensins in plant interactions.**

Interaction	Host plant	Interacting organism/elicitor	Extensin involvement	References
Plant parasitism	<i>Pelargonium zonale</i>	<i>Cuscuta reflexa</i>	JIM11, JIM12 and JIM20 epitopes within the infection area	(Striberny and Krause, 2015)
Symbiosis	<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	LM1 epitopes in nodules	(Sujkowska-Rybkowska and Borucki, 2014)
			Stronger label with MAC265 in infected nodules	(Reguera <i>et al.</i> , 2010)
Pathogen (bacteria)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Overexpressed extensin gene limits the spread of the pathogen	(Wei and Shirsat, 2006)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	Induction of extensin gene expression	(Merkouropoulos and Shirsat, 2003)
	<i>Brassica campestris</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	Induction of JIM11 epitopes	(Davies <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Spiroplasma citri</i>	Increase of extensin transcripts	(Nejat <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Increase of extensin transcripts	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Reduction of symptoms after overexpression of an extensin-like protein	(Balaji and Smart, 2012)
Pathogen (fungi)	<i>Benincasa hispida</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Redistribution of JIM11 and JIM20 epitopes	(Xie <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Cucumis melo</i>	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Increase of hydroxyproline tetra- and tri-arabinosides	(Esquerré-Tugayé and Mazau, 1974)
	<i>Musa spp. AAA</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Redistribution of JIM11 and JIM20 epitopes	(Wu <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Increase of likely-extensin HRGP transcript	(Showalter <i>et al.</i> , 1985)
	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Septoria tritici</i>	Stronger label with LM1	(Shetty <i>et al.</i> , 2009)
Pathogen (nematode)	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Meloidogyne javanica</i>	Increase of extensin transcripts	(Niebel <i>et al.</i> , 1993)
	<i>Pinus thunbergii</i>	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Increase of extensin transcripts	(Hirao <i>et al.</i> , 2012)
Pathogen (oomycete)	<i>Penissetum glaucum</i>	<i>Sclerospora graminicola</i>	Stronger label with MAC265 and increase of isodityrosine cross-linking	(Shailasree <i>et al.</i> , 2004; Deepak <i>et al.</i> , 2007)
Elicitor (bacteria)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Flagellin 22	Redistribution of LM1 epitopes	(Plancot <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Linum usitatissimum</i>	Flagellin 22	Redistribution of LM1 epitopes	(Plancot <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Solanum tuberosum</i>	Preparation from <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Induction of LM1 epitopes	(Koroney <i>et al.</i> , 2016)
Elicitor (fungi)	<i>Benincasa hispida</i>	Fusaric acid	Redistribution of JIM11 and JIM20 epitopes	(Xie <i>et al.</i> , 2011)
Elicitor (bacteria, fungi)	<i>Pennisetum glaucum</i>	UOMSAR 14, chitosan	Stronger label with MAC265	(Sujeeth <i>et al.</i> , 2010)
Elicitor (fungi, yeast, oomycete)	<i>Vitis vinifera</i>	Chitin, yeast extract, glucan from <i>Phytophthora megasperma</i> mycelial walls	Insolubilization of extensins	(Jackson <i>et al.</i> , 2001)

**Fig. 1: Localization of epitopes recognised by the anti-extensin monoclonal antibodies LM1, JIM11, JIM12, JIM19 and JIM20.**

A

### Presence of LM1 epitopes

Organ/cell type	Plant species	Reference
Leaves	<i>Triticum aestivum</i>	Shetty <i>et al.</i> , 2009
Internodes	<i>Vitis vinifera</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2016
	<i>Equisetum ramosissimum</i>	Leroux <i>et al.</i> , 2011
Root	<i>Pisum sativum</i>	Mravec <i>et al.</i> , 2017
		Sujkowska-Rybkowska & Borucki, 2014
Border cells	<i>Solanum tuberosum</i>	Koroney <i>et al.</i> , 2016
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plancot <i>et al.</i> , 2013
	<i>Linum usitatissimum</i>	Plancot <i>et al.</i> , 2013
	<i>Pisum sativum</i>	Mravec <i>et al.</i> , 2017
Root mucilage	<i>Solanum tuberosum</i>	Koroney <i>et al.</i> , 2016
Root exudates	<i>Solanum tuberosum</i>	Koroney <i>et al.</i> , 2016

### Absence of LM1 epitopes

Organ/cell type	Plant species	Reference
Callus	<i>Brachypodium distachyon</i>	Betekhtin <i>et al.</i> , 2016
Secondary xylem	<i>Acer</i> sp.	Klepsch <i>et al.</i> , 2016
Root	<i>Benincasa hispida</i>	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Panax ginseng</i>	Yu <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wu <i>et al.</i> , 2017

### Modification after treatment/stress/infection

Organ/cell type	Plant species	Treatment	Epitope response	Reference
Leaves	<i>Triticum aestivum</i>	Infection with <i>Septoria tritici</i>	Slight increase of signal	Shetty <i>et al.</i> , 2009
Root	<i>Pisum sativum</i>	Aluminium stress	Increase of signal	Sujkowska-Rybkowska & Borucki, 2014
	<i>Panax ginseng</i>	Polygalacturonase treatment (release of DAMPs?)	Appearance of signal	Yu <i>et al.</i> , 2011
Border cells	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Flagellin 22 elicitation	Loss of signal	Plancot <i>et al.</i> , 2013
	<i>Linum usitatissimum</i>	Flagellin 22 elicitation	Loss of signal	Plancot <i>et al.</i> , 2013
		Peptidoglycan elicitation	Increase of signal	Plancot <i>et al.</i> , 2013
Root exudates	<i>Solanum tuberosum</i>	Elicitation with <i>Pectobacterium atrosepticum</i> extract	Increase of signal	Koroney <i>et al.</i> , 2016



B

**Presence of JIM11 epitopes**

Organ/cell type	Plant species	Reference
Whole plant	<i>Buxus sempervirens</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Viscum album</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Taiwania cryptomerioides</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
Petioles	<i>Brassica campestris</i>	Davies <i>et al.</i> , 1997
Shoot	<i>Solanum lycopersicum</i>	Fragkostefanakis <i>et al.</i> , 2014
Epicotyl	<i>Vitis vinifera</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2011
Stem	<i>Pelargonium zonale</i>	Striberny & Krause 2015
	<i>Cuscuta reflexa</i>	Striberny & Krause 2015
Root	<i>Solanum lycopersicum</i>	Fragkostefanakis <i>et al.</i> , 2014
	<i>Vitis vinifera</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2011
	<i>Benincasa hispida</i>	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wu <i>et al.</i> , 2017
	<i>Daucus carota</i>	Smallwood <i>et al.</i> , 1994, Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Raphanus sativus</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pisum sativum</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Allium cepa</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
Root exudates	<i>Solanum tuberosum</i>	Koroney <i>et al.</i> , 2016
Embryogenic cells	<i>Musa</i> spp. AAA	Xu <i>et al.</i> , 2011
Stigma, style	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Ovule	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Callus	<i>Brachypodium distachyon</i>	Betekhtin <i>et al.</i> , 2016
	<i>Vitis vinifera</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2011, Ribeiro <i>et al.</i> , 2006

**Absence of JIM11 epitopes**

Organ/cell type	Plant species	Reference
Whole Plant	<i>Gingko biloba</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014

**Modification after treatment/stress/infection**

Organ/cell type	Plant species	Treatment	Epitope response	Reference
Petioles	<i>Brassica campestris</i>	Infection with <i>Xanthomonas campestris</i>	Increase of signal	Davies <i>et al.</i> , 1997
		Abiotic stress	Increase of signal	Davies <i>et al.</i> , 1997
		Inoculation with <i>Escherichia coli</i>	Slight increase of signal	Davies <i>et al.</i> , 1997
Root	<i>Benincasa hispida</i>	Infection with <i>Fusarium oxysporum</i>	Change of signal pattern	Xie <i>et al.</i> , 2011
		Fusaric acid elicitation	Change of signal pattern	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wounding	Increase of signal	Wu <i>et al.</i> , 2017
		Infection with <i>Fusarium oxysporum</i>	Increase of signal	Wu <i>et al.</i> , 2017
Callus	<i>Vitis vinifera</i>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treatment	Increase of signal	Ribeiro <i>et al.</i> , 2006

C

**Presence of JIM12 epitopes**

Organ/cell type	Plant species	Reference
Whole plant	<i>Buxus sempervirens</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Viscum album</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
Petioles	<i>Brassica campestris</i>	Davies <i>et al.</i> , 1997
Stem	<i>Pelargonium zonale</i>	Striberny & Krause 2015
	<i>Cuscuta reflexa</i>	Striberny & Krause 2015
Roots	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Velasquez <i>et al.</i> , 2011
	<i>Daucus carota</i>	Smallwood <i>et al.</i> , 1994, Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Raphanus sativus</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pisum sativum</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Allium cepa</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
Stigma, style	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Callus	<i>Brachypodium distachyon</i>	Betekhtin <i>et al.</i> , 2016
	<i>Vitis vinifera</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2006

**Absence of JIM12 epitopes**

Organ/cell type	Plant species	Reference
Whole Plant	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Taiwania cryptomerioides</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Gingko biloba</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
Root	<i>Benincasa hispida</i>	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wu <i>et al.</i> , 2017
Embryogenic cells	<i>Dactylis glomerata</i>	Zagorchev & Odjakova 2011
Ovule	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2008

**Modification after treatment/stress/infection**

Organ/cell type	Plant species	Treatment	Epitope response	Reference
Petioles	<i>Brassica campestris</i>	Abiotic stress	Increase of signal	Davies <i>et al.</i> , 1997
Embryogenic cells	<i>Dactylis glomerata</i>	Salt stress	Appearance of signal in secretions	Zagorchev & Odjakova 2011

**D****Presence of JIM19 epitopes**

Organ/cell type	Plant species	Reference
Root	<i>Daucus carota</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pisum sativum</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Allium cepa</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
Callus	<i>Oryza sativa</i>	Desikan <i>et al.</i> , 1999

**Absence of JIM19 epitopes**

Organ/cell type	Plant species	Reference
Stem	<i>Pelargonium zonale</i>	Striberny & Krause 2015
	<i>Cuscuta reflexa</i>	Striberny & Krause 2015
Root	<i>Benincasa hispida</i>	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wu <i>et al.</i> , 2017
	<i>Raphanus sativus</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
Ovule	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2008

**Modification after treatment/stress/infection**

No data available

## E

**Presence of JIM20 epitopes**

Organ/cell type	Plant species	Reference
Whole plant	<i>Buxus sempervirens</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Viscum album</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Taiwania cryptomerioides</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
Petioles	<i>Brassica campestris</i>	Davies <i>et al.</i> , 1997
Rosette leaf	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Draeger <i>et al.</i> , 2015
Intrernodes	<i>Equisetum ramosissimum</i>	Leroux <i>et al.</i> , 2011
Stem	<i>Pelargonium zonale</i>	Striberny & Krause 2015
	<i>Cuscuta reflexa</i>	Striberny & Krause 2015
Root	<i>Benincasa hispida</i>	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wu <i>et al.</i> , 2017
	<i>Panax ginseng</i>	Yu <i>et al.</i> , 2011
	<i>Pisum sativum</i>	Mravec <i>et al.</i> , 2017
	<i>Daucus carota</i>	Smallwood <i>et al.</i> , 1994, Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Raphanus sativus</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pisum sativum</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Allium cepa</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
Embryogenic cells	<i>Musa</i> spp. AAA	Xu <i>et al.</i> , 2011
Stigma, style	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Ovule	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Callus	<i>Oryza sativa</i>	Desikan <i>et al.</i> , 1999

**Absence of JIM20 epitopes**

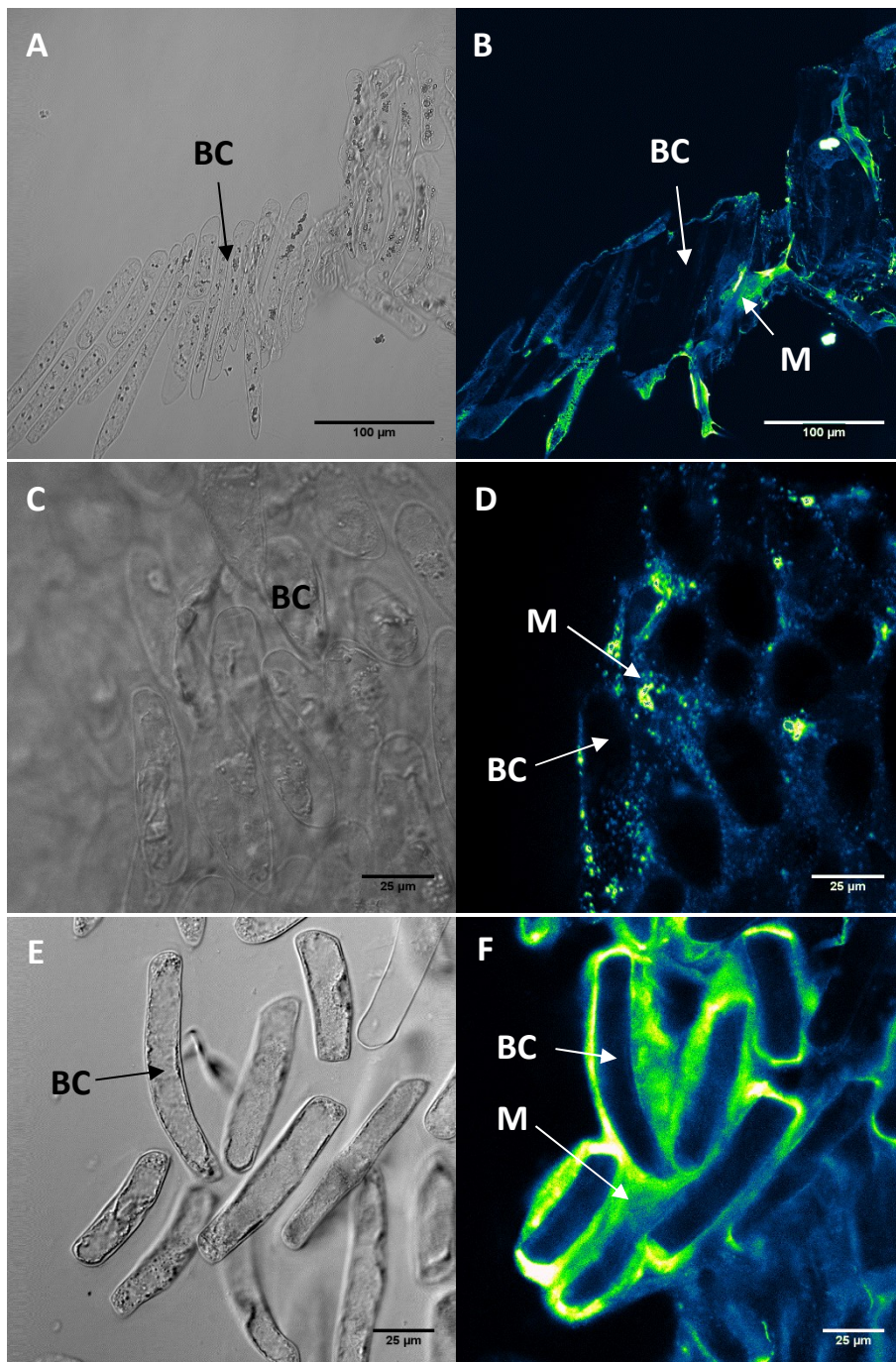
Organ/cell type	Plant species	Reference
Whole Plant	<i>Ginkgo biloba</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
Secondary xylem	<i>Acer</i> sp.	Klepsch <i>et al.</i> , 2016

**Modification after treatment/stress/infection**

Organ/cell type	Plant species	Treatment	Epitope response	Reference
Petioles	<i>Brassica campestris</i>	Abiotic stress	Increase of signal	Davies <i>et al.</i> , 1997
Root	<i>Benincasa hispida</i>	Infection with <i>Fusarium oxysporum</i>	Loss of signal	Xie <i>et al.</i> , 2011
		Fusaric acid elicitation	Loss of signal	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Panax ginseng</i>	Polygalacturonase treatment (release of DAMPs?)	Increase of signal	Yu <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wounding	Increase of signal	Wu <i>et al.</i> , 2017

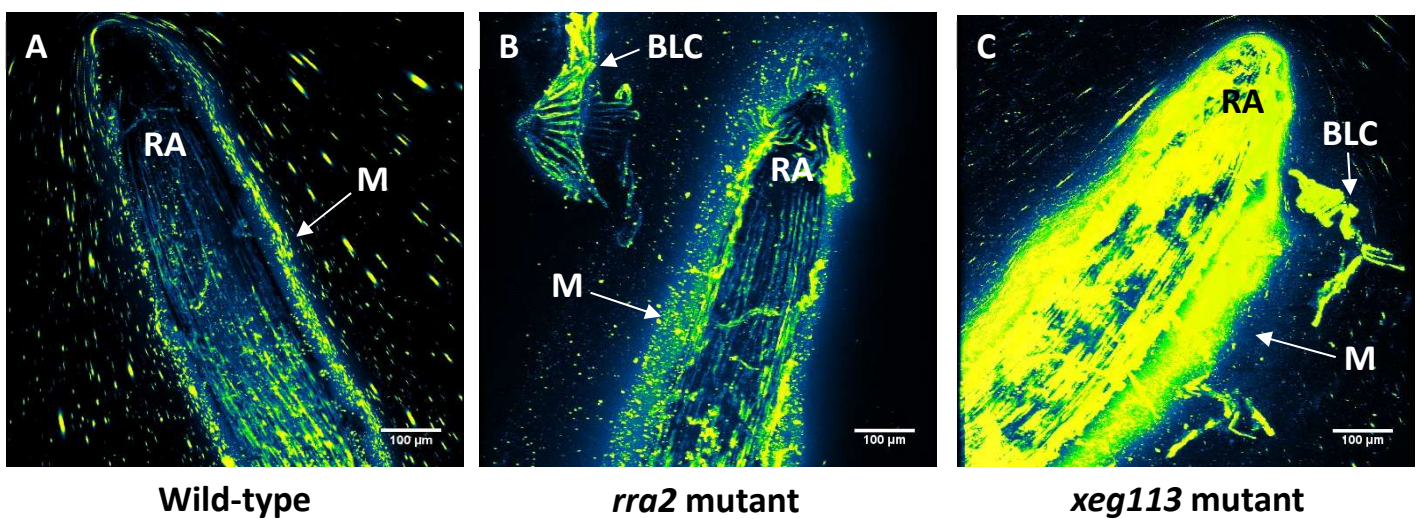
**Fig. 2: Immunolocalization of extensin epitopes in root mucilage.**

Labelling was found in root mucilage using the anti-extensin monoclonal antibody JIM12 in *Glycine max* (A and B) and *Pisum sativum* (pea) (C and D), and LM1 in *Balanites aegyptiaca* (E and F). Observations were made with confocal laser scanning microscope Leica SP2 and SP5 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 500–535 nm). A, C and E: Bright-field microscopy. B: Maximum intensity Z-projection of several focal planes taken in fluorescence. D and F: Fluorescence. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  (A and B), 25  $\mu\text{m}$  (C–F). BC: Border cells. M: Mucilage.



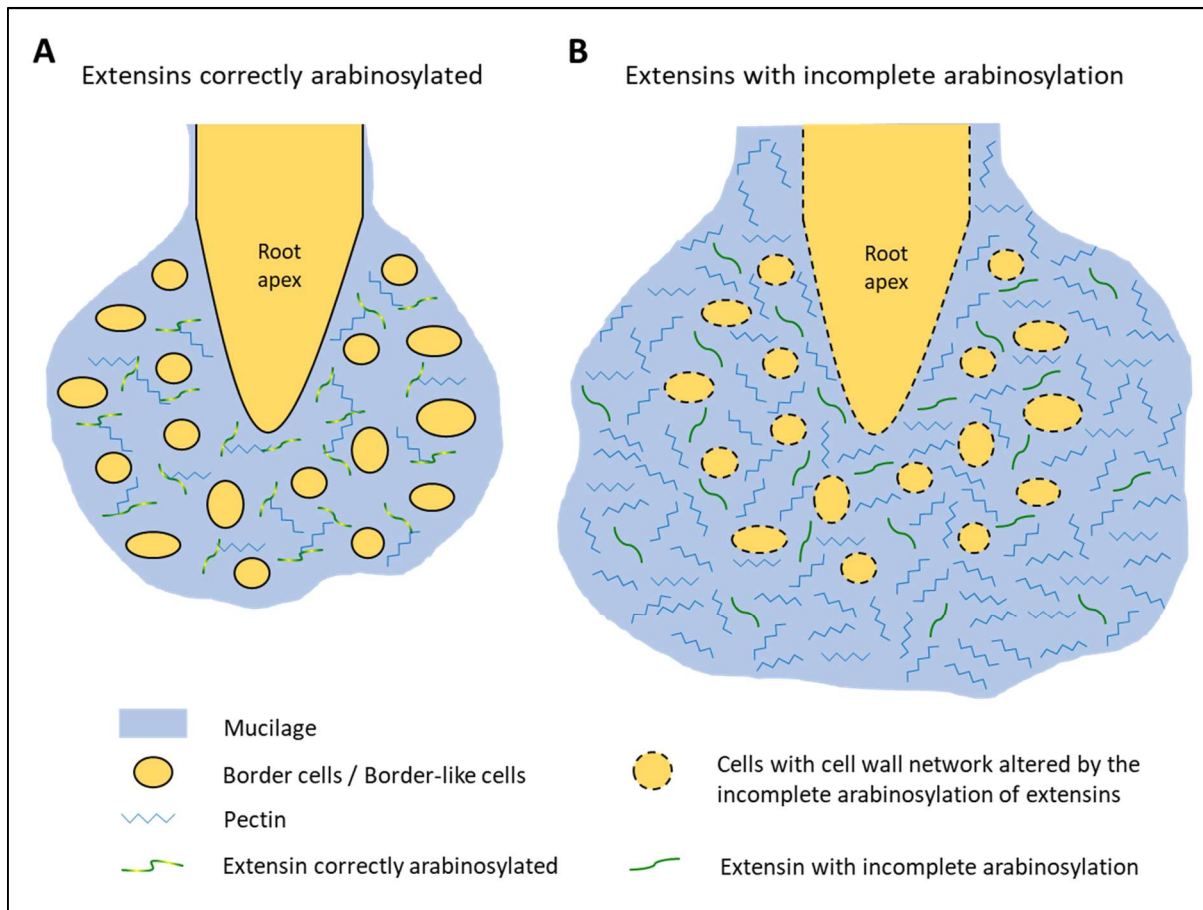
**Fig. 3: Immunolocalization of pectin LM19 epitopes in root mucilage of *A. thaliana* mutants affected in extensin arabinosylation.**

Fluorescence was detected with the LM19 anti-pectin monoclonal antibody along the root of the wild-type (A) and the mutants affected in extensin arabinosylation: *rra2* (B) and *xeg113* (C). The signal is more intense in both mutants, especially in *xeg113*. A halo of mucilage is labelled very slightly around the root in the wild-type whereas it is much more clearly discerned in *rra2* mutant and is strongly immunolabelled in *xeg113* mutant. Images are 3D-reconstructions of 1  $\mu\text{m}$  section stacks and were obtained with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 507 – 550 nm). Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ . RA: Root apex. BLC: Border-like cells. M: Mucilage



**Fig. 4: Model illustrating the impact of extensin arabinosylation in cell wall organization and root secretions.**

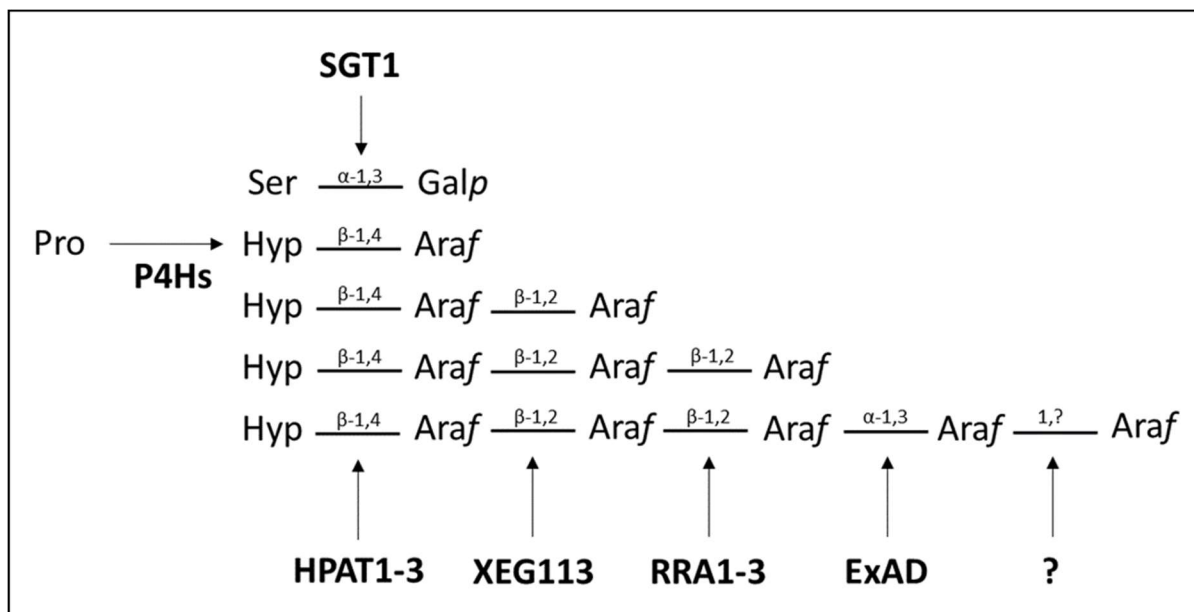
(A) Extensins and pectins are both secreted into the mucilage where they interact similarly to in the cell wall. (B) Abnormal arabinosylation of extensins alters their conformation and cell wall organization, leading to higher secretions and/or a “leak” of pectins into the mucilage. However, it is not certain whether extensin secretion into the mucilage is increased under these conditions.



**Fig. S1: Extensin glycosylation.**

Proline (Pro) residues are first hydroxylated into hydroxyprolines (Hyp). One galactopyranose (Galp) is then transferred on the serine (Ser) residue and several arabinofuranose (Araf) residues are transferred onto the hydroxyproline residues. The type of linkage and the enzymes involved in extensin glycosylation are indicated. P4Hs: Prolyl-4-Hydroxylases; SGT1: Serine-GalactosylTransferase 1; HPAT1-3: HydroxyProline ArabinosylTransferase 1 to 3; XEG113: XyloEndoGlucanase 113; ExAD: Extensin Arabinose Deficient transferase.

This figure is adapted with permission from Velasquez *et al.*, 2012.







## 1.6 Objectifs de thèse

Ce projet de thèse est cofinancé par la région Normandie via la Structure Fédérative de Recherche « Normandie Végétal » (FED 4277) et par le groupe CMI-Roullier. Il vise, entre autres, à caractériser le rôle des extensines dans la défense racinaire en ciblant plus particulièrement la partie glycosylée de ces glycoprotéines.

Les extensines sont des glycoprotéines pariétales de la famille des HRGPs (Hydroxyproline-Rich GlycoProteins) qui interviennent dans différents processus biologiques tels que le développement embryonnaire (Hall & Cannon, 2002; Zhang *et al.*, 2008), l'élongation cellulaire (Velasquez *et al.*, 2011; Nguema-Ona *et al.*, 2014; Velasquez *et al.*, 2015), l'assemblage de la paroi (Cannon *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2011; Lamport *et al.*, 2011; Chormova & Fry, 2016) et la protection de la plante (Deepak *et al.*, 2010; Rashid, 2016). Toutefois, le rôle exact des extensines dans la défense des plantes reste encore à être élucidé, surtout au niveau racinaire (Castilleux *et al.*, en préparation). Les extensines sont supposées être impliquées dans l'immunité végétale en permettant un renforcement de la paroi, laquelle est l'un des premiers remparts cellulaires contre les pathogènes. Ce renforcement se ferait par l'intermédiaire de « cross-linkings » entre les résidus tyrosines des extensines (Smith *et al.*, 1986; Schnabelrauch *et al.*, 1996; Held *et al.*, 2004; Lamport *et al.*, 2011). Il a été montré récemment que la partie glycosylée des extensines était essentielle à ce « cross-linking » en conférant la conformation nécessaire à ces glycoprotéines (Velasquez *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015).

Toutefois, aucun lien direct n'a encore été établi entre la glycosylation des extensines et un potentiel rôle dans la défense. La mise en évidence de ce rôle constitue l'un des objectifs de ce projet et est présenté dans le premier chapitre des résultats. Nous avons, dans un premier temps, étudié l'impact au niveau des extensines d'une élévation d'une racine d'*Arabidopsis thaliana* avec la flagelline 22 à l'aide de différents anticorps reconnaissant spécifiquement des épitopes associés à ces glycoprotéines. Nous avons ensuite sélectionné des mutants d'*Arabidopsis thaliana* présentant une altération au niveau de la glycosylation des extensines. Nous avons ainsi analysé chez ces mutants l'impact d'une élévation avec la flagelline 22 sur la distribution des extensines mais aussi l'interaction de la racine avec l'oomycète tellurique *Phytophthora parasitica*.

D'autres acteurs importants dans le « cross-linking » des extensines sont les peroxydases qui, pour certaines d'entre elles, catalysent spécifiquement cette réaction comme cela a été montré chez la tomate et le lupin (Schnabelrauch *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2015). Néanmoins, aucune isoforme de peroxydases responsable de la réticulation des extensines n'a encore été mise en évidence à ce jour chez *Arabidopsis thaliana*, pourtant plante modèle. Afin de disposer de plus d'outils pour étudier le « cross-linking » des extensines, nous avons sélectionné différents « mutants peroxydases », fournis par le Pr. Christophe Dunand et le Dr. Philippe Ranocha du Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV, UMR 5546-UPS/CNRS) de Toulouse, afin d'essayer de trouver de bons candidats à la catalyse de cette réaction. Cette étude, bien que préliminaire, constitue le second chapitre de résultats.

L'ensemble des résultats obtenus et les perspectives découlant de ce projet sont ensuite discutés en guise de conclusion. Enfin, des travaux méthodologiques réalisés en parallèle au sein du laboratoire sont présentés en annexe.







# Matériels et Méthodes



## 2 Matériel et Méthodes

### 2.1 Matériel végétal

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* (L. Heynh) (*Brassicaceae*) utilisées dans ce projet sont de fond génétique Columbia (Col-0). Les mutants « extensines » ont été obtenus auprès du centre NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) et sont homozygotes (voir **Tableau 1**).

**Tableau 1 : Liste des mutants affectés dans la glycosylation des extensines et utilisés dans ce projet.**

Mutant	Référence du gène	Commentaire	Stock de graines	Référence du mutant	Référence bibliographique
<i>rra1</i>	At1g75120	Arabinosyltransférase transférant le 2 <sup>e</sup> Arabinose sur l'extensine	N668574	SALK_085325C	Egelund et al., 2007
<i>rra2</i>	At1g75110	Arabinosyltransférase transférant le 2 <sup>e</sup> Arabinose sur l'extensine	N672094	SALK_129345C	Egelund et al., 2007
<i>xeg113</i>	At2g35610	Arabinosyltransférase transférant le 3 <sup>e</sup> Arabinose sur l'extensine	N662800	SALK_066991C	Gille et al., 2009
<i>p4h2</i>	At3g06300	Prolyl-4 hydroxylase hydroxylant des Prolines	N679576	SALK_04128C	Tiainen et al., 2005

Les mutants « peroxydases » ont été généreusement fournis par le Pr. Christophe Dunand et le Dr. Philippe Ranocha du Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV, UMR 5546-UPS/CNRS) de Toulouse (voir **Tableau 2**).



**Tableau 2 : Liste des mutants « peroxydases » utilisés dans ce projet.**

Ces mutants ont pour fond génétique Col-0 et ont été généreusement fournis par le Pr. Christophe Dunand et le Dr. Philippe Ranocha du Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV, UMR 5546-UPS/CNRS) de Toulouse.

Mutants	Référence du gène	Commentaire	Référence
<i>p03a</i> et <i>p03b</i>	At1g05260	Induction par le froid. Impliqué dans la réponse à un stress biotique	Francoz et al., 2015
<i>p04a</i> et <i>p04b</i>	At1g14540	Rôle potentiel dans la résistance au pathogène. Mutant plus sensible à <i>Botrytis cinerea</i>	Francoz et al., 2015
<i>p30a</i> et <i>p30b</i>	At3g21770	Impliqué dans la réponse à un stress oxydatif	Francoz et al., 2015
<i>p69a</i> et <i>p69b</i>	At5g64100	Impliqué dans la réponse à un stress oxydatif	Francoz et al., 2015
<i>p53b</i>	At5g06720	Gène surexprimé lors de la réponse à une blessure physique et au nématode <i>Heterodera schachtii</i>	Francoz et al., 2015
<i>p54a</i>	At5g06730	Impliqué dans la réponse à un stress oxydatif	Francoz et al., 2015
<i>OE p53 1.0</i> et <i>OE p53 2.0</i>	At5g06720	Surexprimeur du gène codant pour la peroxydase 53. Graines fournies au Pr. Christophe Dunand par le Pr. Thomas J. Baum (Iowa State University)	Communication C. Dunand
<i>35S:p54a.1</i> et <i>35S:p54a.5</i>	At5g06730	Surexprimeur du gène codant pour la peroxydase 54	Communication C. Dunand
<i>p54a compl 1</i> et <i>p54a compl 6</i>	At5g06730	Mutant <i>p54a</i> complémenté	Communication C. Dunand
<i>ARNi p53 p54</i>	At5g06720, At5g06730	Double mutant	Communication C. Dunand
<i>p33*p34</i>	At3g49110, At3g49120	Double mutant. Rôle dans l'élongation cellulaire et la défense.	Communication C. Dunand

## 2.2 Culture d'*Arabidopsis thaliana* in vitro

### 2.2.1 Stérilisation des graines

Les graines sont préalablement stérilisées sous hotte à flux laminaire dans des microtubes de 1,5 mL en les immergeant pendant 5 minutes dans de l'éthanol 50% (v/v). L'éthanol est ensuite remplacé par une solution d'eau de javel 0,8% (v/v) dans laquelle les graines sont incubées pendant 2 minutes. Enfin, les graines sont rincées six fois avec de l'eau milliQ stérile.

### 2.2.2 Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture est composé de milieu *Arabidopsis* (Duchefa Biochemie no. DU0742.0025) à 11,82 g.L<sup>-1</sup> supplémenté avec du Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> à 2 mM. Le pH du milieu est ajusté

à 5,8 avec du KOH puis le bactoagar est ajouté pour une concentration finale de 1% (m/v). Le milieu est stérilisé à l'autoclave (120°C, 20 minutes, 1 bar).

### 2.2.3 Semis des graines *in vitro*

Après avoir coulé le milieu dans des boîtes de cultures carrées sous hotte à flux laminaire, les graines sont placées sur la gélose à l'aide d'une micropipette p1000. Une fois le semis réalisé, les boîtes sont laissées sous la hotte quelques minutes afin d'évaporer les éventuelles gouttelettes d'eau entourant les graines. Les boîtes sont ensuite scellées avec du sparadrap chirurgical et conservées à 4°C et à l'obscurité pendant 48 heures afin de synchroniser la germination des graines. Enfin, les boîtes sont placées verticalement dans une armoire de culture (22°C, 120  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , photopériode de 16h jour/8h nuit).

## 2.3 Phénotypage racinaire d'*A. thaliana*

### 2.3.1 Mesure de la longueur racinaire

Les racines d'*A. thaliana* de 7 jours sont mesurées à l'aide du logiciel ImageJ à partir de photographies des boîtes de culture.

### 2.3.2 Observation des cellules apparentées aux cellules bordantes (BLCs)

Des plantules de 7 jours sont prélevées et déposées sur une lame de microscope. Une lamelle est alors déposée sur la racine et de l'eau milliRO est ajoutée délicatement par capillarité. L'apex racinaire et les BLCs sont ensuite observés au microscope à épifluorescence droit Leica DMLB, caméra DFC 300FX.

### 2.3.3 Mise en évidence du mucilage

Des plantules de 7 jours sont prélevées et déposées sur une lame de microscope. Une lamelle est alors déposée sur la racine et une solution d'encre de chine (Black Star, Dr. Ph. Martin's) diluée au 500<sup>e</sup> dans de l'eau milliRO est ajoutée délicatement par capillarité. L'apex racinaire et le mucilage sont ensuite observés au microscope à épifluorescence droit Leica DMLB, caméra DFC 300FX.

## 2.4 Elicitation et traitement des racines

### 2.4.1 Elicitation avec la flagelline 22

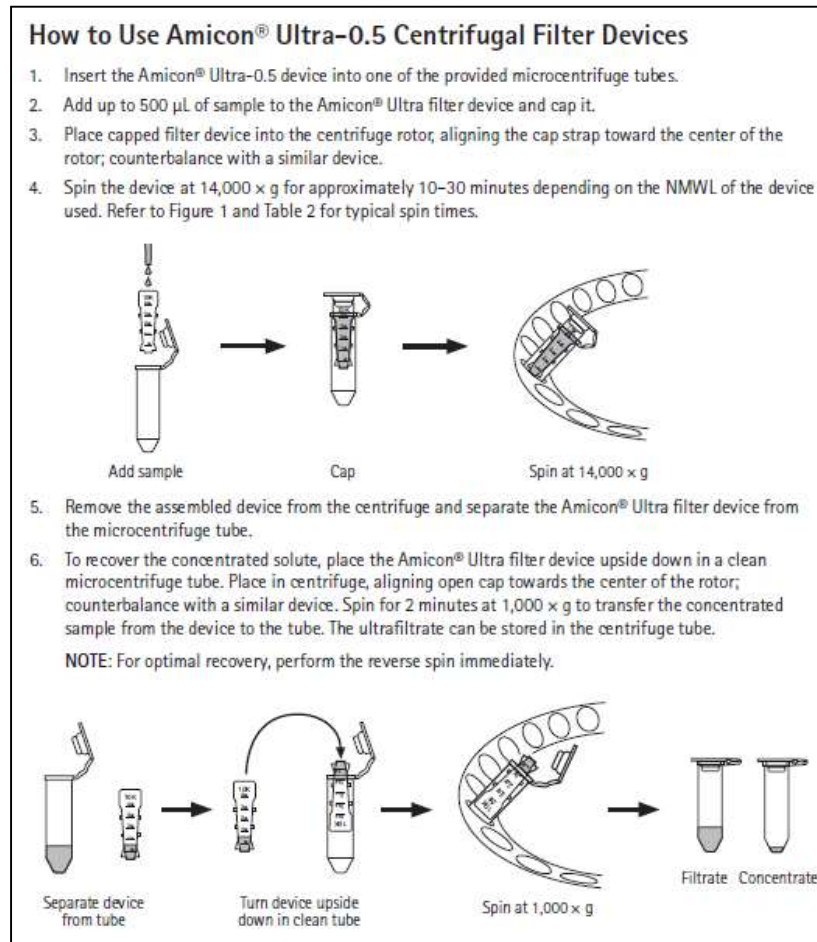
La flagelline 22 a été fournie par le Dr. Jérôme Leprince and Benjamin Lefranc de la plateforme PRIMACEN et aliquotée. Avant l'élicitation, une solution de flagelline 22 est fraîchement diluée à 1  $\mu\text{M}$  dans de l'eau milliQ. Sous hotte à flux laminaire, 10  $\mu\text{L}$  de flagelline 22 à 1  $\mu\text{M}$  sont déposés sur l'apex racinaire directement dans la boîte de culture. Les boîtes sont ensuite fermées et laissées sous la hotte pendant une vingtaine de minutes afin que tout le produit soit absorbé. Les boîtes sont ensuite scellées avec du sparadrap chirurgical et remises verticalement dans l'armoire de culture pendant 48 heures (22°C, 120  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , photopériode de 16h jour/8h nuit).

### 2.4.2 Traitement des racines avec des anticorps monoclonaux anti-extensines

Les anticorps monoclonaux sont préalablement dessalés afin d'enlever l'azide de sodium qui est toxique pour la plante et peut également avoir un impact sur les zoospores de *Phytophthora parasitica*. Pour cela, des tubes pour ultrafiltration Amicon® Ultra 0.5 (Millipore®) avec un seuil de 10 kDa sont utilisés en adaptant le protocole proposé par le fournisseur (voir **Figure 12**). Les tubes sont d'abord nettoyés en ajoutant 200  $\mu\text{L}$  d'eau milliQ et en centrifugeant 10 minutes à 14000g afin d'éliminer les éventuelles traces de glycérine. L'eau éluée est ensuite jetée et 150  $\mu\text{L}$  de l'anticorps à dessaler sont ajoutés sur la membrane dans la colonne. Après une centrifugation pendant 15 minutes à 14000g, le tube collecteur est vidé. Deux lavages successifs sont ensuite réalisés en déposant 450  $\mu\text{L}$  de Phosphate-Buffered Saline (PBS) 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM et de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_{12}$  7 mM, pH : 7,2) sur la membrane et en centrifugeant pendant 15 minutes à 14000g. Enfin, 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1X sont ajoutés sur la membrane puis le dispositif de filtration est placé à l'envers sur un tube collecteur propre (voir **Figure 12**) avant d'être centrifugé une dernière fois pendant 2 minutes à 1300g. Cette dernière centrifugation permet d'éluer l'anticorps dans 100  $\mu\text{L}$  de tampon PBS 1X. La concentration de l'anticorps est ensuite évaluée en utilisant le NanoDrop de la plateforme PRIMACEN.

Les apex racinaires d'*A. thaliana* sont traitées directement dans la boîte de culture avec 10  $\mu\text{L}$  d'anticorps dessalé et dilué à 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans du tampon PBS 1X et laissées incubées

pendant 2 heures à température ambiante. En guise de contrôle, des racines ont aussi été traitées avec du PBS 1X seul et avec du sérum anti-rat dessalé de la même façon que les anticorps et dilué à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans du tampon PBS 1X.



**Figure 12 : Protocole du fournisseur pour l'utilisation des tubes pour ultrafiltration Amicon® Ultra 0.5 (Millipore®)**

## 2.5 Immunolocalisation d'épitopes associés aux extensines et aux pectines

Les pointes racinaires d'*A. thaliana* sont coupées à l'aide d'un scalpel, placées sur une lame 10 puits (Superfrost) et fixées pendant 30 à 40 minutes en ajoutant 20  $\mu\text{L}$  de paraformaldéhyde 4% (v/v) dilué dans du tampon PIPES (acide sulfonique piperazinediethane) 50 mM,  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  1mM, pH 7. La solution est délicatement éliminée en plaçant le cône sur le haut de la pointe racinaire (*i.e.*, pas au niveau de l'apex) pour limiter la perte des BLCs (cellules apparentées aux cellules bordantes). Les pointes racinaires sont lavées cinq fois pendant 5 minutes avec le tampon PIPES 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  1mM, pH 7 puis incubées pendant 30

à 45 minutes dans de l'Albumine de Sérum Bovin (BSA) concentrée à 3% (m/v) dans du tampon PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM et de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (H<sub>2</sub>O)<sub>12</sub> 7 mM, pH : 7,2). Après cinq lavages de 5 minutes avec le tampon PBST (tampon PBS 1X complété avec du Tween 20 0,1% (m/v)), les pointes racinaires sont incubées avec l'anticorps monoclonal primaire (PlantProbes, [www.plantprobes.net](http://www.plantprobes.net)) dilué au cinquième dans du PBST. Cette incubation se déroule sur la nuit, dans une chambre humide et à 4°C. Cinq lavages de 5 minutes sont ensuite réalisés avec du PBST avant d'incuber les pointes racinaires avec l'anticorps secondaire IgG anti-rat couplé au Fluorescéine IsoThioCyanate (FITC) (SIGMA, ref: F6258) dilué au trentième dans le PBST. Cette incubation se déroule pendant 2 heures, dans une chambre humide et à température ambiante. Cinq derniers lavages de 5 minutes au PBST sont ensuite effectués, puis les pointes racinaires sont montées dans un agent « anti-fading » (Citifluor AF2, Agar Scientific) et montées entre lame et lamelle. Les observations sont réalisées au microscope confocal inversé à balayage laser Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{émission}}$  : 507 – 550 nm) sur la plateforme PRIMACEN. La surface de fluorescence est mesurée après avoir ajusté un certain seuil minimal d'intensité, et est rapportée à la surface totale de la racine observée afin de calculer le ratio correspondant. Le seuil minimal d'intensité qui a été ajusté dans ce projet dépend de l'anticorps monoclonal utilisé. Le traitement des images a été réalisé avec le logiciel ImageJ.

## 2.6 *Phytophthora parasitica*

### 2.6.1 Souches de *Phytophthora parasitica*

Deux souches de *Phytophthora parasitica* (Dastur) (Peronosporales) ont été utilisées dans ce projet, 310 et Race 0, et ont été généreusement fournies par le Dr. Agnès Attard de l'institut Sophia Agrobiotech (INRA 1355-CNRS 7254) de Sophia Antipolis. Les protocoles de culture et de production de zoospores présentés par la suite sont adaptés du protocole INRA fourni par le Dr. Agnès Attard.

### 2.6.2 Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour *P. parasitica* est préparé en ajoutant 5 g de CaCO<sub>3</sub> dans 350 mL de V8, un jus de légumes vendu en grandes surfaces. La solution est homogénéisée puis centrifugée pendant 20 minutes à 5000g. Le surnageant est récupéré et dilué au

cinquième dans de l'eau milliRO. Pour le milieu solide, du bactoagar est ajouté à hauteur de 1% (m/v). Le milieu de culture est ensuite stérilisé à l'autoclave (120°C, 20 minutes, 1 bar) puis stocké à 4°C.

Le milieu appauvri est constitué uniquement à partir d'agar (VWR chemicals, MFCD00081288) dilué à 2% (m/v) dans de l'eau milliRO. Ce milieu est ensuite stérilisé à l'autoclave (120°C, 20 minutes, 1 bar).

### 2.6.3 Repiquage en milieu solide

Le repiquage sur milieu solide se fait sous hotte à flux laminaire au moyen d'un simple transfert d'un carré de mycélium issu d'une culture précédente mis en contact avec du milieu V8 solide dans une boîte de Pétri. Le mycélium est prélevé de préférence en périphérie de la culture, là où la celle-ci est la plus jeune. Les boîtes de Pétri sont scellées avec du sparadrap chirurgical puis placées dans une armoire de culture à 25°C et à l'obscurité.

### 2.6.4 Repiquage en milieu liquide

Le repiquage en milieu liquide se fait sous hotte à flux laminaire à partir d'une culture sur milieu V8 solide âgée d'au moins 7 jours. Cinq carrés de mycélium issu d'une culture en milieu solide sont en effet découpés et placés dans une flasque de culture (TPP® Tissue culture flasks 75, dominique Dutscher) contenant environ 30-40 mL de milieu V8 liquide. Là aussi, le mycélium est prélevé de préférence en périphérie de la boîte de Pétri. Les cultures en milieu liquide sont placées dans une armoire de culture à 25°C et en lumière continue.

### 2.6.5 Production de zoospores

A l'aide de deux longues pinces courbes, le mycélium est prélevé sous hotte à flux laminaire à partir de cultures en milieu liquide âgées d'au moins 7 jours et en prenant soin de ne pas récupérer les morceaux de géloses. Toujours à l'aide des pinces, le mycélium est ensuite essoré pour éliminer le V8 liquide excédentaire, puis dilacéré et étalé sous la forme de petits tas sur une boîte de Pétri contenant du milieu appauvri. Les cultures en milieu appauvri sont scellées avec du sparadrap chirurgical et placées dans une armoire de culture à 25°C et en lumière continue pendant au moins 4 jours. Pour la production de zoospores, les boîtes de culture en milieu appauvri sont placées pendant 20 à 30 minutes à 4°C. 10 mL d'eau milliRO stockée à 37 °C sont ajoutés dans les boîtes de culture qui sont ensuite laissées 30

minutes à température ambiante. Les zoospores étant normalement libérées dans l'eau, la solution est récupérée. Une aliquote est collectée pour le dénombrement des zoospores. Pour cela, l'enkystement des zoospores est induit dans l'aliquote en ajoutant quelques gouttes d'acide acétique ou en vortexant pendant 1 à 2 minutes. Le dénombrement est réalisé sur une cellule de Nageotte®.

### 2.6.6 Inoculation de racines d'*A. thaliana* avec des zoospores de *P. parasitica*

Dans une boîte de Pétri ronde, 100  $\mu\text{L}$  contenant  $2 \cdot 10^4$  zoospores sont ajoutés dans 10 mL d'eau milliRO. A l'aide d'une pince, les plantules d'*A. thaliana* sont transférées dans la boîte à raison de 6 plantules par boîte. Les boîtes de Pétri sont ensuite refermées mais non scellées, recouvertes d'aluminium pour les mettre à l'obscurité et laissées à température ambiante pendant 3 heures. Les racines sont ensuite placées sur une lame 10 puits et fixées au paraformaldéhyde 4% (v/v) dilué dans du tampon PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM et de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{H}_2\text{O})_{12}$  7 mM, pH : 7,2) pendant 30 minutes. Après 2 lavages au PBS 1X, les racines sont colorées pendant 3 minutes avec de l'iodure de propidium concentré à 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans du tampon PBS 1X. Un lavage au PBS 1X est encore effectué et la lamelle est ajoutée sur la lame de microscope. Les racines sont ensuite observées au microscope confocal inversé à balayage laser Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$ : 561 nm ;  $\lambda_{\text{émission}}$ : 570-612 nm) sur la plateforme PRIMACEN. Les zoospores accumulées sont comptées dans une zone s'étendant sur 400  $\mu\text{m}$  entre la fin de la zone méristématique et le début de la zone d'élongation de la racine d'*A. thaliana*. Ce comptage est effectué grâce au logiciel IMARIS (BITPLANE) sur la plateforme PRIMACEN.

## 2.7 Extraction des Résidus Insolubles dans l'Alcool (AIR)

Les racines d'*A. thaliana* âgées de 7 jours sont collectées et placées dans des tubes contenant des billes (Lysing Matrix D, MP Biomedicals). Ces tubes sont ensuite plongés dans l'azote liquide afin de fixer l'échantillon. Les échantillons sont ensuite broyés à sec au FastPrep ( $6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , 30 s). 450  $\mu\text{L}$  d'éthanol 70% sont ajoutés dans les tubes et ces derniers sont à nouveau passés au FastPrep ( $6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , 30 s) avant de récupérer la solution dans un tube collecteur de 2 mL. Cette étape est réalisée 4 fois afin de récupérer un maximum d'échantillon broyé dans un volume final de 1,8 mL. Les tubes collecteurs sont ensuite incubés à 70°C pendant au moins

15 minutes afin de précipiter les résidus insolubles dans l'alcool. Après une centrifugation de 10 minutes à 4000g, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans du méthanol : chloroforme (1 : 1, v/v) pendant au moins 2 heures et sous agitation. Après une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 4000g, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans l'acétone pendant au moins 2 heures sous agitation. Une dernière centrifugation de 10 minutes à 4000g est réalisée, le surnageant est éliminé et le culot contenant les AIR est séché sous hotte sur la nuit. Les AIR sont ensuite conservés à température ambiante.

## 2.8 Analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)

### 2.8.1 Dérivation des échantillons

L'analyse en GC-FID nécessite au préalable une dérivation des échantillons. Pour cela, 1 mg d'AIR est pesé dans des « vials » avant d'ajouter 50  $\mu\text{L}$  d'inositol 2 mM servant de standard interne. Après séchage des échantillons sous rampe à air, 250  $\mu\text{L}$  d'acide trifluoroacétique 2 M sont ajoutées et les « vials » sont incubés pendant 2 heures à 110°C. Par la suite, les échantillons sont séchés sous rampe à air, puis lavés avec 500  $\mu\text{L}$  d'isopropanol 50% (v/v) avant d'être à nouveau séchés sous rampe à air puis lyophilisés afin d'éliminer toute trace d'eau. Une fois les échantillons parfaitement secs, 200  $\mu\text{L}$  de Methanolic-HCL 1M sont ajoutés et le tout est incubé sur la nuit à 80°C. Après séchage sous rampe à air, deux lavages avec du méthanol sont effectués avant d'ajouter 200  $\mu\text{L}$  d'une solution d'Hexamethyldisilazane (HMDS) : Trimethylchlorosilane (TCMS) : Pyridine (3 : 1 : 9, Supelco). Les échantillons sont alors incubés pendant 20 minutes à 110°C avant d'être à nouveau séchés sous rampe à air. Un lavage avec 1mL de cyclohexane est réalisé puis les échantillons sont repris dans 1 mL de cyclohexane.

### 2.8.2 Analyse en GC-FID

Les échantillons sont injectés dans l'appareil de GC-FID (3800 GC) équipé d'une colonne CP-Sil5-CB (Agilent Technologies). L'élution est réalisée selon trois gradients de température : de 120°C à 160°C à un rythme de 20°C.min<sup>-1</sup>, de 160°C à 220°C à un rythme de 1,5°C.min<sup>-1</sup> et de 220°C à 280°C à un rythme de 20°C.min<sup>-1</sup>. Chacun des monosaccharides a été identifié et quantifié grâce au standard interne (*i.e.*, l'inositol) et aux courbes de



calibrations réalisées au préalable permettant de déterminer le facteur de réponse pour chaque monosaccharide. La proportion en glucose n'a pas été prise en compte dans l'analyse car celui-ci peut provenir de la paroi cellulaire mais aussi de l'amidon.

## 2.9 Analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)

### 2.9.1 Dérivation des échantillons

L'analyse en GC-MS nécessite au préalable une dérivation des échantillons. Ce protocole est adapté de celui décrit par Glycotechnology Core Resource of San Diego (<http://glycotech.ucsd.edu/protocols>).

2 à 4 mg d'AIR sont placés dans des tubes en verre puis sont mélangés dans 1 mL d'une solution de NaOH diluée dans du DMSO (DiMéthylSulfOxyde). 400 µL de iodométhane sont ajoutés dans les tubes en verre, lesquels sont ensuite fermés, vortexés et incubés pendant 2 heures sur un carrousel à température ambiante. Puis, les tubes sont ouverts, un léger dégagement gazeux devant se faire entendre et la solution devenue blanche et visqueuse. 1 mL d'eau ultrapure est alors ajouté, délicatement car la réaction est exothermique, puis 2 mL de chloroforme sont versés. Les tubes sont ensuite vortexés, remplis jusqu'en haut avec de l'eau milliQ et laissés incubés pendant 1 à 2 heures à 4°C. La phase aqueuse est alors éliminée et les tubes sont à nouveau remplis avec de l'eau milliQ, et vortexés. Cette étape de lavage est réalisée au minimum huit fois. Une fois le dernier lavage terminé, la phase aqueuse est éliminée et les tubes sont séchés sous rampe à air sous la nuit. 500 µL d'acide trifluoroacétique 2 N sont ajoutés et les tubes sont incubés pendant 2 heures à 100°C. Après séchage sous rampe à air, 200 µL d'isopropanol 50% (v/v) sont ajoutés, les tubes sont vortexés et séchés sous rampe à air. Cette étape est réalisée deux fois. Par la suite, 200 µL d'une solution d'hydroxyde ammonium 1 M (Sigma-Aldrich 221228-M), NaBD<sub>4</sub> 170 mM sont ajoutés. Les tubes sont vortexés et incubés sur la nuit à température ambiante. Après ajout de 200 µL d'acide acétique glacial 30% (v/v), les tubes sont séchés sous rampe à air. 200 µL de méthanol sont ensuite versés, les tubes sont vortexés et séchés sous rampe à air. Cette étape est réalisée trois fois. Puis, 200 µL de méthanol : acide acétique glacial (9 : 1, v/v) sont ajoutés, les tubes sont vortexés et séchés sous rampe à air. Cette étape est réalisée trois fois. Après ajout de 200 µL d'une solution de pyridine : anhydride acétique (1 : 1, v/v), les tubes sont vortexés et passés

au sonicateur pendant 30 à 40 secondes. Les tubes sont alors incubés pendant 1 heure à 100°C en vortexant toutes les 15 ou 20 minutes. Après séchage sous rampe à air, 200 µL de toluole sont ajoutés, les tubes sont vortexés et séchés sous rampe à air. Cette étape est réalisée deux fois. Puis, 1 mL de cyclohexane est ajouté, les tubes sont vortexés et passés au sonicateur pendant 30 secondes. Les échantillons sont alors transférés dans des « vials » séchés sous rampe à air. Enfin, 1 mL de cyclohexane est ajouté, les « vials » sont vortexés et passés au sonicateur.

### 2.9.2 Analyse en GC-MS

Les échantillons sont injectés dans un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) couplé à un spectromètre de masse à temps de vol (time of flight, TOF) JEOL GC-AccuTOF (Tokyo, Japan). Les acquisitions et le traitement des données sont effectués au moyen du logiciel Mass Center 3.1. Les séparations chromatographiques sont obtenues à l'aide d'une colonne HP-5MS (30 m, 0.25 mm d.i., 0.25 µm d'épaisseur de film, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium et le débit est de 0.8 mL.min<sup>-1</sup>. La température du four est programmée selon : 100°C (pendant 1 minute), rampe de température de 10°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 160°C, puis 2°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 220°C, rampe de 15°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 280°C (pendant 5 minutes) et dernière rampe (25°C.min<sup>-1</sup>) pour revenir à la température initiale de 100°C. Le temps d'acquisition effective est de 45 minutes. Les températures de l'injecteur et de l'interface sont respectivement de 250°C et 260°C. Le volume d'injection est de 1 µL pour une injection en mode « spitless » à l'aide d'un injecteur Agilent 7693A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Les spectres de masse sous ionisation électronique (*electron ionization*, EI) sont enregistrés en utilisant des électrons de 70 eV, un courant d'émission de 300 µA (consigne) et une tension détecteur de 2200 V. La température de la source est de 250°C. La gamme de masse est  $m/z$  35 - 650. La résolution de l'appareil de masse est de 8000 (FWHM). L'analyse des spectres de masse EI-MS a été réalisée par comparaison des spectres enregistrés avec ceux de banques de données interne et disponible sur <http://www.ccruc.uga.edu/databases/PMAA>.

## 2.10 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) et de R. Le détail de ces analyses sont présentées dans la légende de chaque figure.







# Résultats



## 3 Résultats

### 3.1 Article 2: Extensin arabinosylation involvement in root response to elicitors and pathogenic oomycetes.

Castilleux R, Plancot B, Gügi B, Attard A, Loutelier-Bourhis C, Lefranc B, Nguema-Ona E, Arkoun M, Yvin JC, Driouich A, Vicré M (Soumis) Extensin arabinosylation involvement in root response to elicitors and pathogenic oomycetes.

Article soumis au journal « Plant Physiology » le 5 mars 2018.

Les extensines sont des glycoprotéines appartenant à la famille des HydroxyProline-Rich Glycoproteins (HRGPs) et capables de se lier entre elles via des liaisons isodityrosine, puclherosine et di-isodityrosine (Smith *et al.*, 1986; Schnabelrauch *et al.*, 1996; Held *et al.*, 2004; Lamport *et al.*, 2011). Ce « cross-linking » permettrait de renforcer la paroi, l'une des premières barrières cellulaires contre les pathogènes, et requiert une correcte conformation des extensines qui est conférée par leur partie glycosylée (Velasquez *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). Toutefois, aucun lien direct n'a encore été mis en évidence entre la glycosylation des extensines et la protection racinaire. Dans cet article, nous avons évalué l'importance de la partie glycosylée des extensines dans la défense de la racine.

Nous avons ainsi sélectionné plusieurs mutants d'*Arabidopsis thaliana* dont la glycosylation des extensines est altérée et réalisé des immunomarquages de surface après élicitation à la flagelline 22 en utilisant des anticorps reconnaissant spécifiquement des épitopes associés aux extensines. Par ailleurs, ces mutants ont été inoculés avec des zoospores d'un oomycète tellurique, *Phytophthora parasitica*, afin d'observer la colonisation de la racine.

Nous avons montré qu'une distribution différente des extensines avait lieu au niveau des racines des mutants en réponse à une élicitation à la flagelline 22 par rapport au sauvage et aux racines non élicitées. Nous avons aussi observé une accumulation plus importante de zoospores de *P. parasitica* sur les racines de deux mutants, *rra2* et *xeg113* par rapport au sauvage. Cela suggère que l'arabinosylation des extensines est impliquée, probablement de manière indirecte, dans l'interaction entre la racine et l'oomycète. Nous avons alors proposé



## Résultats

un modèle illustrant l'importance de l'arabinosylation des extensines dans l'organisation et l'architecture de la paroi, modulant ainsi l'adhésion des zoospores sur les cellules de la racine et influençant *in fine* la colonisation de la racine par le pathogène.

1     **Extensin arabinosylation involvement in root response to elicitor**  
2                             **and pathogenic oomycetes.**

3

4 Romain Castilleux<sup>1\*</sup>, Barbara Plancot<sup>1\*</sup>, Bruno Gügi<sup>1</sup>, Agnès Attard<sup>2</sup>, Corinne Loutelier-  
5 Bourhis<sup>3</sup>, Benjamin Lefranc<sup>4</sup>, Eric Nguema-Ona<sup>5</sup>, Mustapha Arkoun<sup>5</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>5</sup>,  
6 Azeddine Driouich<sup>1\*\*</sup> and Maïté Vicré<sup>1\*\*</sup>

7

8

9 <sup>1</sup>Normandie Université, UNIROUEN, Laboratoire Glyco-MEV EA 4358, Fédération de  
10 Recherche "Normandie Végétal" FED 4277, 76000 Rouen, France

11 <sup>2</sup>INRA, CNRS, Université Côte d'Azur, ISA, France

12 <sup>3</sup>IRCOF COBRA, UMR6014 and FR3038, CNRS, Université de Rouen Normandie, 1 rue  
13 Tesnière, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France.

14 <sup>4</sup>INSERM U1239, Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine,  
15 Normandie Université, 76000 Rouen, France

16 <sup>5</sup>Centre Mondial de l'Innovation, Groupe Roullier. 18 Avenue F. Roosevelt, BP80139, 35401  
17 Saint Malo Cédex.

18

19 \* Equal contribution of the first authors.

20 \*\*Equal contribution of the senior authors.

21

22 **Corresponding author:**

23 maite.vicre@univ-rouen.fr

24 +33 235 146 768

25

26

27 **Author Contributions**

28 R.C, B.P, B.G and C.L.B performed experiments and analysed data.

29 B.L, synthesized the flagellin 22 and analysed data.

30 E.N.O, J.C.Y and M.A contributed to planning the research for the project.

31 A.A provided *P. parasitica* and contributed to conducting experiments.

32 A.D and M.V planned, designed the research and analysed data.

33 R.C, A.D and M.V wrote the paper.

34

35 **Word counts:**

36 Abstract: 212 words

37 Main body of the text: 6916 words

38 Introduction: 1331 words

39 Material and Methods: 1727 words

40 Results: 1937 words

41 Discussion: 1777 words

42 Conclusions: 71 words

43 Acknowledgements: 65 words

44

45 Number of figures: 9

46 Figures 2, 4, 5, 6, 8 and 9 are in colour

47 Number of tables: 1

48 Supporting information: 9 figures (S1, S3, S4 and S5 in colour)

49

50 One sentence summary: Glycosylation of cell wall extensin is important in root response to

51 the elicitor Flagellin 22 and impacts the interaction between *Phytophthora parasitica* and

52 *Arabidopsis thaliana*.

53

54 **Abstract:**

55           Extensins are Hydroxyproline-Rich GlycoProteins thought to strengthen the plant cell  
56 wall, one of the first barriers against pathogens, through strong intra- and intermolecular  
57 cross-links. The glycan moiety of extensins is believed to confer the correct structural  
58 conformation of the glycoprotein *in muro*. Extensin glycoproteins show self-assembly within  
59 the cell wall that helps significant limits microbial adherence and invasion. However, this role  
60 is not clearly and firmly established. Here, we have investigated the role of extensin  
61 arabinosylation in root-microbe interactions. We have used *Arabidopsis thaliana* mutants  
62 impaired in extensin arabinosylation and performed immunolabelling with a set of anti-  
63 extensin antibodies of flagellin 22-elicited roots. Mutant and wild-type roots were also  
64 inoculated with a soilborne oomycete *Phytophthora parasitica* to assess the effect of extensin  
65 arabinosylation on root colonization. The data show a differential distribution of extensin  
66 epitopes in wild type plants in response to elicitation. Elicitation also triggers a modulation of  
67 epitope expression in mutant roots as compared to that found in wild-type and non-elicited  
68 conditions. Inoculation with the pathogen *Phytophthora parasitica* resulted in enhanced root  
69 colonization for two mutants, specifically *xeg113* and *rra2*. We provide evidence for a link  
70 between extensin arabinosylation and root defence and we propose a model to explain the  
71 importance of glycosylation in limiting invasion of root cells by pathogens.

72           Keywords: *Arabinosylation, cell wall, defence, extensin, immunocytochemistry,*  
73 *monoclonal antibodies, root*

## 74 **Introduction**

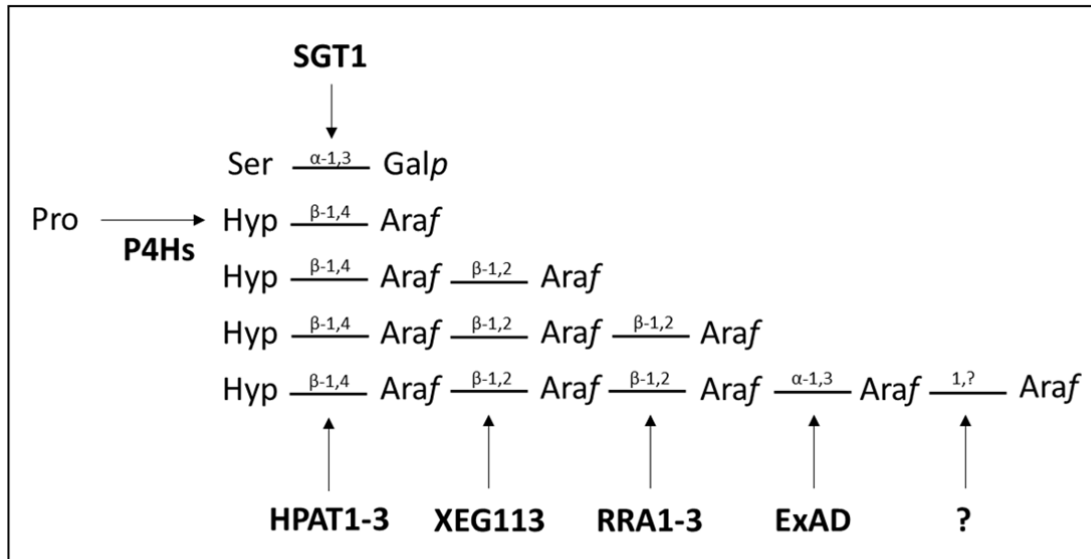
75           Roots are constantly exposed to soilborne pathogens and have developed both  
76 constitutive and inducible defence mechanisms to cope with biotic attacks (Lanoue et al.,  
77 2010a; Lanoue et al., 2010b; Millet et al., 2010; Yu et al., 2017). While the mechanisms  
78 involved in leaf defence have been well studied in the past years, knowledge related to root  
79 immunity has remained relatively limited (Balmer and Mauch-Mani, 2013). Extrapolating  
80 data gained from leaves to the root system should be taken with care since it was shown that  
81 both organs respond differently upon pathogenic attacks on host plants. Organ-specificity was  
82 not only reported for plant-interaction with microorganisms or characteristic symptoms but  
83 also for the production of specific antimicrobial compounds (Millet et al., 2010; Balmer and  
84 Mauch-Mani, 2013). More recently, interest in root defence in response to elicitors or  
85 pathogens has risen (Koroney et al., 2016; Weiller et al., 2016; Wen et al., 2017). In 2010,  
86 Millet *et al.* hypothesized that *Arabidopsis thaliana* root restricts its response to elicitors to  
87 tissues specifically susceptible to pathogen infection. Further evidence showed that the  
88 production of defence metabolites varies depending on the root zone (Wen et al., 2007;  
89 Cannesan et al., 2011). More specifically, root border cells are particularly dedicated to root  
90 defence thus contributing to the protection of the whole plant against pathogens (Wen et al.,  
91 2009; Driouich et al., 2010; Baetz and Martinoia, 2014; Watson et al., 2015; Tran et al.,  
92 2016). Analogy has even been drawn between the immune response of blood mammal cells  
93 and root border cells and their associated mucilage for their capacity to trap and neutralize  
94 pathogen invaders (Driouich et al., 2013; Tran et al., 2016; Wen et al., 2017). Furthermore, it  
95 has been proposed that the root system could act as a reservoir of defence molecules that can  
96 be used for the protection of the aerial part of the plant (Erb et al., 2009; Balmer and Mauch-  
97 Mani, 2013).

98           Inducible defence in *Arabidopsis thaliana* root response to elicitor, such as Flagellin  
99 22 (Flg22), involves the production of reactive oxygen species, pathogenesis-related proteins  
100 and a reinforcement of the cell wall including callose production (Millet et al., 2010; Plancot  
101 et al., 2013). Furthermore, the cell wall proteoglycans ArabinoGalactan Proteins (AGPs)  
102 belonging to the Hydroxyproline-Rich GlycoProtein (HRGP) family are constitutively  
103 enriched in roots of *A. thaliana* as well as in other plant species such as English ivy (*Hedera*  
104 *Helix*), pea (*Pisum sativum*) and rapeseed (*Brassica napus*) (Vicré et al., 2005; Cannesan et  
105 al., 2012; Nguema-Ona et al., 2012; Huang et al., 2016). These cell wall glycomolecules are

106 known to be involved in both beneficial and pathogenic microbe-interactions with the root  
 107 system (Xie et al., 2011; Cannesan et al., 2012; Xie et al., 2012; Beauregard et al., 2013). *In*  
 108 *vitro* assays revealed that AGPs from pea root cap and border cells specifically interfere with  
 109 the development of the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches* (Cannesan et al., 2012).  
 110 In addition, AGPs from *A. thaliana* were found to potentially induce biofilm formation of the  
 111 plant-beneficial bacterium *Bacillus subtilis* (Beauregard et al., 2013). Interestingly, this  
 112 bacterium was recently reported to be attracted by *A. thaliana* exudates (Allard-Massicotte et  
 113 al., 2016). Yet, the presence of AGPs was also detected in the secreted mucilage and root  
 114 exudates of different species (Cannesan et al., 2012; Xie et al., 2012; Koroney et al., 2016).  
 115 The composition of the AGP population from root exudates was found to be modified in  
 116 response to elicitors suggesting their involvement in root immunity (Koroney et al., 2016).

117 Other members of the HRGP family, the cell wall glycoprotein extensins are also  
 118 suspected to be part of the immune response in *A. thaliana* (Plancot et al., 2013). Extensins  
 119 comprise several Serine-(Hydroxyproline)<sub>4,5</sub> motifs in their protein sequence that are  
 120 *O*-glycosylated in the Endoplasmic Reticulum (ER) and the Golgi apparatus (see glycan  
 121 structure in Fig. 1). Prior to the *O*-glycosylation, the proline residues are hydroxylated in the  
 122 ER by Prolyl-4-Hydroxylases (P4Hs) (Velasquez et al., 2011; Fragkostefanakis et al., 2014).  
 123 Then, a galactose residue is transferred to the serine residue in the ER by the Serine-  
 124 GalactosylTransferase 1 (SGT1) (Saito et al., 2014) while several arabinoses are added  
 125 successively in the Golgi on the hydroxyproline residues. The first arabinose is added by the  
 126 HydroxyProline ArabinosylTransferase 1 to 3 (HPAT1-3) (Ogawa-Ohnishi et al., 2013), the  
 127 second by the Reduced Residual Arabinose 1 to 3 (RRA1-3) (Egelund et al., 2007), the third  
 128 by the XyloEndoGlucanase 113 (XEG113) (Gille et al., 2009) and the fourth by the Extensin  
 129 Arabinose Deficient transferase (ExAD) (Velasquez et al., 2012; Møller et al., 2017).  
 130 However, the enzyme catalysing the transfer of the fifth arabinose has not been unravelled  
 131 yet. The glycan moiety confers a certain conformation to extensins allowing their intra- and/or  
 132 inter-molecular cross-linking via tyrosine residues through isodityrosine, pulcherosine or di-  
 133 isodityrosine linkages (Smith et al., 1986; Schnabelrauch et al., 1996; Held et al., 2004;  
 134 Lamport et al., 2011; Chen et al., 2015; Velasquez et al., 2015). This reaction is catalysed by  
 135 specific extensin peroxidases although very few of them have been identified so far  
 136 (Brownleader et al., 1995; Schnabelrauch et al., 1996; Price et al., 2003; Dong et al., 2015).

137 Several lines of evidence have suggested that extensins are key elements in root  
 138 protection against soilborne pathogens. For instance, upon *Nicotiana tabacum* root infection



**Figure 1: Extensin glycosylation**

Proline (Pro) residues are first hydroxylated into hydroxyprolines (Hyp). One galactopyranose (Galp) is then transferred on the serine (Ser) residue and several arabinofuranose (Araf) residues are transferred onto the hydroxyproline residues. The type of linkage and the enzymes involved in extensin glycosylation are indicated. P4Hs: Prolyl-4-Hydroxylases ; SGT1: Serine-GalactosylTransferase 1 ; HPAT1-3: HydroxyProline ArabinosylTransferase 1 to 3 ; XEG113: XyloEndoGlucanase 113 ; ExAD: Extensin Arabinose Deficient transferase.

This figure is adapted with permission from Velasquez *et al.*, 2012.

139 by the root knot nematode *Meloidogyne javanica*, a strong induction of extensin gene  
 140 expression was reported after 1 and 2 weeks of inoculation (Niebel *et al.*, 1993). In *A.*  
 141 *thaliana*, the *atExt1* extensin gene was mostly expressed in root tissues. However, GUS and  
 142 Northern Blot analysis indicated that *atExt1* gene expression was also induced in specific  
 143 areas of leaves in response to infection with *Xanthomonas campestris* (Merkouropoulos and  
 144 Shirsat, 2003). Interestingly, the overexpression of this same gene in *A. thaliana* leaves  
 145 limited the spread of infection of *Pseudomonas syringae* DC3000 and reduced the resulting  
 146 symptoms (Wei and Shirsat, 2006). Immunofluorescence imaging using specific mAbs (*i.e.*  
 147 LM1, JIM11, JIM20) revealed that both elicitor and infection by pathogens induced a  
 148 reorganisation of extensin epitopes within the cell wall (Xie *et al.*, 2011; Plancot *et al.*, 2013;  
 149 Wu *et al.*, 2017). Immunolabelling performed with the mAb JIM11 in banana roots showed an  
 150 increase of JIM11 fluorescence intensity upon inoculation with *Fusarium oxysporum* (Wu *et al.*,  
 151 *et al.*, 2017). In contrast, in wax gourd (*Benincasa hispida*) roots, most of the JIM11 signal  
 152 disappeared after treatment with the elicitor fusaric acid or during infection by *Fusarium*  
 153 *oxysporum* (Xie *et al.*, 2011). These surprising results were subsequently corroborated by the  
 154 results of Plancot *et al.* (2013) on root border-like cells. Root border-like cells are living cells



155 originating from the root cap that are released into the rhizosphere (Vicr  et al., 2005). The  
156 presence of LM1 extensin epitopes was detected at the cell surface of root border-like cells of  
157 both *A. thaliana* and flax (*Linum usitatissimum*) although the pattern of labelling was species-  
158 specific. Upon elicitation with the bacterial elicitor Flg22, LM1 staining disappeared from the  
159 cell surface of border-like cells (Plancot et al., 2013). Interestingly the impact on LM1 epitope  
160 distribution varies according to the type of elicitor used. The authors hypothesized that  
161 elicitation triggers a redistribution of extensin epitopes resulting from their insolubilization  
162 within the cell wall. Such extensin insolubilization in response to elicitors was also observed  
163 in grapevine callus (Jackson et al., 2001).

164 Taken together, these results support the hypothesis of an involvement of extensins in  
165 root defence by strengthening the cell wall to limit pathogen invasion. However, the exact  
166 role of extensins remains to be clearly established. Here, we have investigated the  
167 involvement of extensins in root defence using a set of anti-extensin specific monoclonal  
168 antibodies including LM1, JIM11, JIM12 and JIM20 (Smallwood et al., 1994; Knox et al.,  
169 1995; Smallwood et al., 1995), selected mutants affected in extensin glycosylation (Table 1)  
170 and treatment of the root with the bacterial elicitor Flg22 or the pathogen *Phytophthora*  
171 *parasitica*. Our findings suggest that glycosylation of extensins, and more specifically their  
172 arabinosylation, is essential for cell wall remodelling during the immune response of  
173 *Arabidopsis thaliana* root cells.



## 175 **Results**

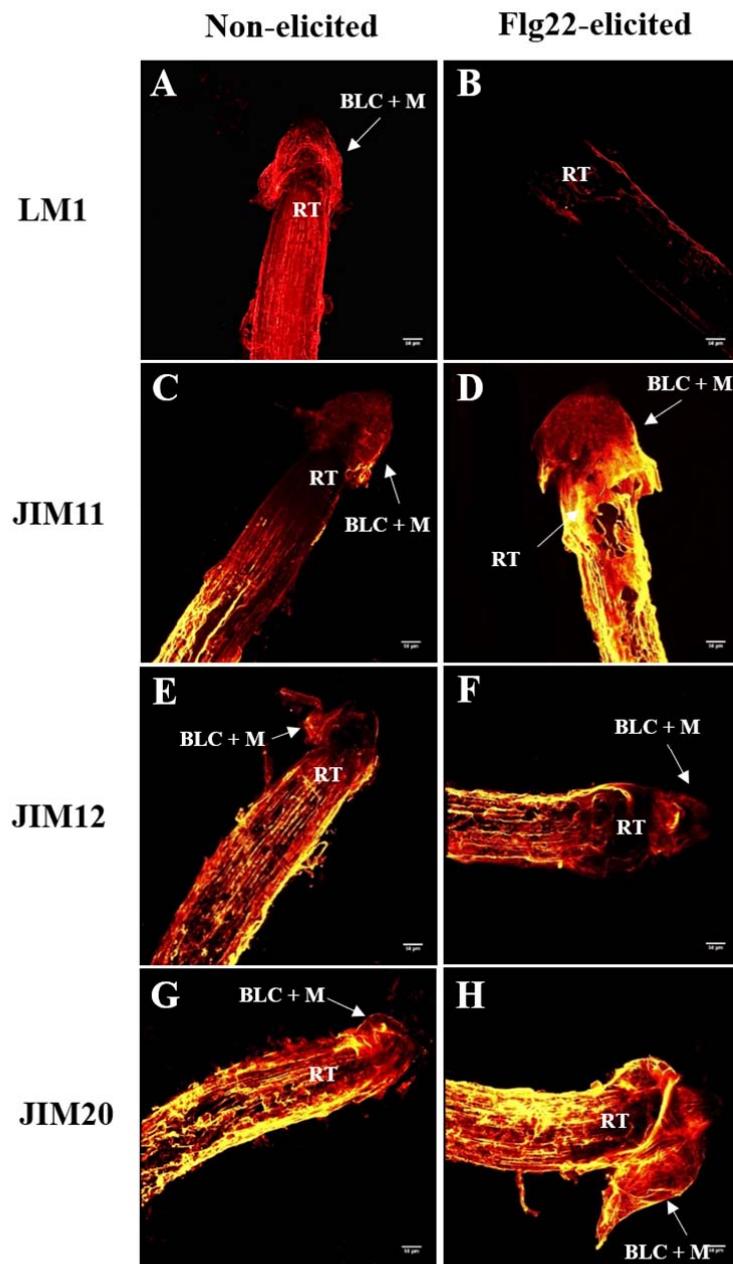
### 176 **Immunolabelling of extensin epitopes in *Arabidopsis* wild-type root elicited with Flg22**

177 To investigate the effect of Flg22 on extensin epitope distribution, we performed  
178 immunofluorescence microscopy on 9-day-old *Arabidopsis thaliana* roots using the following  
179 monoclonal Antibodies (mAbs) LM1, JIM11, JIM12 and JIM20 (Fig. 2). Labelling was  
180 observed all over the non-elicited roots, including root border-like cells, with all the mAbs  
181 tested (Fig. 2A, 2C, 2E and 2G). However, when roots were elicited with Flg22, a different  
182 pattern of labelling occurred according to the mAb used (Fig. 2). Upon elicitation, nearly no  
183 labelling was detected with the mAb LM1 (Fig. 2B). This result is in accordance with a  
184 previous study performed specifically on root border-like cells (Plancot et al., 2013).  
185 Interestingly, an opposite result was obtained with the mAb JIM11 since a stronger staining  
186 was observed in elicited roots as compared to the non-elicited ones (Fig. 2D). The pattern of  
187 labelling was similar between elicited and non-elicited roots when using the JIM12 and JIM20  
188 antibodies (Fig. 2, 2F and 2H).

189 To estimate the signal intensities of the labelling, a quantification of the fluorescence  
190 was performed between elicited and non-elicited roots (Fig. 3). The fluorescence area was  
191 measured on each image and was related to the whole root area to calculate the corresponding  
192 ratio. The minimum intensity defined to quantify the fluorescence differed according to the  
193 antibody. Only non-elicited and elicited roots were compared for each antibody. The  
194 calculation of the fluorescence area ratio confirmed the previous observations. We found that  
195 the signal intensity resulting from LM1 labelling was stronger (59% of whole root surface) in  
196 the non-elicited roots as compared to the elicited roots (6% of the whole root surface). By  
197 contrast, the JIM11 fluorescence area was significantly smaller in non-elicited roots (6%) as  
198 compared to elicited roots (45%). No significant ratio differences were found between non-  
199 elicited and elicited roots with the JIM12 and JIM20 mAbs (59% to 52% respectively for  
200 JIM12 and 44% to 39% for JIM20).

### 201 **Impact of individual extensin epitopes on *Phytophthora parasitica* root colonization**

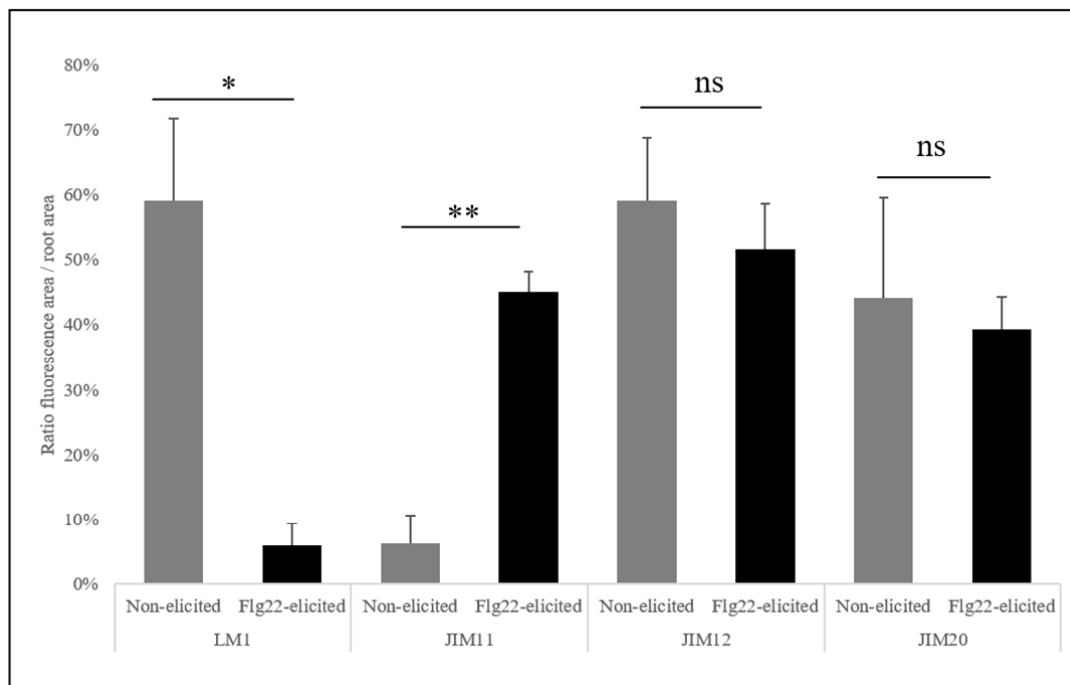
202 We wanted to investigate the involvement of individual extensin epitopes recognized  
203 by the mAbs used in this study on root colonization by soilborne pathogens. To this end, we  
204 selected *Phytophthora parasitica*, an oomycete previously used as a model for studying the  
205 effect of root infection on *A. thaliana* seedlings (Attard et al., 2010; Attard et al., 2014).



**Figure 2: Immunostaining of extensin epitopes on *Arabidopsis thaliana* root tips.**

Immunolabelling were performed on 9-day-old roots using the anti-extensin monoclonal antibodies LM1 (A, B), JIM11 (C, D), JIM12 (E, F) and JIM20 (G, H). Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 (B, D, F, H) or not elicited (A, C, E, G). Images are 3D-reconstructions of 1  $\mu$ m section stacks and were obtained with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 507 – 550 nm). For each condition, 5 plant root tips were observed. Scale bars = 50  $\mu$ m. RT: Root tip. BLC + M: Border-like cells and mucilage.

206 Inoculations with the pathogen were performed after pre-treatment of *A. thaliana* wild-type  
 207 root with anti-extensin mAbs to selectively mask the corresponding epitopes (Fig. S1).  
 208 Treatment of the root with the mAb LM1 resulted in a significant increase of accumulated



**Figure 3: Quantification of fluorescence observed on *Arabidopsis thaliana* root tips immunostained with different anti-extensin antibodies.**

Immunolabelling were performed on 9-day-old roots using the anti-extensin monoclonal antibodies LM1, JIM11, JIM12 and JIM20. Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 or not elicited. Fluorescence area was measured and was related to the observed root area to calculate the corresponding ratio.

For each condition, 5 plant root tips were observed and quantified. Bars show the standard deviations. Populations do not follow a Normal distribution (d'Agostino test at  $\alpha=5\%$ ,  $n=5$ ). Comparison elicited to non-elicited: Mann-Whitney test at  $\alpha=5\%$ .

ns: not significant \*: pvalue < 0.05 \*\*: pvalue < 0.01

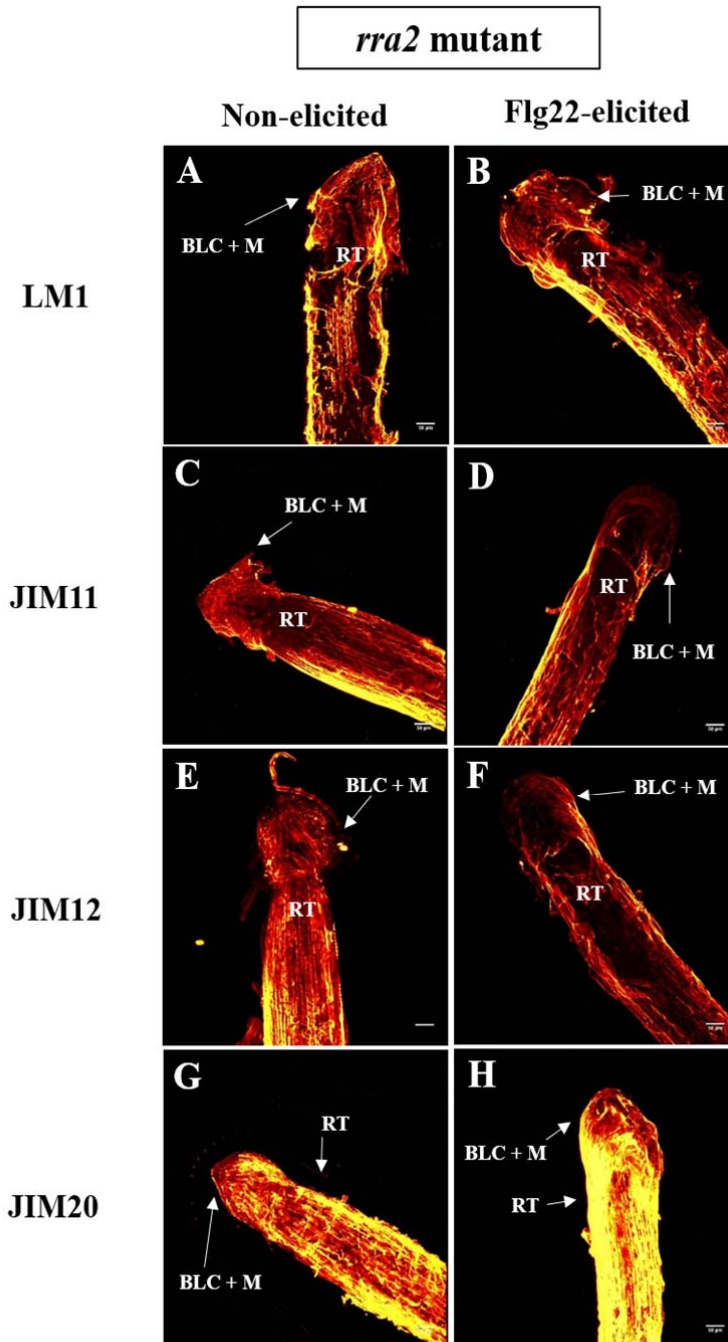
209 zoospores. However, when JIM11 and JIM12 anti-extensin antibodies were used, there was  
 210 no difference of zoospore accumulation between treated and non-treated (control) roots.  
 211 Similar results were obtained when both LM1 and JIM12 mAbs were used (data not shown).  
 212 Surprisingly, treatment with 1 mg ml<sup>-1</sup> anti-rat serum resulted in a significant increase of  
 213 accumulated zoospores as observed for LM1 treated roots. These data appear highly  
 214 promising as “blocking” selective epitopes with different mAbs alters zoospore accumulation  
 215 differentially under our conditions. However, these data should be interpreted with care due to  
 216 the partial attractiveness of the zoospores by the primary antibody. Therefore, we decided to  
 217 use a mutant approach to study the role of extensins (see below) rather than focusing on  
 218 specific epitopes using antibodies.

### 219 Immunolabelling of extensin epitopes in the root of extensin mutants

220 To date, the role of extensin glycosylation in root defence remains poorly investigated.  
221 In order to gain insight on the involvement of glycosylation in the response of extensin  
222 remodelling occurring upon Flg22 elicitation, we selected four homozygous *A. thaliana*  
223 mutants, previously reported to be altered at different levels of extensin glycosylation (Table  
224 1, see Fig. 1 for the glycan structure of extensins). The *p4h2* mutant (SALK\_04128C)  
225 displays a T-DNA insertion within the gene coding for a Prolyl-4-Hydroxylase that  
226 hydroxylates the proline residues which will be further arabinosylated (Tiainen et al., 2005;  
227 Velasquez et al., 2011). The *rra1* and *rra2* mutants (SALK\_085325C and SALK\_129345C)  
228 are knocked-out within genes coding for arabinosyltransferases that add the second arabinose  
229 on extensin glycan moiety (Egelund et al., 2007) whereas the *xeg113* mutant  
230 (SALK\_066991C) is altered within the gene coding for the arabinosyltransferase transferring  
231 the third arabinose (Gille et al., 2009). The homozygosity of the mutants was verified, as  
232 presented in Fig. S2.

233 We first examined extensin epitope distribution over the mutant roots using  
234 immunofluorescence microscopy. Immunolabelling using LM1, JIM11, JIM12 and JIM20  
235 anti-extensin mAbs were performed on Flg22-elicited and non-elicited mutant roots and  
236 results were compared to those obtained with the wild-type (presented in Fig. 2). In figure 4,  
237 we present the immunolabelling data obtained on elicited and non-elicited *rra2* mutant roots.  
238 The images obtained for the *rra1*, *p4h2* and *xeg113* mutants are presented in figures S3, S4  
239 and S5 respectively. Immunofluorescence observed with the four antibodies on the mutant  
240 and wild-type roots in elicited and non-elicited conditions was quantified and the data are  
241 presented in figure 5. Detailed graph and statistical analysis results for LM1, JIM11, JIM12  
242 and JIM20 mAbs are presented in figures S6, S7, S8 and S9 respectively.

243 In non-elicited conditions, the pattern of staining obtained with the four anti-extensin  
244 mAbs differed between the *rra1*, *rra2* and *p4h2* mutants and the wild-type (Fig. 5). Compared  
245 to the wild-type, a larger fluorescence area was indeed quantified when LM1 and JIM20  
246 antibodies were used on *rra1* and *rra2* mutants (Fig. 5) even though this difference can be  
247 barely seen on the images presented for *rra1* (Fig. 2A, 2G, S3A and S3G) and was only found  
248 significant between *rra2* and the wild-type for the JIM20 antibody (Fig. S6B and S9B). On  
249 the *p4h2* mutant, the fluorescence area was also enhanced when the LM1 JIM11 and JIM20  
250 were used (Fig. 5) although this was not significant for JIM11 (Fig. S7B). By contrast, the  
251 *p4h2* mutant exhibits a weaker JIM12 signal than the wild-type (Fig. 5). Compared to the  
252 wild-type, similar labelling pattern was observed on the *rra1* and *rra2* mutants when JIM11



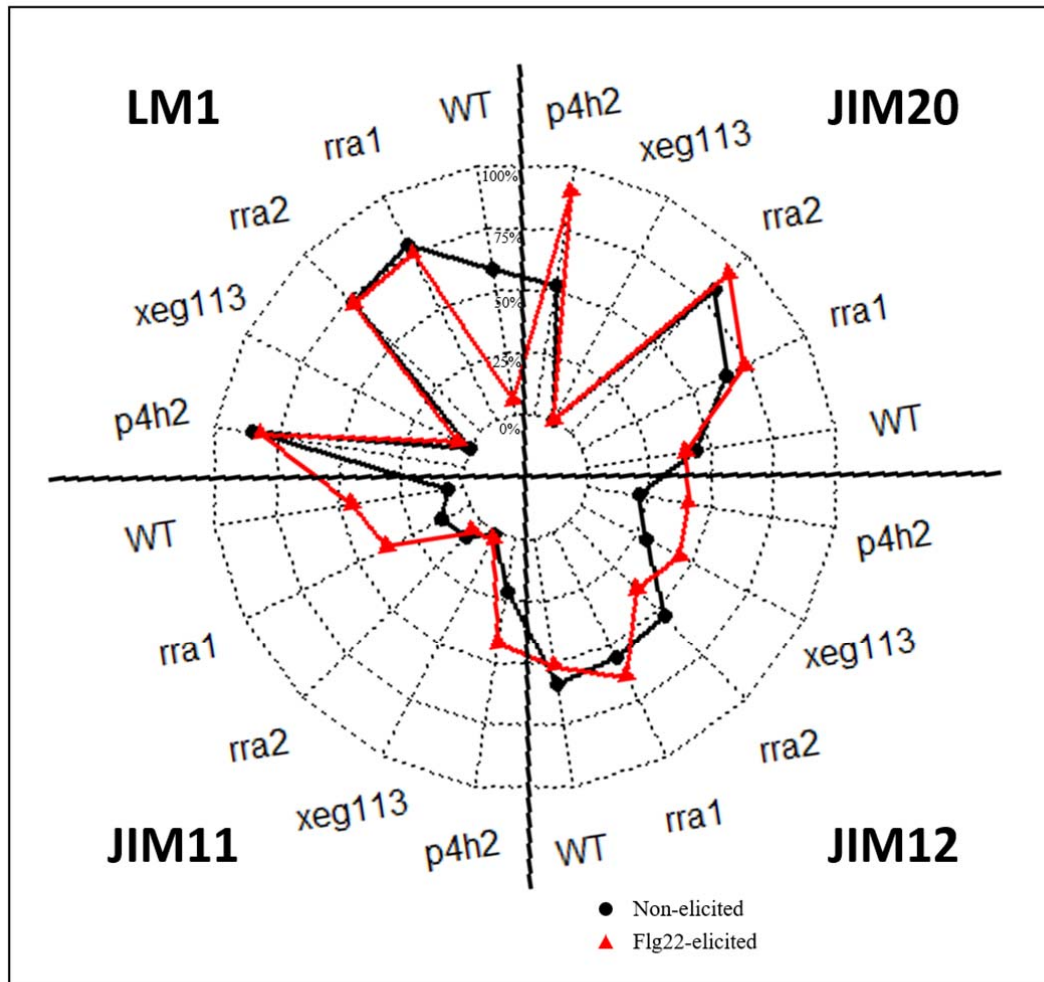
**Figure 4: Immunostaining of extensin epitopes on *Arabidopsis thaliana rra2* mutant root tips.**

Immunolabelling was performed on 9-day-old *rra2* mutant roots using the anti-extensin monoclonal antibodies LM1 (A, B) JIM11 (C, D), JIM12 (E, F) and JIM20 (G, H). Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 (B, D, F, H) or not elicited (A, C, E, G). Images are 3D-reconstructions of 1  $\mu$ m section stacks and were obtained with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 507 – 550 nm). For each condition, 5 plant root tips were observed. Scale bars = 50  $\mu$ m.

RT: Root tip. BLC + M: Border-like cells and mucilage.

253 and JIM12 were employed (Fig. 5). Regarding the *xeg113* mutant, no labelling of the root was

254 observed with the LM1, JIM11 and JIM20 mAbs (Fig. 5). Only the presence of JIM12



**Figure 5: Quantification of fluorescence observed on *Arabidopsis thaliana* mutant root tips immunostained with different anti-extensin antibodies.**

Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra1*, *rra2*, *xeg113*, *p4h2* mutant and wild-type roots using the anti-extensin monoclonal antibodies LM1, JIM11, JIM12 and JIM20. Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 or not elicited. Fluorescence area was measured and was related to the observed root area to calculate the corresponding ratio. For each condition, 5 plant root tips were observed. Graphs and statistical analyses are presented for each antibody in figures S6-9.

255 fluorescence was detected along the *xeg113* mutant root with less intensity than in the wild-  
 256 type (Fig. 5 and S5E) even though this is not significant (Fig. S8B).

257 In elicited conditions, more differences occurred between the *rra1*, *rra2* and *p4h2*  
 258 mutants and the wild type in response to elicitation with Flg22. In elicited roots, the LM1  
 259 epitopes were strongly detected at the root surface of the three mutants, *rra1*, *rra2* and *p4h2*  
 260 whereas the LM1 labelling was not detected for the wild-type (Fig. 5). In addition, another  
 261 significant difference was noticed between the *rra2* mutant and the wild-type using the JIM11

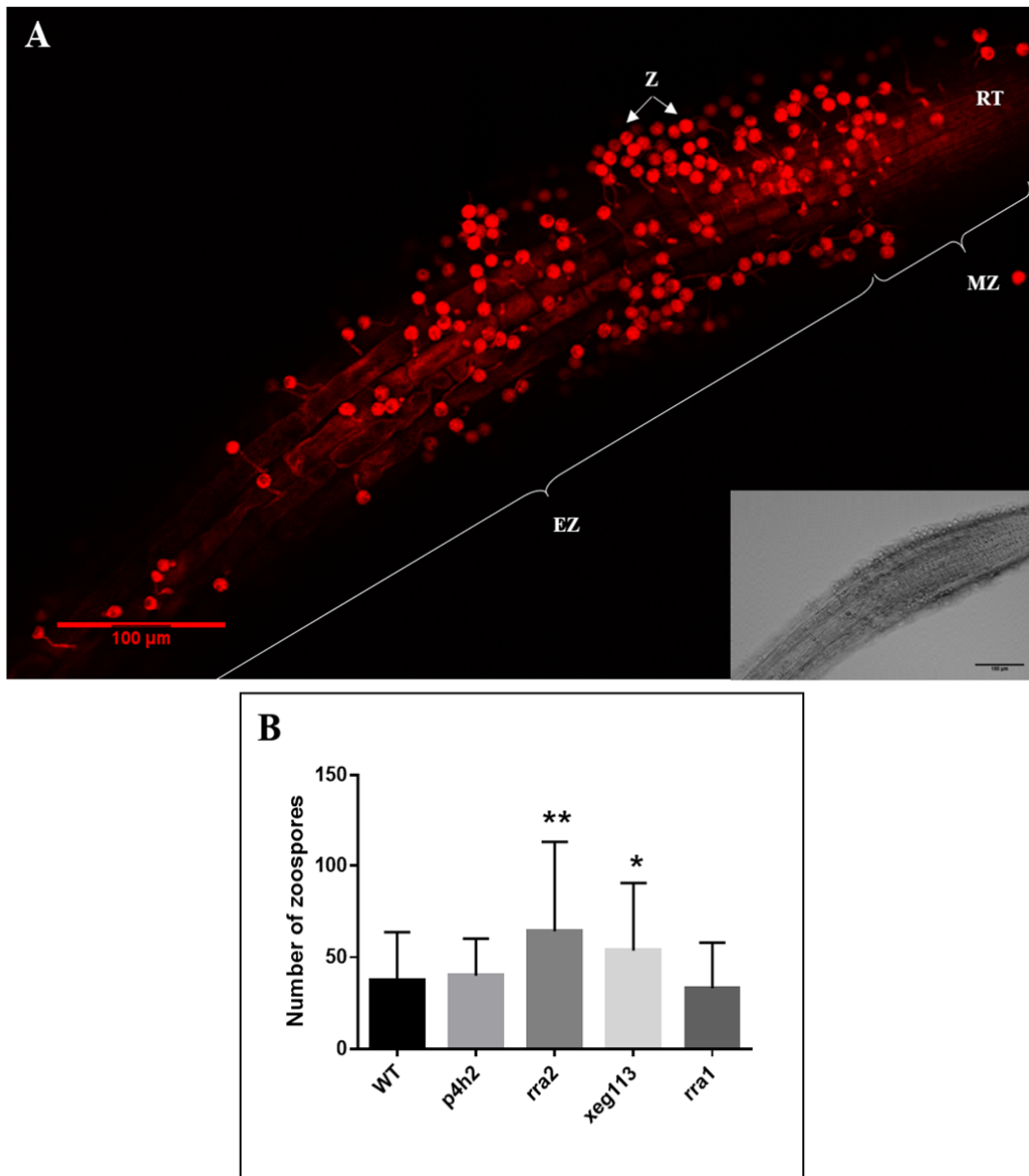


262 antibody after elicitation with Flg22 (Fig. 5 and S7B). While the JIM11 epitope distribution  
 263 and the fluorescence intensity were similar in non-elicited conditions (Fig. 2C, 4C, 5 and  
 264 S7B), a stronger signal was observed in the Flg22-elicited wild-type roots but not in the *rra2*  
 265 mutant (Fig. 2D, 4D, 5 and S7D). In the *rra1* and *p4h2* mutants, the intensity of the signal  
 266 was similar to the wild-type (Fig. 5 and S7C). By contrast, signal associated with the JIM20  
 267 antibody was enhanced in Flg22-elicited *p4h2* mutant roots in comparison to non-elicited, but  
 268 not in the other mutants or the wild-type (Fig. 5 and S9D). Besides, this signal was stronger in  
 269 the Flg22-elicited roots of *rra1*, *rra2* and *p4h2* mutants in comparison to the elicited wild-type  
 270 roots although the difference was strangely not found significant for *p4h2* (Fig. S9C). In the  
 271 *p4h2* mutant root, fluorescence associated with the JIM12 antibody was slightly enhanced  
 272 after elicitation with Flg22. This is the only clear difference observed between the *rra1*, *rra2*  
 273 and *p4h2* mutants and the wild-type using the JIM12 mAb on both elicited and non-elicited  
 274 roots (Fig. 5 and S8).

275 As for non-elicited conditions, no labelling was observed in elicited roots of the  
 276 mutant *xeg113* with the mAbs, LM1, JIM11 and JIM20 (Fig. 5). Only, the presence of JIM12  
 277 fluorescence was detected along the *xeg113* mutant root similarly to the wild-type even  
 278 though a slight increase after Flg22 elicitation was observed in this mutant (Fig. 5, S5E, S5F  
 279 and S8).

## 280 **Colonization of wild-type and mutant roots by *Phytophthora parasitica***

281 To check whether root colonization is impacted by the mutations, seedlings of wild-  
 282 type and extensin mutants were inoculated with *P. parasitica* zoospores. The number of  
 283 zoospores associated with the root surface was then determined after 3 hours (Fig. 6). In the  
 284 mutants as in the wild-type, zoospores accumulated over the same specific root area, mostly at  
 285 the end of the meristematic zone and the beginning of the elongation zone (Fig. 6A). This  
 286 result is in accordance with a previous study performed on wild-type roots by Attard *et al.*  
 287 (2010). However, the number of zoospores accumulated in this root zone was significantly  
 288 higher in the *rra2* and *xeg113* mutants as compared to the wild-type (Fig. 6B). The  
 289 corresponding increase of zoospores represented 72% and 44% for *rra2* and *xeg113* mutants  
 290 respectively. The amount of accumulated zoospores was similar between the *p4h2* and *rra1*  
 291 mutants and the wild-type roots. These results can be related to the previous immunolabelling  
 292 showing a different extensin epitope distribution in *rra2* and *xeg113* mutants compared to the  
 293 wild-type (*e.g.* JIM20 fluorescence signal increased strongly in *rra2* mutant and vanished in



**Figure 6: Accumulation of zoospores over *Arabidopsis thaliana* mutant roots after 3 hours of inoculation.**

Zoospores accumulated in an area between the end of the meristematic zone and the beginning of the elongation zone. **(A)** Accumulation of zoospores in a wild-type root observed in fluorescence and bright-field microscopy. Images were taken with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 561 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 570 – 612 nm). Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ . RT: Root tip. Z: Zoospores. EZ: Elongation zone. MZ: Meristematic zone. **(B)** Zoospores stained with propidium iodide were counted in a 400  $\mu\text{m}$  long zone between the end of the meristematic zone and the beginning of the elongation zone. Combining data from 5 independent experiments. 18 values out of 243 were considered as aberrant and removed by the ROUT method ( $Q=10\%$ ). Bars show the standard deviations. Each population follows a Normal distribution (d’Agostino test at  $\alpha=5\%$ ,  $n \geq 36$ ). Variances are not supposed equal (Fisher test at  $\alpha=5\%$ ). Comparison to the WT: t-test with Welch’s correction at  $\alpha=5\%$ .

\*: pvalue < 0.05 ; \*\*: pvalue < 0.01

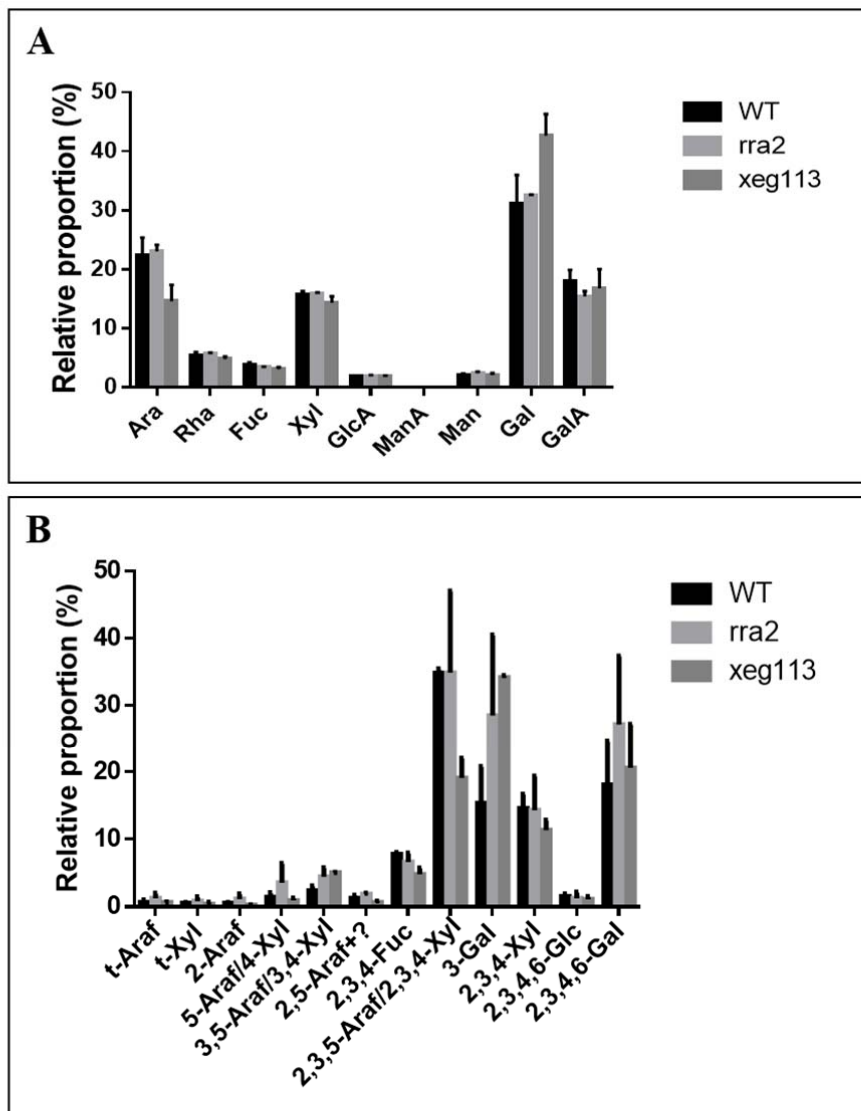
294 *xeg113* mutant). The root colonization by *P. parasitica* was therefore more important in the  
 295 *xeg113* and *rfa2* mutants suggesting that alteration of extensin glycosylation influences the

296 interaction between *A. thaliana* root and the pathogen *P. parasitica* early during infection.

297 **Monosaccharide composition of *xeg113* and *rra2* mutants root cell wall**

298 We speculated that the alteration of the extensin glycosylation, resulting in an  
 299 increased susceptibility to pathogen colonization in *rra2* and *xeg113* mutants, could also  
 300 impact the organization and structure of the cell wall in the root. In order to investigate  
 301 whether other cell wall components are affected by the mutations, we analysed the  
 302 monosaccharide composition of root cell walls of the *xeg113* and *rra2* mutants in comparison  
 303 with the wild-type. Alcohol Insoluble Residues (AIR) were extracted from roots and  
 304 monosaccharide composition was determined from GC-FID analyses. Our data showed that  
 305 the major monosaccharides found in the wild-type root cell wall were galactose (31%),  
 306 arabinose (22%), xylose (16%) and galacturonic acid (18%) (Fig. 7A). No detectable  
 307 difference was noticed between cell wall monosaccharide composition of *rra2* mutant roots  
 308 and the wild-type. However, in *xeg113* mutant roots, the cell wall monosaccharide  
 309 composition profile revealed a slightly reduced arabinose content (15%) and a significant  
 310 increased level of galactose (43%) in comparison with the wild-type.

311 These monosaccharide composition profiles were completed by a linkage analysis  
 312 (Fig. 7B). AIR were permethylated and derivated into PMAA which were analysed using GC-  
 313 MS. In the wild-type and both mutants, the major PMAA derivatives detected were 2,3,5-  
 314 pentosef/2,3,4-pentosep, 3-hexose and 2,3,4,6-hexose. Note that the furanose form of 2,3,5-  
 315 pentose and the pyranose form of 2,3,4-pentose display very similar EI mass spectra which do  
 316 not permit the differentiation between these two PMAA derivatives. The identification of the  
 317 isomers and of all the different PMAA derivatives was obtained on the basis of both EI mass  
 318 spectrum and retention index (using known standard PMAA derivatives and the CCRC  
 319 database). Thus, the four major PMAA derivatives were 2,3,5-Araf, 3-Gal, 2,3,4-Xyl and  
 320 2,3,4,6-Gal. Some relative decrease in chromatographic peaks of both pentose was noticed in  
 321 the *xeg113* mutant compared to the wild type. In *rra2* and *xeg113* mutants, an increase of 3-  
 322 Gal proportion (more important for *xeg113* mutant) was observed compared to the wild-type.



**Figure 7: Monosaccharide composition analysis of AIR from 7-day-old *A. thaliana* mutant roots.**

(A) Monosaccharide composition was analysed by GC-FID using AIR extracted from 100 roots for both mutants and wild-type. Experiments were performed twice for *rra2* mutant and four times for WT and *xeg113* mutant. Bars show the standard deviations. Values are relative proportions, therefore statistical analyses cannot be performed. (B) Linkage analysis was performed by GC-MS using AIR extracted from 200 roots for *xeg113* mutant and wild-type and from 100 roots for *rra2* mutant. Experiments were performed twice for both mutants and wild-type. Bars show the standard deviations. Values are relative proportions, therefore statistical analyses cannot be performed.

324 **Discussion**

325 Cell wall is of major importance in plant defence since it is the first cellular barrier  
326 against microbial attacks (Schulze-Lefert, 2004; Underwood and Somerville, 2008; Ellinger et  
327 al., 2013; Bethke et al., 2016; Engelsdorf et al., 2017). It is well known that cell wall  
328 reinforcement involving callose deposition occurs at site of infection by pathogenic fungi in  
329 leaves (Underwood and Somerville, 2008). Such a response is less well understood in the case  
330 of root defence but callose deposition was also reported in roots upon elicitor treatment  
331 (Millet et al., 2010; Plancot et al., 2013). Extensins are cell wall glycoproteins thought to be  
332 involved in root defence although only a few studies have investigated this role (Deepak et al.,  
333 2010). In 2013, Plancot *et al.* showed that LM1 anti-extensin labelling was strongly reduced  
334 in response to elicitation with the Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP) Flg22 in  
335 border-like cells of *A. thaliana* and flax. Here, we found that such a response occurs in the  
336 whole root tip indicating that extensins are part of the root immune response in *A. thaliana*.  
337 Our results support the hypothesis elaborated by Plancot *et al.* (2013) proposing that  
338 elicitation would trigger a cell wall remodelling involving a redistribution of extensin  
339 epitopes. However, one can expect that such cell wall reorganisation would be differently  
340 impacted depending on the type of elicitors, pathogens, plant species or root tissue studied.  
341 The distribution of extensin epitopes at the cell surface of roots of *A. thaliana* and flax was  
342 shown to be different even in non-elicited plants (Plancot et al., 2013). Furthermore, the  
343 opposite effect observed with JIM11 in wax gourd as compared to banana and *A. thaliana* in  
344 response to elicitation and/or infection also reveals a different remodelling of JIM11 extensin  
345 epitopes (Xie et al., 2011; Wu et al., 2017). Thus, elicitation with Flg22 induces a strong  
346 decrease of LM1 associated fluorescence and enhancement of JIM11 signal but has no effect  
347 on JIM12 and JIM20 extensin epitopes, implying that root response to elicitation is epitope-  
348 specific.

349 Other changes in anti-extensin labelling were reported in roots from other plant  
350 species following elicitation or inoculation with a pathogen. In wax gourd (*Benincasa*  
351 *hispida*), signal associated with JIM11 and JIM20 mAbs was strongly reduced after infection  
352 with the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* or elicitation with the derived elicitor fusaric  
353 acid (Xie et al., 2011). In contrast, banana roots inoculated with *F. oxysporum* exhibited a  
354 stronger JIM11 signal as compared to non-infected plants (Wu et al., 2017). In the present  
355 paper, we found a similar increase in the JIM11 signal in *A. thaliana* roots after elicitation

356 with Flg22 showing that the recognized extensin epitope is impacted by elicitors. Wu *et al.*  
357 proposed that JIM11 could be a good marker of banana resistance to *F. oxysporum*.  
358 Consistent with this hypothesis, our results suggest that both LM1 and JIM11 extensin  
359 epitopes could be considered as cell wall markers of root defence in *A. thaliana*.

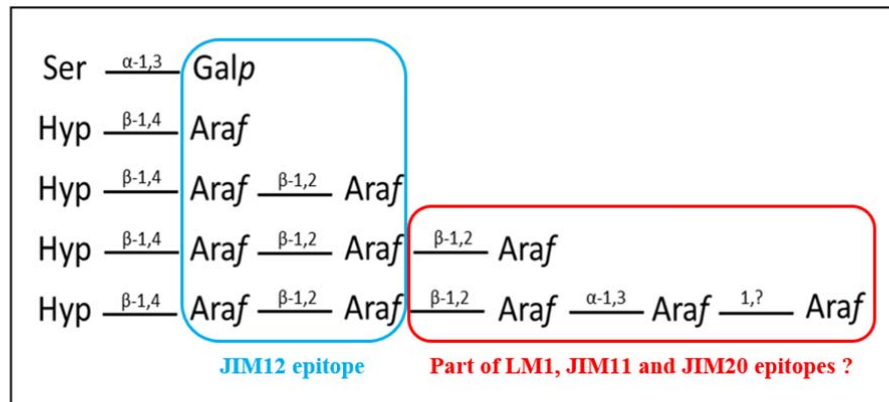
360 Our data reveal a fine-tuned reorganisation of specific extensin epitopes in response to  
361 the Flg22 elicitor. A modification of the cell wall architecture is likely to impact cell binding  
362 and therefore colonization of the root. Attempts were made to mask individual extensin  
363 epitopes with the corresponding mAbs prior to inoculation with *P. parasitica* an oomycete  
364 used as a model to study root infection in *A. thaliana* (Attard et al., 2010). Although this  
365 approach has already led to very interesting results in the study of the role of AGPs in the  
366 control of root cell morphology (Nguema-Ona et al., 2007), it was less powerful to study the  
367 role of extensins in root colonization. The limit of this technique did not allow to accurately  
368 demonstrate the relevance of specific epitopes in such interaction even though our results  
369 could suggest a role of LM1 epitopes in zoospore binding and accumulation at the surface of  
370 *Arabidopsis* root under our conditions.

371 We therefore chose another approach by selecting the mutants *xeg113*, *rra1*, *rra2* and  
372 *p4h2* affected in extensin glycosylation. The monosaccharide composition of root cell wall of  
373 these mutants was analysed in order to check whether other cell wall components could be  
374 impacted. Interestingly, the *rra2* mutant does not induce any detectable impact on the  
375 composition of the cell wall. The *xeg113* cell wall monosaccharide composition differed from  
376 the wild-type with less proportion of arabinose and higher proportion of galactose.  
377 Interestingly, the *xeg113* cell wall composition was similar to the one published by Gille *et al.*  
378 (2009) except for the galactose variation. Nevertheless, this analysis was performed on AIR  
379 from whole etiolated *xeg113* mutant seedlings whereas in our conditions, AIR were extracted  
380 specifically from the roots. Assuming that extensins may be extracted within the AIR, the  
381 reduction of arabinose proportion is consistent with the incomplete arabinosylation of  
382 extensins expected in the *xeg113* mutant. The galactose increase is however surprising and  
383 may suggest that other cell wall components could be impacted by a partial deficiency of  
384 extensin arabinosylation. As a consequence, linkage analysis was performed on mutants and  
385 wild-type cell wall. The increase in 3-Galactose proportion detected in *rra2* and *xeg113*  
386 mutants may originate from AGPs or Rhamnogalacturonan-I, known to be rich in this  
387 monosaccharide (Caffall and Mohnen, 2009; Nguema-Ona et al., 2013). This suggests that  
388 incomplete arabinosylation of extensins would result on a readjustment of the cell wall

389 organization through AGPs or pectins. This result is of particular interest since extensins were  
 390 found to be potentially associated with pectins (MacDougall et al., 2001; Cannon et al., 2008;  
 391 Nuñez et al., 2009; Valentin et al., 2010; Leroux et al., 2011; Neumetzler et al., 2012) and in  
 392 particular with Rhamnogalacturonan-I (Yu et al., 2011) or Rhamnogalacturonan-II (Reguera  
 393 et al., 2010; Chormova and Fry, 2016). However, the type of linkage between extensins and  
 394 pectins remains to be clearly established and will require further work. Nonetheless, it appears  
 395 that changes in arabinosylation status of extensin impact the cell wall composition and  
 396 structure, and possibly interaction of extensins with cell wall components including pectins  
 397 and AGPs. It is also tempting to speculate that extensins might act in synergy with these  
 398 polysaccharides within the cell wall.

399 Immunolabelling using various anti-extensin mAbs displayed different patterns among  
 400 the *xeg113*, *rra1*, *rra2* and *p4h2* mutants in comparison to the wild-type (Fig. 5). The three  
 401 mutants *rra1*, *rra2* and *p4h2* displayed a different LM1 pattern after elicitation with Flg22 as  
 402 compared to the wild-type. We could therefore speculate that reorganisation of extensins  
 403 involving the LM1 epitope did not occur properly in these mutants in response to elicitation.  
 404 Interestingly, in the *rra2* mutant JIM11 signal remained the same after elicitation with Flg22  
 405 whereas the intensity was enhanced in wild-type and in *p4h2* and *rra1* mutants. The variation  
 406 between the *rra2* and the *rra1* mutants may seem surprising but could be explained by a  
 407 compensation phenomenon since RRA1 and RRA2 are two of the three RRA isoforms present  
 408 in *A. thaliana*. RRA2 transcripts are indeed much more expressed in *A. thaliana* roots than  
 409 RRA1 (Egelund et al., 2007). Thus, it appears that the extensin response to elicitation differs  
 410 between mutants and the wild-type and is singular in the *rra2* mutant.

411 It could be assumed that cell wall organization may vary between each mutant  
 412 depending on the alteration degree of extensin glycosylation, thus leading to a distinct  
 413 response to elicitation. In this regard, interesting data arose from extensin immunolabelling of  
 414 the *xeg113* mutant root. First, no staining was detected with LM1, JIM11 and JIM20 mAbs in  
 415 the *xeg113* mutant which lacks the enzyme transferring the third arabinose on the extensin  
 416 glycan fraction (Gille et al., 2009) (see Fig. 1). One hypothesis is that partial deficiency of  
 417 arabinose residues from the extensin glycan moiety would disrupt the extensin organization  
 418 within the cell wall, resulting on the masking of epitopes associated with LM1, JIM11 and  
 419 JIM20 but not with those recognized by JIM12. However, based on these  
 420 immunocytochemical observations we could also speculate that epitopes recognized by the  
 421 LM1, JIM11 and JIM20 mAbs may include the third arabinose and/or following arabinose



**Figure 8: Proposition for the epitope structure recognized by the anti-extensin monoclonal antibodies LM1, JIM11, JIM12 and JIM20.**

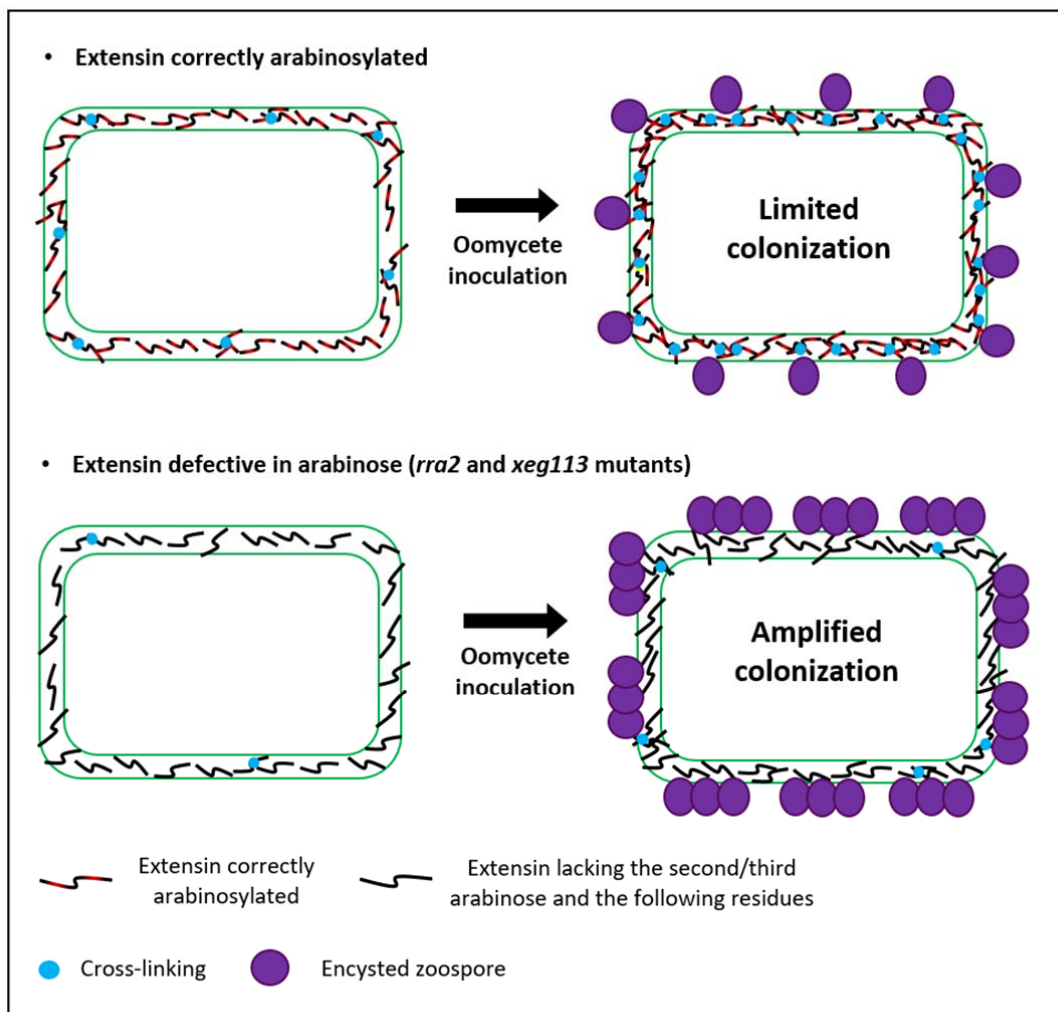
Epitope structure recognized by the LM1, JIM11, JIM12 and JIM20 anti-extensin mAbs, based on our immunocytochemical observations performed on *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in extensin arabinosylation and wild-type roots. The JIM12 epitope would comprise part or the entire structure containing the two first arabinoses and the galactose from the extensin glycan moiety. The LM1, JIM11 and JIM20 epitopes may include the third arabinose and/or following arabinose residues on the extensin glycan moiety.

Ser: Serine. Hyp: Hydroxyproline. Galp: Galactopyranose. Araf: Arabinofuranose

422 residues on the extensin glycan moiety that are missing in *xeg113* mutant. By contrast, the  
 423 label observed on this mutant using the JIM12 antibody suggests that the epitope recognized  
 424 here differs from LM1, JIM11 and JIM20. The JIM12 epitope would indeed comprise part or  
 425 the entire structure containing the two first arabinoses and the galactose from the extensin  
 426 glycan moiety. These data bring new information regarding the glycan component of these  
 427 epitopes, as presented in figure 8. Although the LM1, JIM11, JIM20 and JIM12 mAbs are  
 428 widely used to study extensin, the nature of the corresponding epitopes is not elucidated. Yet,  
 429 characterizing these epitopes might be very helpful to better apprehend the results obtained on  
 430 extensin structure/function using the immunochemical approaches.

431 In our inoculation experiments with the pathogen *P. parasitica*, we found a higher  
 432 accumulation of *P. parasitica* zoospores in *xeg113* and *rra2* mutant roots as compared to the  
 433 wild-type. This finding suggests that extensin arabinosylation may contribute to limit root  
 434 colonization by the pathogen *P. parasitica*. It has been demonstrated that arabinosylation of  
 435 extensins is required for the cross-linking of extensins (Chen et al., 2015). The glycan moiety  
 436 would confer the correct conformation to extensins allowing the cross-linking to occur  
 437 through isodityrosine, pulcherosine or di-isodityrosine linkages in the cell wall (Velasquez et  
 438 al., 2015). Glycosylation of extensins is thus essential for establishing physical and protective  
 439 properties of the cell wall. Hence, we propose a model for the *A. thaliana* - *P. parasitica*





**Figure 9: Model illustrating the impact of extensin arabinosylation in *Arabidopsis thaliana* root colonization by the oomycete *Phytophthora parasitica*.**

Due to their correct arabinosylation, extensins would be already cross-linked (to a certain extent) within the cell wall in non-infected roots. Root inoculation with *P. parasitica* zoospores would activate various mechanisms of defence response, including a significant increase of extensin cross-links forming a strong 3D network that reinforces the cell wall and limits pathogen colonization. However, in the case of an incomplete arabinosylation of extensins, very few (or no) cross-links would be formed even after oomycete inoculation, modifying the cell wall organization and strength. This would result on increased zoospore binding to root cells leading *in fine* to an amplified colonization by the pathogen.

440 pathosystem to illustrate the importance of extensin arabinosylation in root colonization by  
 441 this oomycete (Fig. 9). When extensins are correctly arabinosylated, cross-links would occur  
 442 for normal functioning of cell wall in non-infected root cells. Inoculation of roots with *P.*  
 443 *parasitica* zoospores would trigger a series of defence responses including a significant  
 444 increase of extensin cross-links, forming a strong 3D network that reinforces the cell wall and  
 445 limits pathogen colonization. However, in the case of an incomplete arabinosylation of

446 extensins, very few (or no) cross-links would be formed even after oomycete inoculation,  
447 modifying the cell wall organization and strength. This would result on increased zoospore  
448 binding to root cells leading *in fine* to an amplified colonization by the pathogen. To  
449 understand the mechanism in place here, it could be of interest to unravel the strategy of *P.*  
450 *parasitica* zoospores to reach and colonize the root. This colonization could be the result of  
451 chemotaxis, auto-aggregation and/or electrotaxis phenomena (Walker and van West, 2007). It  
452 is tempting to relate the higher zoospore accumulation in *xeg113* and *rra2* mutant roots to an  
453 alteration of the cell wall charge due to the reduction of extensin cross-linkings. This would in  
454 turn induce a different electrotaxis. Further work will be required to confirm this hypothesis.

455

456 **Conclusions**

457           To summarize, our work provides evidence for an involvement of extensins in root  
458 defence. It reveals that extensin arabinosylation is required for the formation of a protective  
459 cell wall network that limits early stages of *A. thaliana* root infection by the oomycete *P.*  
460 *parasitica*. Nevertheless, further investigations are needed to clearly establish how extensin  
461 arabinosylation impacts interactions of components and architecture of the cell wall in the  
462 context of root defence.

463

## 464 **Materials and Methods**

### 465 *Plant Material*

466 *Arabidopsis thaliana* (L. Heynh) (*Brassicaceae*) lines were derived from the Columbia  
 467 ecotype (Col-0). Seeds were surface sterilized with 50% ethanol for 5 minutes, 0.8% sodium  
 468 hypochlorite solution for 2 minutes and washed six times with sterile deionized water before  
 469 being sown onto *Arabidopsis* medium (Duchefa Biochemie no. DU0742.0025,  
 470 <https://www.duchefa-biochemie.com/>) supplemented with 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and 1% (w/v)  
 471 Bacto Agar, pH 5.8. Plates with seeds were placed for 2 days at 4°C in the dark, then  
 472 submitted to 16-h day/8-h night cycles (120 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 21°C) in a vertical position. The *rra1*  
 473 (SALK\_085325C), *rra2* (SALK\_129345C), *xeg113* (SALK\_066991C) and *p4h2*  
 474 (SALK\_04128C) mutant seeds were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre  
 475 (NASC).

### 476 *DNA isolation and PCR*

477 A leaf was collected from 3-week plants grown on soil and crushed in a microtube containing  
 478 400 μl of extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8, 625 mM NaCl, 25 mM EDTA  
 479 (EthyleneDiamineTetraAcetic acid) pH 8, 8% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)) using a micro  
 480 pestle. After a centrifugation for 1 minute at 16000g, the supernatant was transferred to a new  
 481 sterile microtube containing the equal volume of isopropanol. The solution was mixed by  
 482 turning the microtube upside-down and incubated at room temperature for 5 minutes allowing  
 483 the DNA precipitation. The supernatant was then discarded and the pellet was washed with  
 484 70% ethanol twice. The dry pellet was resuspended in 100 μl deionized water, vortexed and  
 485 incubated at 65°C for 5 minutes. DNA samples were stocked at -20°C. DNA was amplified  
 486 through PCR using these conditions: 95°C for 2 minutes, 30 cycles of 95°C for 30 s, 55°C  
 487 (58°C for *P4H2* primers) for 30 s and 72°C for 45 s, and a final step at 72°C for 5 minutes.  
 488 The primers used were *XEG113* (forward: 5'- CCATGACTCTTTCACCTGAAA-3', reverse:  
 489 5'- CACAATGCAGGAGGTTTCATT-3'), *RRA1* (forward: 5'-  
 490 ACGTTTAGAGGATGTTTCCC-3', reverse: 5'- ATAATGGCTAGCTTCCAGAG-3'),  
 491 *RRA2* (forward: 5'- GCCAATCCATCCTGAACAATT-3', reverse: 5'-  
 492 GATATCTCATCGGAACCGTAG-3'), *P4H2* (forward: 5'-  
 493 CGGTGGTTGAATTGATGAATC-3', reverse: 5'- TCCTTGACCAAAGCCCATAAT-3')  
 494 and *Lbb1.3* (5'- ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3').

495 ***Immunolocalization of extensin epitopes***

496 Root tips were cut using a scalpel, placed onto a 10-wells superfrost diagnostic slide and fixed  
497 for 30 to 40 minutes by adding 20 µl of 4% paraformaldehyde diluted in 50 mM PIPES, 1  
498 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7. The liquid was removed gently by placing the pipette tip at the top of the  
499 root to limit the loss of border-like cells. Root tips were washed with 50 mM PIPES, 1 mM  
500 CaCl<sub>2</sub>, pH 7 and incubated for 30 to 45 minutes with 3% (w/v) bovine serum albumine diluted  
501 in Phosphate-Buffered Saline (PBS) 1X. After several washes with PBS 1X + 0.1% (v/v)  
502 Tween 20 (PBST), they were incubated overnight with the monoclonal primary antibody from  
503 PlantProbes ([www.plantprobes.net](http://www.plantprobes.net)) diluted at 1:5 with PBST at +4°C in a wet chamber. Five  
504 washes were then performed with PBST before incubation for 2 hours at Room Temperature  
505 (RT) in darkness with the Anti-rat IgG coupled with a FITC secondary antibody (SIGMA, ref:  
506 F6258) diluted at 1:30 in PBST, in a wet chamber. After washing with PBST, root tips were  
507 mounted in antifading agent (Citifluor AF2, Agar Scientific) and observed with an inverted  
508 confocal laser scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 507 – 550 nm). A  
509 glow filter was applied to all images. After adjusting a certain threshold using the ImageJ  
510 software, the fluorescence area was measured and was related to the observed root area to  
511 calculate the corresponding ratio. The threshold value differed between the antibodies.

512 ***Elicitation with Flg22 and treatment of the roots with anti-extensin antibodies***

513 7-day-old roots were elicited for 48 hours with 1 µM Flg22, synthesized and provided by Dr.  
514 J. Leprince and B. Lefranc (PRIMACEN platform, Normandy University).  
515 The monoclonal antibodies and anti-rat serum were desalted using Amicon® Ultra 0.5  
516 centrifugal 10 kDa filter devices (Millipore ®) to remove sodium azide, and reconcentrated at  
517 1 mg ml<sup>-1</sup> in 1X PBS buffer. Root tips were treated by adding 10 µl of a desalted antibody,  
518 anti-rat serum or PBS 1X directly in the culture dish and were incubated at RT for 2 hours.

519 ***Inoculation of roots with *Phytophthora parasitica* zoospores***

520 *Phytophthora parasitica* (Dastur) (Peronosporales) isolate Race 0 was kindly provided by Dr.  
521 Agnès Attard (INRA Sophia-Antipolis). The strain was cultivated on V8 medium  
522 supplemented with 1% (w/v) Bacto Agar. In order to produce zoospores, mycelia were  
523 cultivated in V8 liquid medium for 1 week at 25°C under continuous light. Then, mycelia  
524 were macerated and incubated for at least 4 more days on deionized water supplemented with  
525 2% agar (VWR chemicals, MFCD00081288). Zoospores were released from sporangia

526 through a heat shock by incubating at 4°C for 30 minutes then adding 10 ml of 37°C  
527 deionized water and incubating at RT for 30 minutes. For inoculation, 7-day-old *A. thaliana*  
528 seedlings were transferred in a Petri dish containing  $2.10^4$  zoospores in 10 ml of deionized  
529 water and incubated at RT and in darkness for 3 hours. Roots were collected and placed onto  
530 a 10-wells superfrost diagnostic slide, then fixed by adding 20  $\mu$ l of 4% paraformaldehyde for  
531 30 to 40 minutes at RT. After two washes with PBS 1X, zoospores were stained with 10  $\mu$ g  
532 ml<sup>-1</sup> propidium iodide diluted in PBS 1X for 3 minutes. One last wash with PBS 1X was  
533 performed and slides were observed with an inverted confocal laser scanning microscope  
534 Leica SP2 ( $\lambda_{excitation}$  : 561 nm;  $\lambda_{emission}$  : 570 – 612 nm). Number of accumulated zoospores  
535 was quantified in a 400  $\mu$ m long zone between the end of meristematic zone and beginning of  
536 elongation zone using the microscopy analysis software IMARIS (BITPLANE).

#### 537 ***Extraction of Alcohol Insoluble Residues (AIR)***

538 7-day-old roots were harvested in tubes containing beads (Lysing Matrix D, MP Biomedicals)  
539 and then crushed in 70% ethanol using FastPrep machine ( $6.5 \text{ m s}^{-1}$  for 30 s, 5 runs). In order  
540 to remove chlorophyll and pigments, ground material was incubated in 70% ethanol at 70°C  
541 for 45 min and under agitation. After centrifugation at 4000 g for 10 minutes, supernatant was  
542 discarded and pellet was resuspended in methanol:chloroform (1:1) then incubated under  
543 agitation for 2 hours at RT. After another centrifugation at 4000 g for 10 minutes, the  
544 supernatant was discarded and the pellet was resuspended in pure acetone then incubated  
545 under agitation for 2 hours at RT. A final centrifugation at 4000 g was performed for 10  
546 minutes, the supernatant was then discarded again and the pellet was air-dried overnight.

#### 547 ***Monosaccharide analysis by Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID)***

548 1 mg of AIR from roots was hydrolysed with 2 M trifluoroacetic acid (TFA) for 2 hours at  
549 110°C. After freeze-drying, samples were then converted in methylglycosides by incubating  
550 with 1 M methanol-HCl (Supelco) overnight at 80°C. Samples were air-dried, washed twice  
551 with methanol and then treated with a hexamethyldisilazane (HMDS) : trimethylchlorosilane  
552 (TMCS) : pyridine (3 : 1 : 9, Supelco) solution, for 20 minutes at 80°C. The resulting  
553 trimethylsilyl methyl glycosides were air-dried, resuspended in 1 ml of cyclohexane and  
554 injected in the 3800 GC system equipped of a CP-Sil5-CB capillary column (Agilent  
555 Technologies). Elution was performed with the following temperature gradient: 120°C to  
556 160°C at a rate of  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ , 160°C to 220°C at a rate of  $1.5^\circ\text{C min}^{-1}$ , 220°C to 280°C at a  
557 rate of  $20^\circ\text{C min}^{-1}$ . Quantification of each monosaccharide was carried out using standards

558 and response factors determined for each monosaccharide. Glucose was not taken into  
559 account since it could originate from the cell wall but also from starch.

560 *Sugar linkage analysis*

561 2 to 4 mg of AIR from roots were permethylated and derivated into Partially Methylated  
562 Alditol Acetate (PMAA). Samples were weighted in glass tubes with a PTFE screw cap and  
563 powdered sodium hydroxide dissolved in 1 ml dimethyl sulfoxide was added. After adding  
564 0.4 ml of iodomethane, each tube was immediately capped and placed in a carousel at RT for  
565 2 hours. 1 ml of deionized water was added and tubes were mixed. Then, 2 ml of chloroform  
566 were added and tubes were mixed thoroughly. Tubes were filled with deionized water and  
567 kept at 4°C for 2 hours. The water phase was discarded and the chloroform phase was washed  
568 eight times with deionized water and air-dried overnight. 0.5 ml of 2 M TFA was added prior  
569 to an incubation step at 100°C for 2 hours. Samples were air-dried and traces of TFA were  
570 removed twice by co-evaporation with 50% isopropanol under dry air flush. Samples were  
571 reduced overnight by a solution of 170 mM sodium borodeuteride in 1 M ammonium  
572 hydroxide. Excess of borodeuteride was neutralized by 0.2 ml of 30% acetic acid and boric  
573 acid was removed as methyl borate. Samples were treated with 1:1 acetic anhydride:pyridine  
574 at 100°C for 1 hour, air-dried and washed twice with 0.2 ml of toluol. PMAA were finally  
575 solubilized in cyclohexane prior to injection and analysis by GC-MS.

576 GC-MS experiments were performed using an Agilent 7890A gas chromatograph (Agilent  
577 Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled with a time-of-flight mass spectrometer GC-  
578 AccuTOF (JEOL, Tokyo, Japan) equipped with the Mass Center 3.1 data system.  
579 Chromatographic separations were obtained using a (30 m, 0.25 mm id, 0.25 µm film  
580 thickness, HP-5MS, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) capillary column. Helium  
581 was the carrier gas and the flow-rate was 0.8 ml min<sup>-1</sup>. The oven temperature was  
582 programmed initially from 100°C (1 minute hold time) to 160°C with a 10°C min<sup>-1</sup> ramp, then  
583 to 220°C with a 2°C min<sup>-1</sup> ramp and finally to 280°C with a 15°C min<sup>-1</sup> ramp. The final  
584 temperature hold time was 5 minutes (total run: 53 minutes). The temperatures of the injector  
585 and the interface were 250°C and 260°C, respectively. Injections of 1 µl were performed in  
586 splitless mode using an Agilent 7693A front injector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA,  
587 USA). Electron ionization mass spectra were recorded using an electron energy of 70 eV, an  
588 ionizing current of 300 µA and a detector voltage of 2200 V. The temperature of the ion  
589 source was 250°C. The *m/z* range was 35-650. The instrument mass resolution was 8000 (full

590 width at half maxima (FWHM)) and PDMS ion  $m/z$  207 was used as the internal reference.  
591 Sugar linkage analysis was deduced from the EI-MS fragmentation patterns of partially  
592 methylated alditol acetate derivatives according to intern database,  
593 <http://www.cerc.uga.edu/databases/PMAA> and (Sasaki et al., 2005).

594 *Statistical analysis*

595 Appropriate statistical tests were used according to the type of data and are described in the  
596 different figure legends. Pvalue < 0.05 was considered significant in all cases.

597



598 **Acknowledgments**

599           This work was supported by La Région Normandie, la Structure Fédérative de  
600 Recherche “Normandie vegetal” (FED 4277), le “Centre Mondial de l’Innovation” groupe  
601 Roullier, INSA Rouen, University of Rouen Normandie, CNRS, EFRD 31708, Labex SynOrg  
602 (ANR11-LABX-0029) and the CRUNCH network 20-13. Microscopy images were obtained  
603 on PRIMACEN (<http://www.primacen.fr>), the Cell Imaging Platform of Normandy, Faculty  
604 of Sciences, University of Rouen Normandie, 76821 Mont Saint Aignan.

605

606 **Table 1: List of selected mutants affected in extensin glycosylation used in the present**  
 607 **study.**

<b>Mutants</b>	<b>Mutant line</b>	<b>Name of gene</b>	<b>TAIR Accession number</b>	<b>Reference</b>
<i>xeg113</i>	SALK_066991C	xyloglucanase 113	AT2G35610	Gille <i>et al.</i> , 2009
<i>rra1</i>	SALK_085325C	reduced residual arabinose 1	AT1G75120	Egelund <i>et al.</i> , 2007
<i>rra2</i>	SALK_129345C	reduced residual arabinose 2	AT1G75110	Egelund <i>et al.</i> , 2007
<i>p4h2</i>	SALK_04128C	prolyl 4-hydroxylase 2	AT3G06300	Tiainen <i>et al.</i> , 2005

608

609

610 **Figure legends:**

611 **Figure 1: Extensin glycosylation**

612 Proline (Pro) residues are first hydroxylated into hydroxyprolines (Hyp). One galactopyranose  
 613 (Galp) is then transferred on the serine (Ser) residue and several arabinofuranose (Araf)  
 614 residues are transferred onto the hydroxyproline residues. The type of linkage and the  
 615 enzymes involved in extensin glycosylation are indicated. P4Hs: Prolyl-4-Hydroxylases ;  
 616 SGT1: Serine-GalactosylTransferase 1 ; HPAT1-3: HydroxyProline ArabinosylTransferase 1  
 617 to 3 ; XEG113: XyloEndoGlucanase 113 ; ExAD: Extensin Arabinose Deficient transferase.

618 This figure is adapted with permission from Velasquez *et al.*, 2012.

619

620 **Figure 2: Immunostaining of extensin epitopes on *Arabidopsis thaliana* root tips.**

621 Immunolabelling were performed on 9-day-old roots using the anti-extensin monoclonal  
 622 antibodies LM1 (A, B), JIM11 (C, D), JIM12 (E, F) and JIM20 (G, H). Roots were either  
 623 elicited with 1  $\mu$ M Flg22 (B, D, F, H) or not elicited (A, C, E, G). Images are 3D-  
 624 reconstructions of 1  $\mu$ m section stacks and were obtained with an inverted confocal laser  
 625 scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 507 – 550 nm). For each  
 626 condition, 5 plant root tips were observed. Scale bars = 50  $\mu$ m.

627 RT: Root tip. BLC + M: Border-like cells and mucilage.

628

629 **Figure 3: Quantification of fluorescence observed on *Arabidopsis thaliana* root tips**  
 630 **immunostained with different anti-extensin antibodies.**

631 Immunolabelling were performed on 9-day-old roots using the anti-extensin monoclonal  
 632 antibodies LM1, JIM11, JIM12 and JIM20. Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 or not  
 633 elicited. Fluorescence area was measured and was related to the observed root area to  
 634 calculate the corresponding ratio. For each condition, 5 plant root tips were observed and  
 635 quantified. Bars show the standard deviations. Populations do not follow a Normal  
 636 distribution (d'Agostino test at  $\alpha=5\%$ ,  $n=5$ ). Comparison elicited to non-elicited: Mann-  
 637 Withney test at  $\alpha=5\%$ .

638 ns: not significant \*: pvalue < 0.05 \*\*: pvalue < 0.01

639

640 **Figure 4: Immunostaining of extensin epitopes on *Arabidopsis thaliana rra2* mutant root**  
641 **tips.**

642 Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra2* mutant roots using the anti-extensin  
643 monoclonal antibodies LM1 (A, B) JIM11 (C, D), JIM12 (E, F) and JIM20 (G, H). Roots  
644 were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 (B, D, F, H) or not elicited (A, C, E, G). Images are 3D-  
645 reconstructions of 1  $\mu$ m section stacks and were obtained with an inverted confocal laser  
646 scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 507 – 550 nm). For each  
647 condition, 5 plant root tips were observed. Scale bars = 50  $\mu$ m.

648 RT: Root tip. BLC + M: Border-like cells and mucilage.

649

650 **Figure 5: Quantification of fluorescence observed on *Arabidopsis thaliana* mutant root**  
651 **tips immunostained with different anti-extensin antibodies.**

652 Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra1*, *rra2*, *xegl13*, *p4h2* mutant and wild-  
653 type roots using the anti-extensin monoclonal antibodies LM1, JIM11, JIM12 and JIM20.  
654 Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 or not elicited. Fluorescence area was measured  
655 and was related to the observed root area to calculate the corresponding ratio. For each  
656 condition, 5 plant root tips were observed. Graphs and statistical analyses are presented for  
657 each antibody in figures S6-9.

658

659 **Figure 6: Accumulation of zoospores over *Arabidopsis thaliana* mutant roots after 3**  
660 **hours of inoculation.**

661 Zoospores accumulated in an area between the end of the meristematic zone and the  
662 beginning of the elongation zone. (A) Accumulation of zoospores in a wild-type root  
663 observed in fluorescence and bright-field microscopy. Images were taken with an inverted  
664 confocal laser scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 561 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 570 – 612 nm).  
665 Scale bars = 100  $\mu$ m. RT: Root tip. Z: Zoospores. EZ: Elongation zone. MZ: Meristematic  
666 zone. (B) Zoospores stained with propidium iodide were counted in a 400  $\mu$ m long zone

667 between the end of the meristematic zone and the beginning of the elongation zone.  
 668 Combining data from 5 independent experiments. 18 values out of 243 were considered as  
 669 aberrant and removed by the ROUT method (Q=10%). Bars show the standard deviations.  
 670 Each population follows a Normal distribution (d'Agostino test at  $\alpha=5\%$ ,  $n\geq 36$ ). Variances  
 671 are not supposed equal (Fisher test at  $\alpha=5\%$ ). Comparison to the WT: t-test with Welch's  
 672 correction at  $\alpha=5\%$ .

673 \*: pvalue < 0.05 ; \*\*: pvalue < 0.01

674

675 **Figure 7: Monosaccharide composition analysis of AIR from 7-day-old *A. thaliana***  
 676 **mutant roots.**

677 (A) Monosaccharide composition was analysed by GC-FID using AIR extracted from 100  
 678 roots for both mutants and wild-type. Experiments were performed twice for *rfa2* mutant and  
 679 four times for WT and *xeg113* mutant. Bars show the standard deviations. Values are relative  
 680 proportions, therefore statistical analyses cannot be performed. (B) Linkage analysis was  
 681 performed by GC-MS using AIR extracted from 200 roots for *xeg113* mutant and wild-type  
 682 and from 100 roots for *rfa2* mutant. Experiments were performed twice for both mutants and  
 683 wild-type. Bars show the standard deviations. Values are relative proportions, therefore  
 684 statistical analyses cannot be performed.

685 **Figure 8: Proposition for the epitope structure recognized by the anti-extensin**  
 686 **monoclonal antibodies LM1, JIM11, JIM12 and JIM20.**

687 Epitope structure recognized by the LM1, JIM11, JIM12 and JIM20 anti-extensin mAbs,  
 688 based on our immunocytochemical observations performed on *Arabidopsis thaliana* mutants  
 689 impaired in extensin arabinosylation and wild-type roots. The JIM12 epitope would comprise  
 690 part or the entire structure containing the two first arabinoses and the galactose from the  
 691 extensin glycan moiety. The LM1, JIM11 and JIM20 epitopes may include the third arabinose  
 692 and/or following arabinose residues on the extensin glycan moiety.

693 Ser: Serine. Hyp: Hydroxyproline. Galp: Galactopyranose. Araf: Arabinofuranose

694 **Figure 9: Model illustrating the impact of extensin arabinosylation in *Arabidopsis***  
 695 ***thaliana* root colonization by the oomycete *Phytophthora parasitica*.**

696 Due to their correct arabinosylation, extensins would be already cross-linked (to a certain  
 697 extent) within the cell wall in non-infected roots. Root inoculation with *P. parasitica*  
 698 zoospores would activate various mechanisms of defence response, including a significant  
 699 increase of extensin cross-links forming a strong 3D network that reinforces the cell wall and  
 700 limits pathogen colonization. However, in the case of an incomplete arabinosylation of  
 701 extensins, very few (or no) cross-links would be formed even after oomycete inoculation,  
 702 modifying the cell wall organization and strength. This would result on increased zoospore  
 703 binding to root cells leading *in fine* to an amplified colonization by the pathogen.

704

705 **Figure S1: Accumulation of zoospores over antibody-treated *Arabidopsis thaliana* roots**  
 706 **after 3 hours of inoculation.**

707 Prior to inoculation with zoospores, 7-day-old roots were treated for 2 hours with PBS 1X  
 708 (Control) (A), 1 mg ml<sup>-1</sup> desalted Anti-rat serum or 1 mg ml<sup>-1</sup> desalted anti-extensin  
 709 monoclonal antibodies LM1 (B), JIM11 and JIM12. Observations were made with an inverted  
 710 confocal laser scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 561 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 570 – 612 nm).  
 711 Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ . RT: Root tip. Z: Zoospores. EZ: Elongation zone. MZ: Meristematic  
 712 zone. (C) Zoospores stained with propidium iodide were counted in a 400  $\mu\text{m}$  long zone  
 713 between the end of the meristematic zone and the beginning of the elongation zone.  
 714 Combining data from 3 independent experiments. 4 values out of 127 were considered as  
 715 aberrant and removed by the ROUT method (Q=2%). Bars show the standard deviations.  
 716 Populations from “Control” and “Anti-rat serum” do not follow a Normal distribution  
 717 (d’Agostino test at  $\alpha=5\%$ ,  $n \geq 24$ ). Comparison to control: Mann-Whitney test at  $\alpha=5\%$ .

718 \*: pvalue < 0.05

719 **Figure S2: Verification of mutant homozygosity.**

720 PCR were performed using DNA extracted from 3-week leaf to check the homozygosity of  
 721 *xeg113* (A), *rra1* (B), *rra2* (C) and *p4h2* (D) mutants. *XEG113*, *RRA1*, *RRA2* and *P4H2*  
 722 primers amplify a DNA fragment from the wild-type but not from the corresponding mutant.  
 723 The LBb1.3 primer amplifies mutant DNA fragment containing the T-DNA insertion. Water  
 724 was used as a negative control.

725 **Figure S3: Immunostaining of extensin epitopes on *Arabidopsis thaliana rra1* mutant**  
 726 **root tips.**

727 Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra1* mutant roots using the anti-extensin  
 728 monoclonal antibodies LM1 (A, B) JIM11 (C, D), JIM12 (E, F) and JIM20 (G, H). Roots  
 729 were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 (B, D, F, H) or not elicited (A, C, E, G). Images are 3D-  
 730 reconstructions of 1  $\mu$ m section stacks and were obtained with an inverted confocal laser  
 731 scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 507 – 550 nm). For each  
 732 condition, 5 plant root tips were observed. Scale bars = 50  $\mu$ m.

733 RT: Root tip. BLC + M: Border-like cells and mucilage.

734 **Figure S4: Immunostaining of extensin epitopes on *Arabidopsis thaliana p4h2* mutant**  
 735 **root tips.**

736 Immunolabelling were performed on 9-day-old *p4h2* mutant roots using the anti-extensin  
 737 monoclonal antibodies LM1 (A, B) JIM11 (C, D), JIM12 (E, F) and JIM20 (G, H). Roots  
 738 were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 (B, D, F, H) or not elicited (A, C, E, G). Images are 3D-  
 739 reconstructions of 1  $\mu$ m section stacks and were obtained with an inverted confocal laser  
 740 scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 507 – 550 nm). For each  
 741 condition, 5 plant root tips were observed. Scale bars = 50  $\mu$ m.

742 RT: Root tip. BLC + M: Border-like cells and mucilage.

743 **Figure S5: Immunostaining of extensin epitopes on *Arabidopsis thaliana xeg113* mutant**  
 744 **root tips.**

745 Immunolabelling were performed on 9-day-old *xeg113* mutant roots using the anti-extensin  
 746 monoclonal antibodies LM1 (A, B) JIM11 (C, D), JIM12 (E, F) and JIM20 (G, H). Roots  
 747 were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 (B, D, F, H) or not elicited (A, C, E, G). Images are 3D-  
 748 reconstructions of 1  $\mu$ m section stacks and were obtained with an inverted confocal laser  
 749 scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 507 – 550 nm). For each  
 750 condition, 5 plant root tips were observed. Scale bars = 50  $\mu$ m.

751 RT: Root tip. BLC + M: Border-like cells and mucilage.

752 **Figure S6: Quantification of fluorescence observed on *Arabidopsis thaliana* mutant root**  
 753 **tips immunostained with the LM1 antibody.**

754 (A) Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra1*, *rra2*, *xeg113*, *p4h2* mutant and wild-  
 755 type roots using the LM1 anti-extensin monoclonal antibody. Roots were either elicited with 1  
 756  $\mu$ M Flg22 or not elicited. Fluorescence area was measured and was related to the observed  
 757 root area to calculate the corresponding ratio. For each condition, 5 plant root tips were  
 758 observed. Bars show the standard deviations. (B), (C), (D) Results of the statistical analysis  
 759 using a Tukey's multiple comparisons test at  $\alpha=5\%$ .

760 ns: not significant \*: pvalue < 0.05 \*\*\*\*: pvalue <  $10^{-4}$

761 **Figure S7: Quantification of fluorescence observed on *Arabidopsis thaliana* mutant root**  
 762 **tips immunostained with the JIM11 antibody.**

763 (A) Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra1*, *rra2*, *xeg113*, *p4h2* mutant and wild-  
 764 type roots using the JIM11 anti-extensin monoclonal antibody. Roots were either elicited with  
 765 1  $\mu$ M Flg22 or not elicited. Fluorescence area was measured and was related to the observed  
 766 root area to calculate the corresponding ratio. For each condition, 5 plant root tips were  
 767 observed. Bars show the standard deviations. (B), (C), (D) Results of the statistical analysis  
 768 using a Tukey's multiple comparisons test at  $\alpha=5\%$ .

769 ns: not significant \*: pvalue < 0.05 \*\*: pvalue < 0.01 \*\*\*\*: pvalue <  $10^{-4}$

770 **Figure S8: Quantification of fluorescence observed on *Arabidopsis thaliana* mutant root**  
 771 **tips immunostained with the JIM12 antibody.**

772 (A) Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra1*, *rra2*, *xeg113*, *p4h2* mutant and wild-  
 773 type roots using the JIM12 anti-extensin monoclonal antibody. Roots were either elicited with  
 774 1  $\mu$ M Flg22 or not elicited. Fluorescence area was measured and was related to the observed  
 775 root area to calculate the corresponding ratio. For each condition, 5 plant root tips were  
 776 observed. Bars show the standard deviations. (B), (C), (D) Results of the statistical analysis  
 777 using a Tukey's multiple comparisons test at  $\alpha=5\%$ .

778 ns: not significant \*: pvalue < 0.05

779 **Figure S9: Quantification of fluorescence observed on *Arabidopsis thaliana* mutant root**  
 780 **tips immunostained with the JIM20 antibody.**

781 (A) Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra1*, *rra2*, *xeg113*, *p4h2* mutant and wild-  
 782 type roots using the JIM20 anti-extensin monoclonal antibody. Roots were either elicited with



783 1  $\mu$ M Flg22 or not elicited. Fluorescence area was measured and was related to the observed  
784 root area to calculate the corresponding ratio. For each condition, 5 plant root tips were  
785 observed. Bars show the standard deviations. **(B)**, **(C)**, **(D)** Results of the statistical analysis  
786 using a Tukey's multiple comparisons test at  $\alpha=5\%$ .

787 ns: not significant \*: pvalue < 0.05 \*\*: pvalue < 0.01 \*\*\*: pvalue < 0.001 \*\*\*\*: pvalue <  $10^{-4}$

788

789



## Parsed Citations

**Allard-Massicotte R, Tessier L, Lécuyer F, Lakshmanan V, Lucier J-F, Garneau D, Caudwell L, Vlamakis H, Bais HP, Beauregard PB (2016) *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *mBio* 7: e01664-16**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Attard A, Evangelisti E, Kebdani-Minet N, Panabières F, Deleury E, Maggio C, Ponchet M, Gourgues M (2014) Transcriptome dynamics of *Arabidopsis thaliana* root penetration by the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics* 15: 538**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Attard A, Gourgues M, Callemeyn-Torre N, Keller H (2010) The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytol* 187: 449–460**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Baetz U, Martinoia E (2014) Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends Plant Sci* 19: 90–98**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Balmer D, Mauch-Mani B (2013) More beneath the surface? Root versus shoot antifungal plant defenses. *Front Plant Sci* 4: 256**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2013) *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci* 110: E1621–E1630**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Bethke G, Thao A, Xiong G, Li B, Soltis NE, Hatsugai N, Hillmer RA, Katagiri F, Kliebenstein DJ, Pauly M, et al (2016) Pectin biosynthesis is critical for cell wall integrity and immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 28: 537–556**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Brownleader MD, Ahmed N, Trevan M, Chaplin MF, Dey PM (1995) Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiol* 109: 1115–1123**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

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

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Cannesan MA, Durand C, Burel C, Gangneux C, Lerouge P, Ishii T, Laval K, Follet-Gueye M-L, Driouich A, Vicre-Gibouin M (2012) Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. *Plant Physiol* 159: 1658–1670**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

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

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Cannon MC, Terneus K, Hall Q, Tan L, Wang Y, Wegenhart BL, Chen L, Lampion DT, Chen Y, Kieliszewski MJ (2008) Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proc Natl Acad Sci* 105: 2226–2231**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Chen Y, Dong W, Tan L, Held M, Kieliszewski M (2015) Arabinosylation plays a crucial role in extensin cross-linking in vitro. *Biochem***

**Insights 8(S2): 1–13**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Chormova D, Fry SC (2016) Boron bridging of rhamnogalacturonan-II is promoted in vitro by cationic chaperones, including polyhistidine and wall glycoproteins. *New Phytol* 209: 241–251**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Deepak S, Shailasree S, Kini RK, Muck A, Mithöfer A, Shetty SH (2010) Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defence. *J Phytopathol* 158: 585–593**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Dong W, Kieliszewski M, Held MA (2015) Identification of the pl 4.6 extensin peroxidase from *Lycopersicon esculentum* using proteomics and reverse-genomics. *Phytochemistry* 112: 151–159**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Driouich A, Durand C, Cannesan M-A, Percoco G, Vre-Gibouin M (2010) Border cells versus border-like cells: are they alike? *J Exp Bot* 61: 3827–3831**

**Driouich A, Follet-Gueye M-L, Vre-Gibouin M, Hawes M (2013) Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Curr Opin Plant Biol* 16: 489–495**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Egelund J, Obel N, Ulvskov P, Geshi N, Pauly M, Bacic A, Petersen BL (2007) Molecular characterization of two *Arabidopsis thaliana* glycosyltransferase mutants, *rra1* and *rra2*, which have a reduced residual arabinose content in a polymer tightly associated with the cellulosic wall residue. *Plant Mol Biol* 64: 439–451**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Ellinger D, Naumann M, Falter C, Zwikowics C, Jamrow T, Manisseri C, Somerville SC, Voigt CA (2013) Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 161: 1433–1444**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Engelsdorf T, Will C, Hofmann J, Schmitt C, Merritt BB, Rieger L, Frenger MS, Marschall A, Franke RB, Pattathil S, et al (2017) Cell wall composition and penetration resistance against the fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum* are affected by impaired starch turnover in *Arabidopsis* mutants. *J Exp Bot* 68: 701–713**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Erb M, Lenk C, Degenhardt J, Turlings TC (2009) The underestimated role of roots in defense against leaf attackers. *Trends Plant Sci* 14: 653–659**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Fragkostefanakis S, Sedeek KEM, Raad M, Zaki MS, Kalaitzis P (2014) Virus induced gene silencing of three putative prolyl 4-hydroxylases enhances plant growth in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Mol Biol* 85: 459–471**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Gille S, Hänsel U, Ziemann M, Pauly M (2009) Identification of plant cell wall mutants by means of a forward chemical genetic approach using hydrolases. *Proc Natl Acad Sci* 106: 14699–14704**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Held MA, Tan L, Kamyab A, Hare M, Shpak E, Kieliszewski MJ (2004) Di-isodityrosine is the intermolecular cross-link of isodityrosine-rich extensin analogs cross-linked in vitro. *J Biol Chem* 279: 55474–55482**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Huang Y, Wang Y, Tan L, Sun L, Petrosino J, Cui M-Z, Hao F, Zhang M (2016)** Nanospherical arabinogalactan proteins are a key component of the high-strength adhesive secreted by English ivy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E3193–E3202

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Jackson PAP, Galinha CIR, Pereira CS, Fortunato A, Soares NC, Amancio SBQ, Ricardo CPP (2001)** Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. *Plant Physiol* 127: 1065–1076

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Knox JP, Peart J, Neill SJ (1995)** Identification of novel cell surface epitopes using a leaf epidermal strip assay system. *Planta* 196: 266–270

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Koroney AS, Plasson C, Pawlak B, Sidikou R, Driouich A, Menu-Bouaouiche L, Vitré-Gibouin M (2016)** Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*. *Ann Bot* 118: 797–808

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Lampert DTA, Kieliszewski MJ, Chen Y, Cannon MC (2011)** Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiol* 156: 11–19

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Lanoue A, Burlat V, Henkes GJ, Koch I, Schurr U, Röse USR (2010a)** De novo biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley. *New Phytol* 185: 577–588

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Lanoue A, Burlat V, Schurr U, Röse US (2010b)** Induced root-secreted phenolic compounds as a belowground plant defense. *Plant Signal Behav* 5: 1037–1038

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Leroux O, Knox JP, Masschaele B, Bagniewska-Zadworna A, Marcus SE, Claeys M, van Hoorebeke L, Viane RLL (2011)** An extensin-rich matrix lines the carinal canals in *Equisetum ramosissimum*, which may function as water-conducting channels. *Ann Bot* 108: 307–319

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**MacDougall AJ, Brett GM, Morris VJ, Rigby NM, Ridout MJ, Ring SG (2001)** The effect of peptide–pectin interactions on the gelation behaviour of a plant cell wall pectin. *Carbohydr Res* 335: 115–126

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Merkouropoulos G, Shirsat AH (2003)** The unusual *Arabidopsis* extensin gene atExt1 is expressed throughout plant development and is induced by a variety of biotic and abiotic stresses. *Planta* 217: 356–366

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

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

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Møller SR, Yi X, Velásquez SM, Gille S, Hansen PLM, Poulsen CP, Olsen CE, Rejzek M, Parsons H, Zhang Y, et al (2017)** Identification and evolution of a plant cell wall specific glycoprotein glycosyl transferase, ExAD. *Sci Rep* 7: 45341

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Neumetzler L, Humphrey T, Lumba S, Snyder S, Yeats TH, Usadel B, Vasilevski A, Patel J, Rose JKC, Persson S, et al (2012)** The

**FRIABLE1 gene product affects cell adhesion in Arabidopsis. PLoS ONE 7: e42914**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Nguema-Ona E, Bannigan A, Chevalier L, Baskin TI, Driouich A (2007) Disruption of arabinogalactan proteins disorganizes cortical microtubules in the root of Arabidopsis thaliana: Arabinogalactan proteins and cortical microtubules. Plant J 52: 240–251**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Nguema-Ona E, Coimbra S, Vire-Gibouin M, Mollet J-C, Driouich A (2012) Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. Ann Bot 110: 383–404**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Nguema-Ona E, Vitré-Gibouin M, Cannesan M-A, Driouich A (2013) Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions. Trends Plant Sci 18: 440–449**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Niebel A, Engler JDA, Tire C, Engler G, Van Montagu M, Gheysen G (1993) Induction patterns of an extensin gene in tobacco upon nematode infection. Plant Cell 5: 1697–1710**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Núñez A, Fishman ML, Fortis LL, Cooke PH, Hotchkiss AT (2009) Identification of extensin protein associated with sugar beet pectin. J Agric Food Chem 57: 10951–10958**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Ogawa-Ohnishi M, Matsushita W, Matsubayashi Y (2013) Identification of three hydroxyproline O-arabinosyltransferases in Arabidopsis thaliana. Nat Chem Biol 9: 726–730**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Plancot B, Santaella C, Jaber R, Kiefer-Meyer MC, Follet-Gueye M-L, Leprince J, Gattin I, Souc C, Driouich A, Vire-Gibouin M (2013) Deciphering the responses of root border-like cells of Arabidopsis and flax to pathogen-derived elicitors. Plant Physiol 163: 1584–1597**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Price NJ, Pinheiro C, Soares CM, Ashford DA, Ricardo CP, Jackson PA (2003) A biochemical and molecular characterization of LEP1, an extensin peroxidase from Lupin. J Biol Chem 278: 41389–41399**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Reguera M, Abreu I, Brewin NJ, Bonilla I, Bolaños L (2010) Borate promotes the formation of a complex between legume AGP-extensin and Rhamnogalacturonan II and enhances production of Rhizobium capsular polysaccharide during infection thread development in Pisum sativum symbiotic root nodules: Boron mediated legume-Rhizobium cell surface interactions. Plant Cell Environ 33: 2112–2120**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Saito F, Suyama A, Oka T, Yoko-o T, Matsuoka K, Jigami Y, Shimma Y (2014) Identification of novel peptidyl serine  $\alpha$ -Galactosyltransferase gene family in plants. J Biol Chem 289: 20405–20420**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Sasaki GL, Gorin PAJ, Souza LM, Czelusniak PA, Iacomini M (2005) Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC–MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. Carbohydr Res 340: 731–739**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizedeh H, Lampion D (1996) Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val–Tyr–Lys as putative intermolecular cross-link site. Plant J 9: 477–489**

Pubmed: [Author and Title](#)

**Schulze-Lefert P (2004) Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. Curr Opin Plant Biol 7: 377–383**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Smallwood M, Beven A, Donovan N, Neill SJ, Peart J, Roberts K, Knox JP (1994) Localization of cell wall proteins in relation to developmental anatomy of the carrot root apex. Plant J 5: 237–246**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

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

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Smith JJ, Muldoon EP, Willard JJ, Lamport DT (1986) Tomato extensin precursors P1 and P2 are highly periodic structures. Phytochemistry 25: 1021–1030**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Tiainen P, Myllyharju J, Koivunen P (2005) Characterization of a second Arabidopsis thaliana prolyl 4-hydroxylase with distinct substrate specificity. J Biol Chem 280: 1142–1148**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Tran TM, MacIntyre A, Hawes M, Allen C (2016) Escaping underground nets: extracellular DNases degrade plant extracellular traps and contribute to virulence of the plant pathogenic bacterium Ralstonia solanacearum. PLOS Pathog 12: e1005686**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Underwood W, Somerville SC (2008) Focal accumulation of defences at sites of fungal pathogen attack. J Exp Bot 59: 3501–3508**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Valentin R, Cerclier C, Geneix N, Aguié-Béghin V, Gaillard C, Ralet M-C, Cathala B (2010) Elaboration of extensin–pectin thin film model of primary plant cell wall. Langmuir 26: 9891–9898**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Velasquez M, Salter JS, Dorosz JG, Petersen BL, Estevez JM (2012) Recent advances on the posttranslational modifications of EXTs and their roles in plant cell walls. Front Plant Sci 3: 93**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Velasquez SM, Marzol E, Borassi C, Pol-Fachin L, Ricardi MM, Mangano S, Juarez SPD, Salter JDS, Dorosz JG, Marcus SE, et al (2015) Low sugar is not always good: impact of specific O-glycan defects on tip growth in Arabidopsis. Plant Physiol 168: 808–813**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Velasquez SM, Ricardi MM, Dorosz JG, Fernandez PV, Nadra AD, Pol-Fachin L, Egelund J, Gille S, Harholt J, Ciancia M, et al (2011) O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. Science 332: 1401–1403**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

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

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

**Walker CA, van West P (2007) Zoospore development in the oomycetes. Fungal Biol Rev 21: 10–18**

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Watson BS, Bedair MF, Urbanczyk-Wochniak E, Huhman DV, Yang DS, Allen SN, Li W, Tang Y, Sumner LW (2015) Integrated Metabolomics and transcriptomics reveal enhanced specialized metabolism in Medicago truncatula root border cells. Plant Physiol 167: 1699–1716**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Wei G, Shirsat AH (2006) Extensin over-expression in Arabidopsis limits pathogen invasiveness. Mol Plant Pathol 7: 579–592**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Weiller F, Moore JP, Young P, Driouich A, Vivier MA (2016) The Brassicaceae species Heliophila coronopifolia produces root border-like cells that protect the root tip and secrete defensin peptides. Ann Bot 119: 803–813**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Wen F, Curlango-Rivera G, Huskey DA, Xiong Z, Hawes MC (2017) Visualization of extracellular DNA released during border cell separation from the root cap. Am J Bot 104: 970–978**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Wen F, VanEtten HD, Tsapralis G, Hawes MC (2007) Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. Plant Physiol 143: 773–783**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

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

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Wu Y, Fan W, Li X, Chen H, Takáč T, Šamajová O, Fabrice MR, Xie L, Ma J, Šamaj J, et al (2017) Expression and distribution of extensins and AGPs in susceptible and resistant banana cultivars in response to wounding and Fusarium oxysporum. Sci Rep 7: 42400**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

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

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Xie F, Williams A, Edwards A, Downie JA (2012) A plant arabinogalactan-like glycoprotein promotes a novel type of polar surface attachment by Rhizobium leguminosarum. Mol Plant Microbe Interact 25: 250–258**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

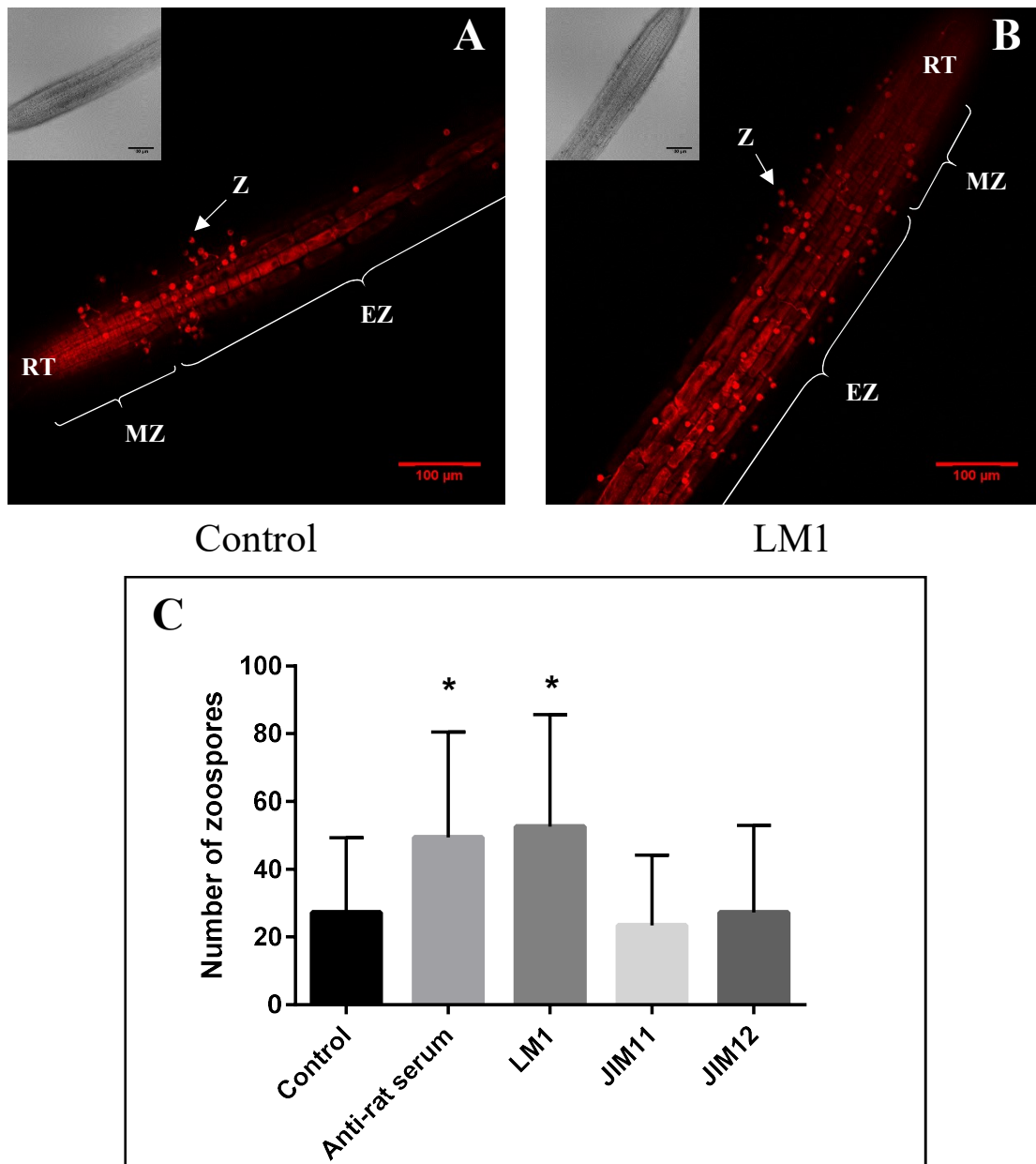
**Yu L, Zhou Y, Knox JP (2011) Ginseng root water-extracted pectic polysaccharides originate from secretory cavities. Planta 234: 487–499**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

**Yu X, Feng B, He P, Shan L (2017) From Chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. Annu Rev Phytopathol 55: 109–137**

Pubmed: [Author and Title](#)  
 CrossRef: [Author and Title](#)  
 Google Scholar: [Author Only Title Only Author and Title](#)

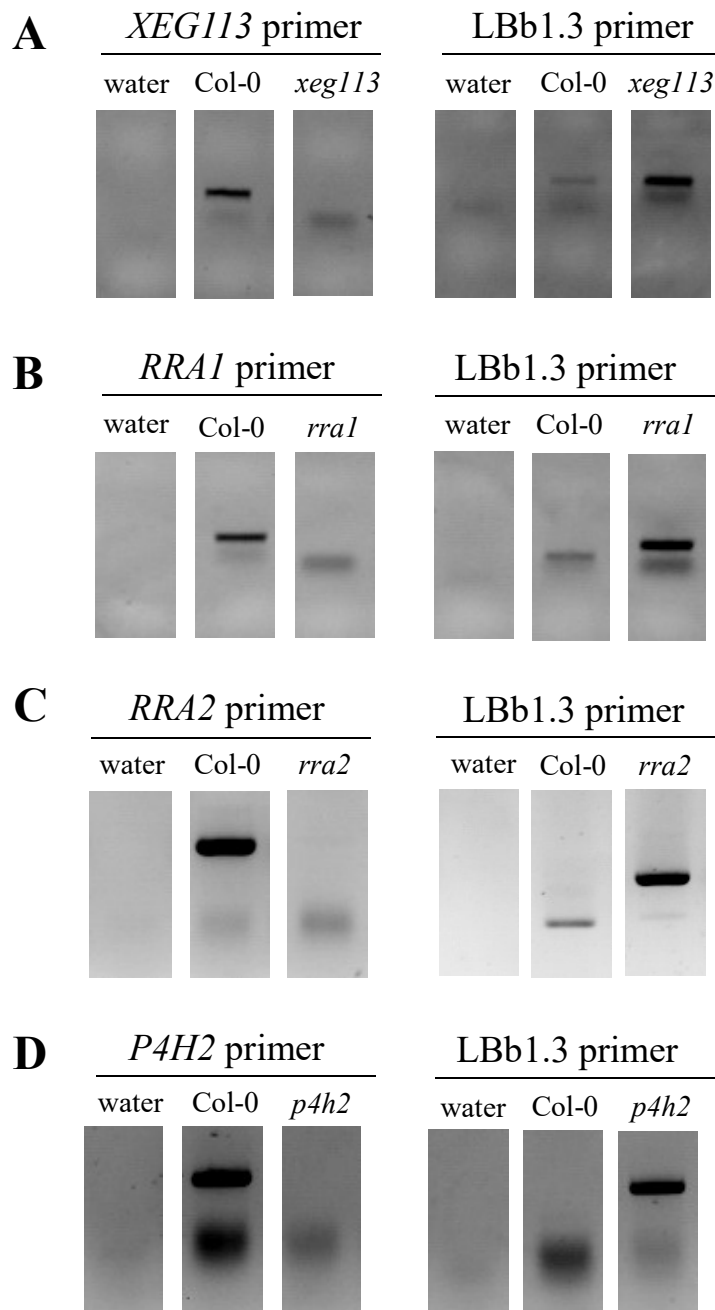




**Figure S1: Accumulation of zoospores over antibody-treated *Arabidopsis thaliana* roots after 3 hours of inoculation.**

Prior to inoculation with zoospores, 7-day-old roots were treated for 2 hours with PBS 1X (Control) (A), 1 mg ml<sup>-1</sup> desalted Anti-rat serum or 1 mg ml<sup>-1</sup> desalted anti-extensin monoclonal antibodies LM1 (B), JIM11 and JIM12. Observations were made with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 561 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 570 – 612 nm). Scale bars = 100 µm. RT: Root tip. Z: Zoospores. EZ: Elongation zone. MZ: Meristematic zone. (C) Zoospores stained with propidium iodide were counted in a 400 µm long zone between the end of the meristematic zone and the beginning of the elongation zone. Combining data from 3 independent experiments. 4 values out of 127 were considered as aberrant and removed by the ROUT method (Q=2%). Bars show the standard deviations. Populations from “Control” and “Anti-rat serum” do not follow a Normal distribution (d’Agostino test at  $\alpha=5\%$ ,  $n \geq 24$ ). Comparison to control: Mann-Whitney test at  $\alpha=5\%$ .

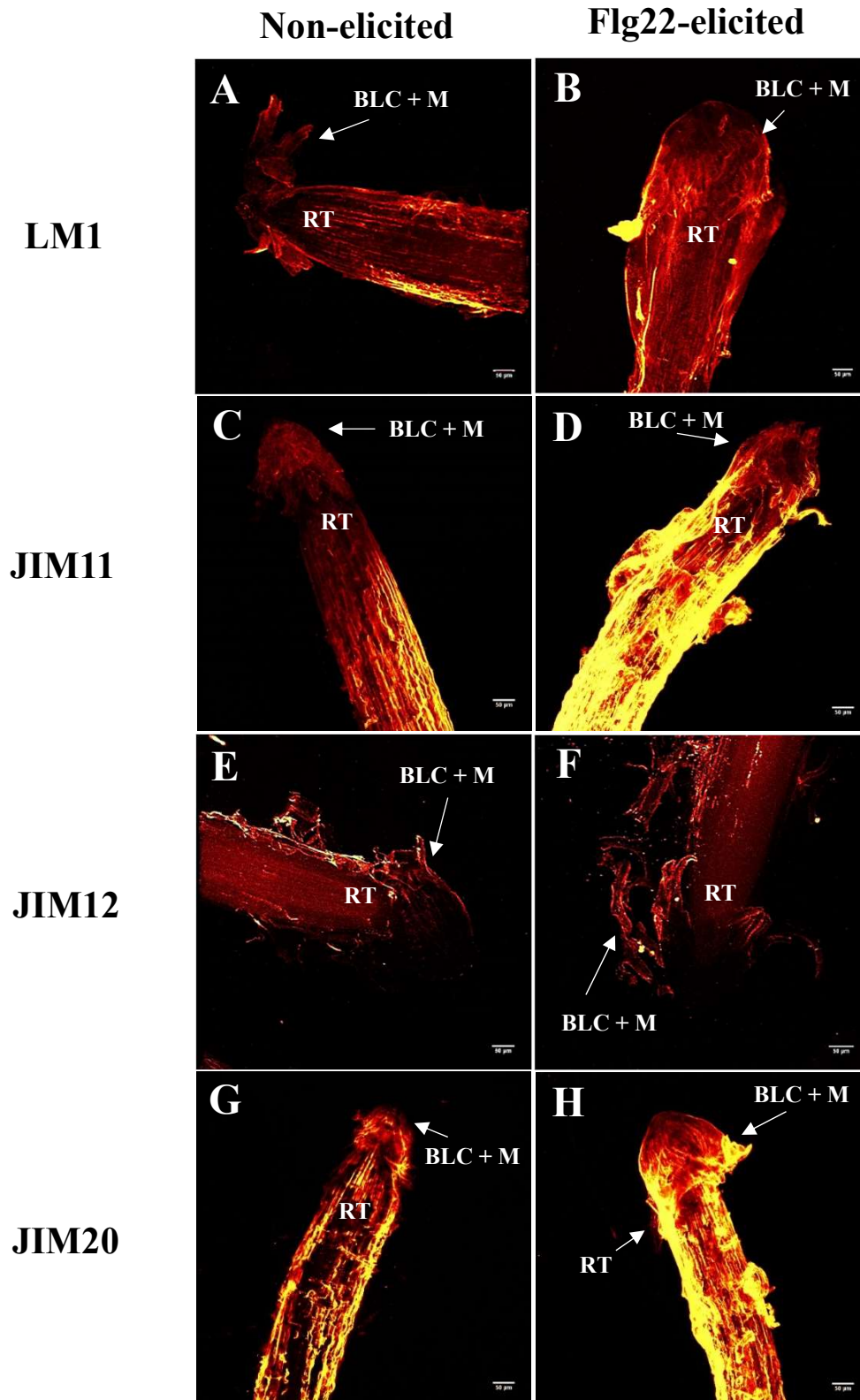
\*: pvalue < 0.05



**Figure S2: Verification of mutant homozygosity.**

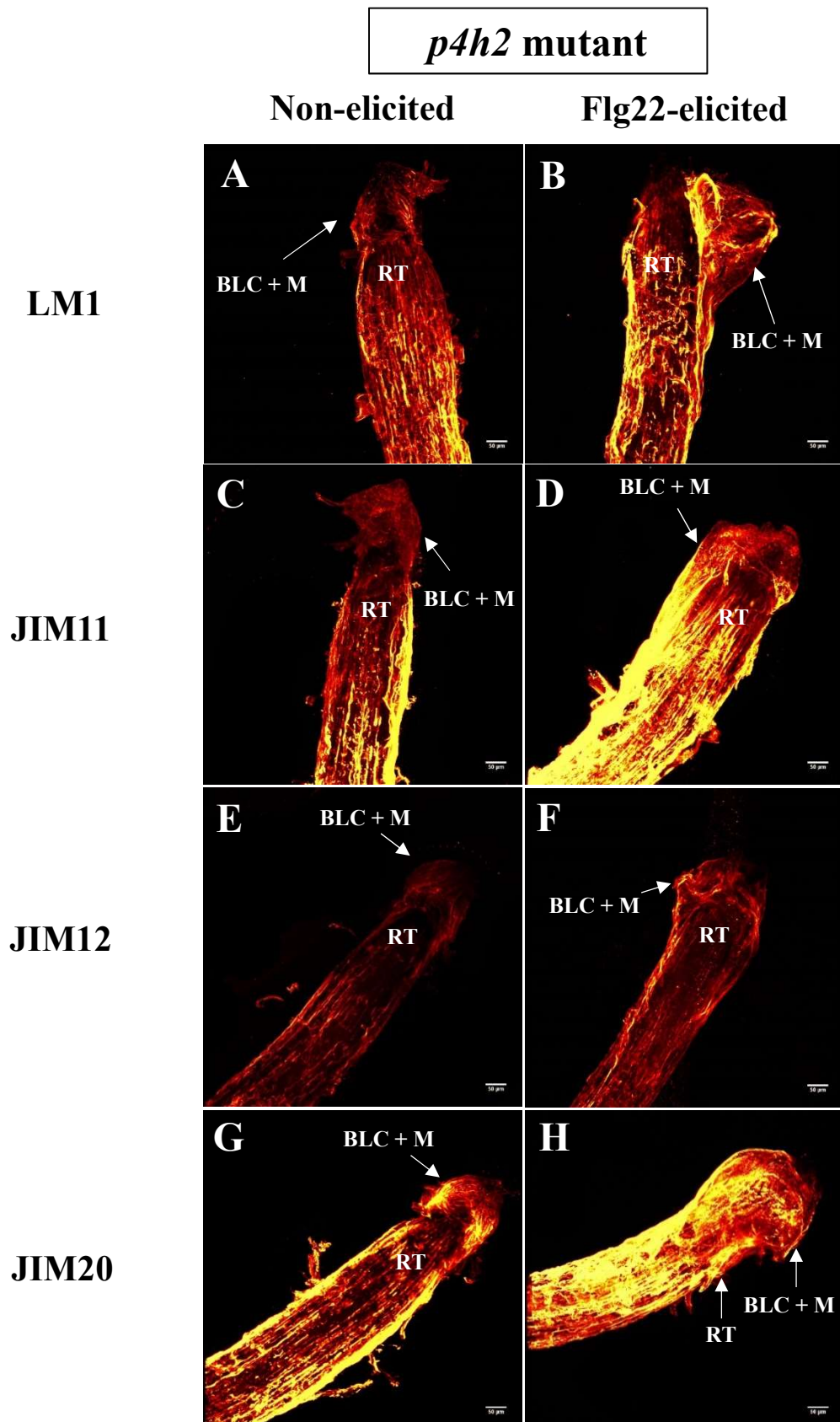
PCR were performed using DNA extracted from 3-week leaf to check the homozygosity of *xeg113* (A), *rra1* (B), *rra2* (C) and *p4h2* (D) mutants. *XEG113*, *RRA1*, *RRA2* and *P4H2* primers amplify a DNA fragment from the wild-type but not from the corresponding mutant. The LBb1.3 primer amplifies mutant DNA fragment containing the T-DNA insertion. Water was used as a negative control.

*rra1* mutant



**Figure S3: Immunostaining of extensin epitopes on *Arabidopsis thaliana rra1* mutant root tips.**

Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra1* mutant roots using the anti-extensin monoclonal antibodies LM1 (A, B) JIM11 (C, D), JIM12 (E, F) and JIM20 (G, H). Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 (B, D, F, H) or not elicited (A, C, E, G). Images are 3D-reconstructions of 1  $\mu$ m section stacks and were obtained with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 507 – 550 nm). For each condition, 5 plant root tips were observed. Scale bars = 50  $\mu$ m. RT: Root tip. BLC + M: Border-like cells and mucilage.

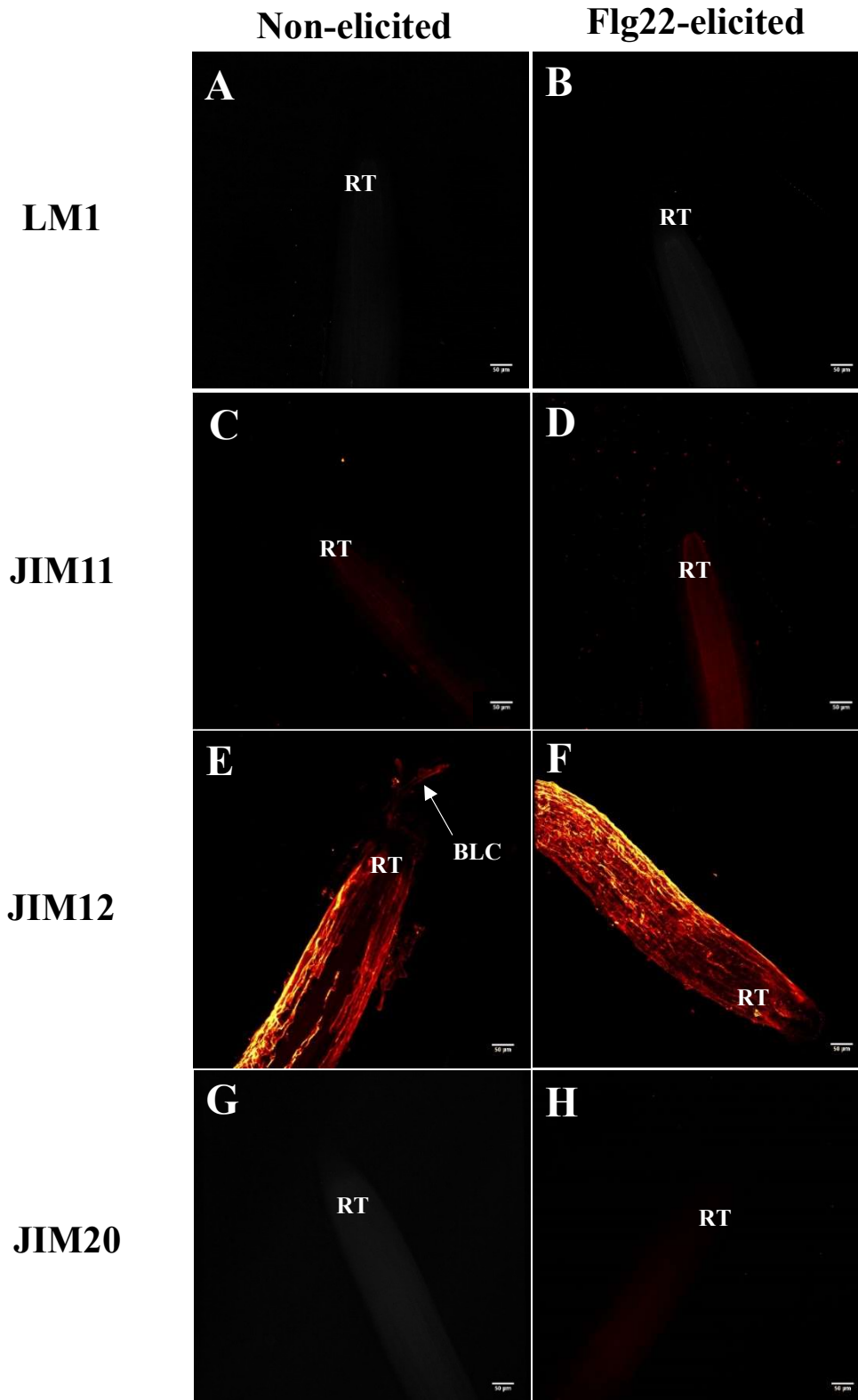


**Figure S4: Immunostaining of extensin epitopes on *Arabidopsis thaliana p4h2* mutant root tips.**

Immunolabelling were performed on 9-day-old *p4h2* mutant roots using the anti-extensin monoclonal antibodies LM1 (A, B) JIM11 (C, D), JIM12 (E, F) and JIM20 (G, H). Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 (B, D, F, H) or not elicited (A, C, E, G). Images are 3D-reconstructions of 1  $\mu$ m section stacks and were obtained with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 507 – 550 nm). For each condition, 5 plant root tips were observed. Scale bars = 50  $\mu$ m.

RT: Root tip. BLC + M: Border-like cells and mucilage.

*xeg113* mutant

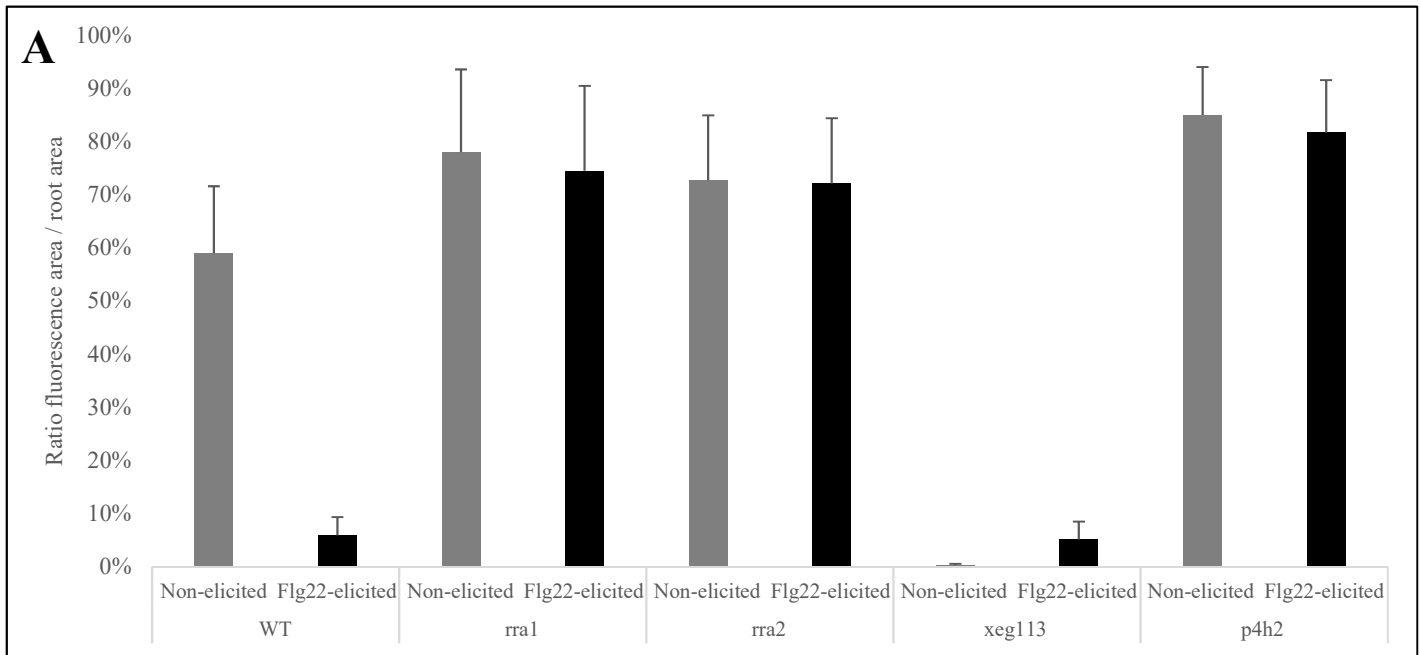


**Figure S5: Immunostaining of extensin epitopes on *Arabidopsis thaliana* *xeg113* mutant root tips.**

Immunolabelling were performed on 9-day-old *xeg113* mutant roots using the anti-extensin monoclonal antibodies LM1 (A, B) JIM11 (C, D), JIM12 (E, F) and JIM20 (G, H). Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 (B, D, F, H) or not elicited (A, C, E, G). Images are 3D-reconstructions of 1  $\mu$ m section stacks and were obtained with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 507 – 550 nm). For each condition, 5 plant root tips were observed. Scale bars = 50  $\mu$ m.

RT: Root tip. BLC + M: Border-like cells and mucilage.

LM1



**B**

		Non-elicited condition				
		WT	<i>rra1</i>	<i>rra2</i>	<i>xeg113</i>	<i>p4h2</i>
	WT		ns	ns	****	*
	<i>rra1</i>	ns		ns	****	ns
	<i>rra2</i>	ns	ns		****	ns
	<i>xeg113</i>	****	****	****		****
	<i>p4h2</i>	*	ns	ns	****	

**C**

		Elicited condition				
		WT	<i>rra1</i>	<i>rra2</i>	<i>xeg113</i>	<i>p4h2</i>
	WT		****	****	ns	****
	<i>rra1</i>	****		ns	****	ns
	<i>rra2</i>	****	ns		****	ns
	<i>xeg113</i>	ns	****	****		****
	<i>p4h2</i>	****	ns	ns	****	

**D**

		Non-elicited vs Elicited
	WT	****
	<i>rra1</i>	ns
	<i>rra2</i>	ns
	<i>xeg113</i>	ns
	<i>p4h2</i>	ns

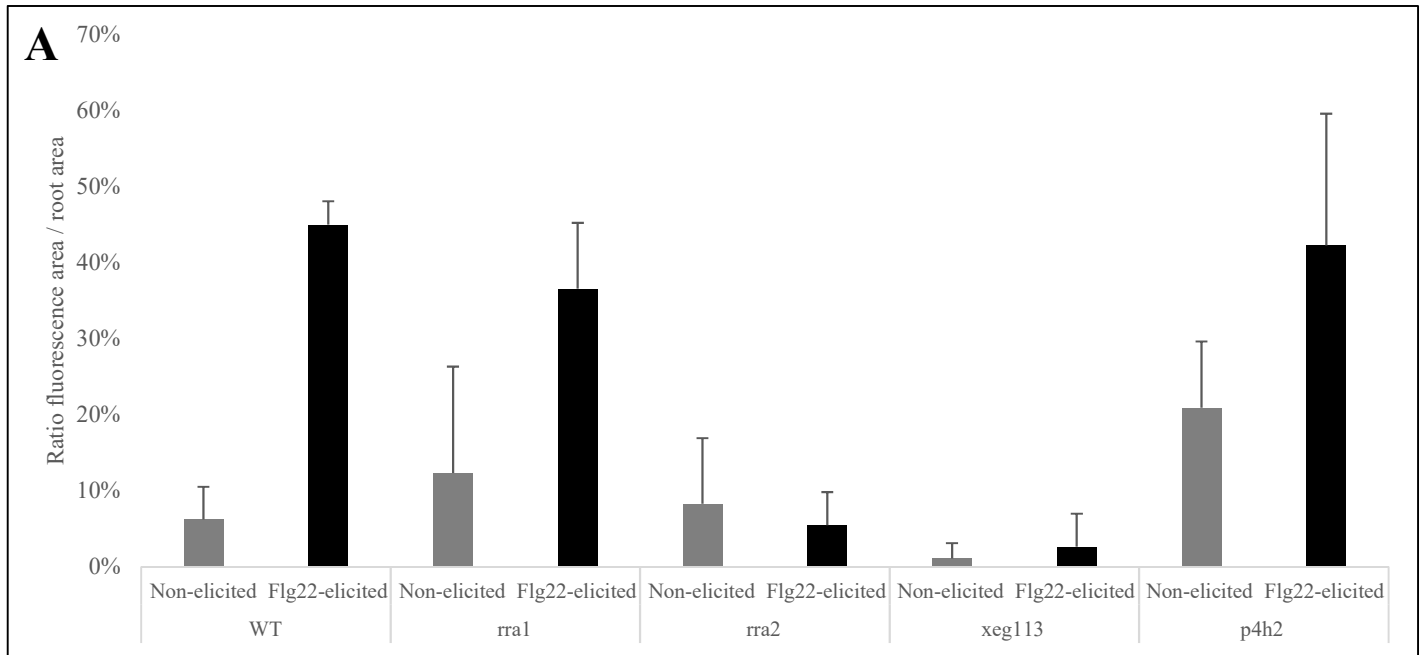
**Figure S6: Quantification of fluorescence observed on *Arabidopsis thaliana* mutant root tips immunostained with the LM1 antibody.**

(A) Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra1*, *rra2*, *xeg113*, *p4h2* mutant and wild-type roots using the LM1 anti-extensin monoclonal antibody. Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 or not elicited. Fluorescence area was measured and was related to the observed root area to calculate the corresponding ratio. For each condition, 5 plant root tips were observed. Bars show the standard deviations.

(B), (C), (D) Results of the statistical analysis using a Tukey's multiple comparisons test at  $\alpha=5\%$ .

ns: not significant \*; pvalue < 0.05 \*\*\*\*: pvalue <  $10^{-4}$

**JIM11**



**B**

		Non-elicited condition				
		WT	<i>rra1</i>	<i>rra2</i>	<i>xeg113</i>	<i>p4h2</i>
	WT		ns	ns	ns	ns
	<i>rra1</i>	ns		ns	ns	ns
	<i>rra2</i>	ns	ns		ns	ns
	<i>xeg113</i>	ns	ns	ns		*
	<i>p4h2</i>	ns	ns	ns	*	

**C**

		Elicited condition				
		WT	<i>rra1</i>	<i>rra2</i>	<i>xeg113</i>	<i>p4h2</i>
	WT		ns	****	****	ns
	<i>rra1</i>	ns		****	****	ns
	<i>rra2</i>	****	****		ns	****
	<i>xeg113</i>	****	****	ns		****
	<i>p4h2</i>	ns	ns	****	****	

**D**

		Non-elicited vs Elicited
	WT	****
	<i>rra1</i>	**
	<i>rra2</i>	ns
	<i>xeg113</i>	ns
	<i>p4h2</i>	*

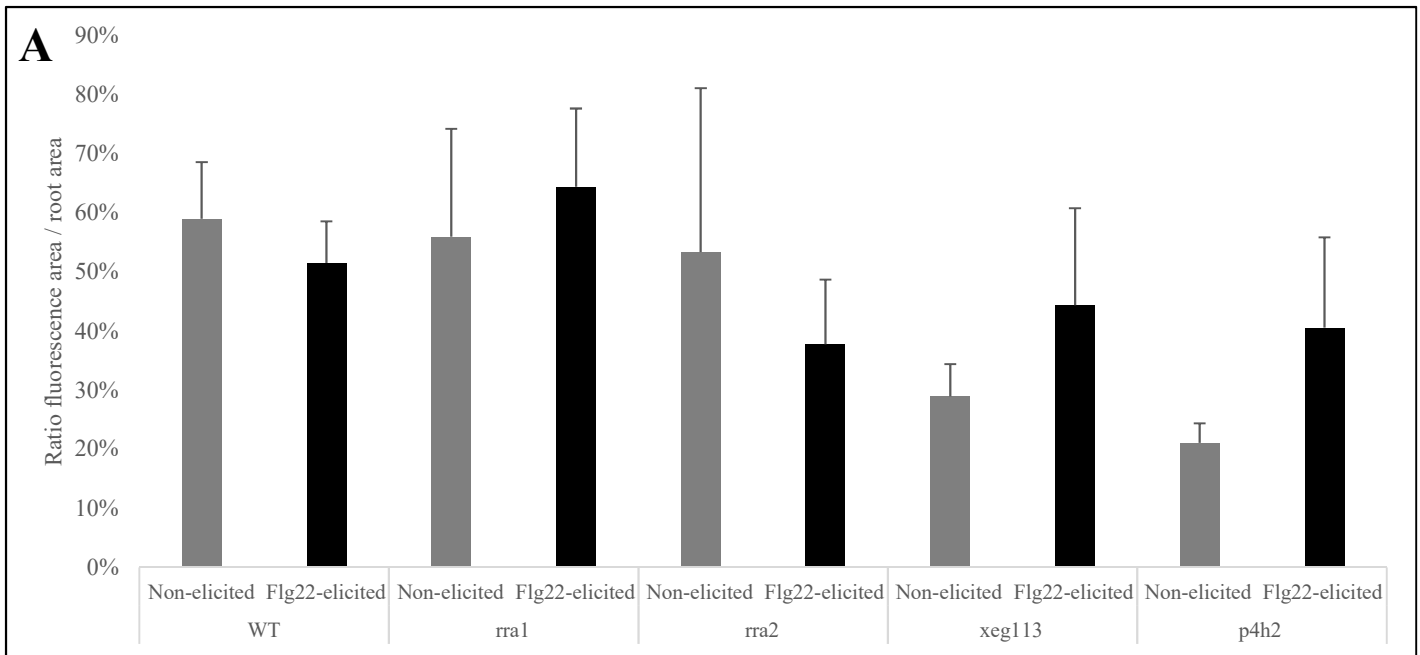
**Figure S7: Quantification of fluorescence observed on *Arabidopsis thaliana* mutant root tips immunostained with the JIM11 antibody.**

(A) Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra1*, *rra2*, *xeg113*, *p4h2* mutant and wild-type roots using the JIM11 anti-extensin monoclonal antibody. Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 or not elicited. Fluorescence area was measured and was related to the observed root area to calculate the corresponding ratio. For each condition, 5 plant root tips were observed. Bars show the standard deviations.

(B), (C), (D) Results of the statistical analysis using a Tukey's multiple comparisons test at  $\alpha=5\%$ .

ns: not significant \*: pvalue < 0.05 \*\*: pvalue < 0.01 \*\*\*\*: pvalue <  $10^{-4}$

**JIM12**



**B**

		Non-elicited condition				
		WT	<i>rra1</i>	<i>rra2</i>	<i>xeg113</i>	<i>p4h2</i>
Genotype	WT		ns	ns	ns	*
	<i>rra1</i>	ns		ns	ns	*
	<i>rra2</i>	ns	ns		ns	ns
	<i>xeg113</i>	ns	ns	ns		ns
	<i>p4h2</i>	*	*	ns	ns	

**C**

		Elicited condition				
		WT	<i>rra1</i>	<i>rra2</i>	<i>xeg113</i>	<i>p4h2</i>
Genotype	WT		ns	ns	ns	ns
	<i>rra1</i>	ns		ns	ns	ns
	<i>rra2</i>	ns	ns		ns	ns
	<i>xeg113</i>	ns	ns	ns		ns
	<i>p4h2</i>	ns	ns	ns	ns	

**D**

Non-elicited vs Elicited	
Genotype	Comparison
WT	ns
<i>rra1</i>	ns
<i>rra2</i>	ns
<i>xeg113</i>	ns
<i>p4h2</i>	ns

**Figure S8: Quantification of fluorescence observed on *Arabidopsis thaliana* mutant root tips immunostained with the JIM12 antibody.**

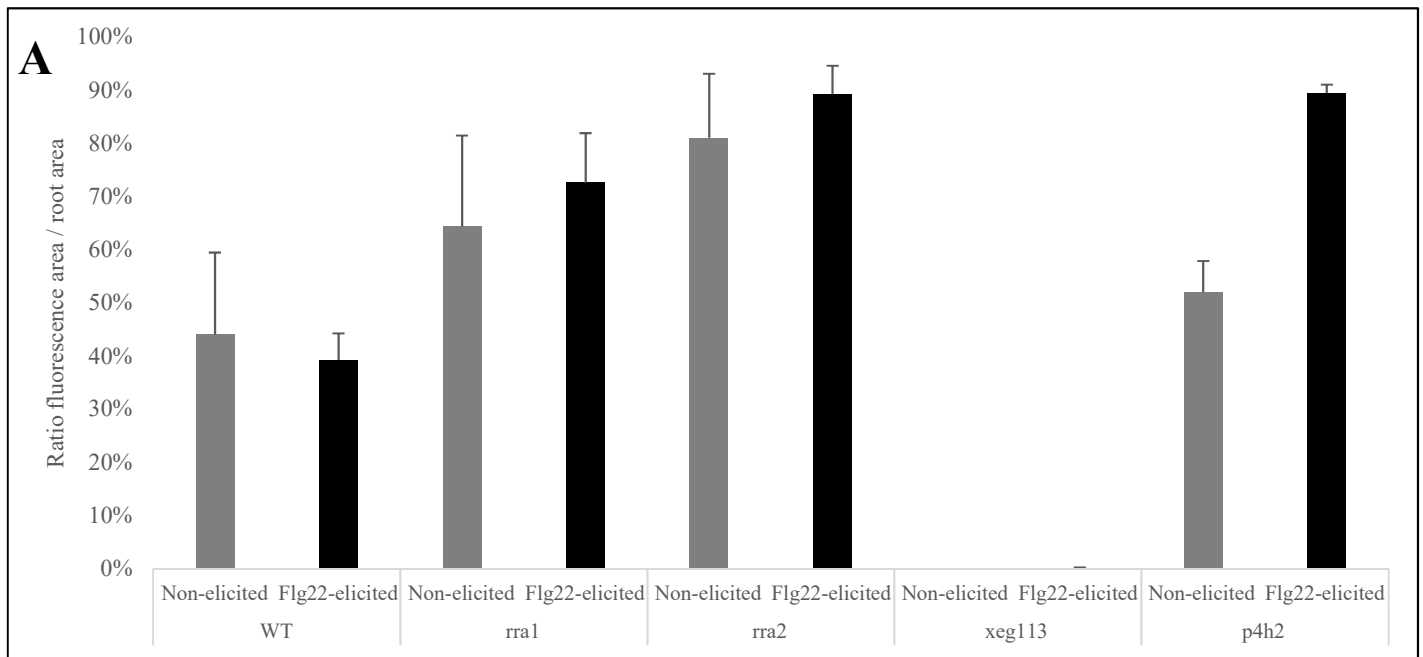
(A) Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra1*, *rra2*, *xeg113*, *p4h2* mutant and wild-type roots using the JIM12 anti-extensin monoclonal antibody. Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 or not elicited. Fluorescence area was measured and was related to the observed root area to calculate the corresponding ratio. For each condition, 5 plant root tips were observed. Bars show the standard deviations.

(B), (C), (D) Results of the statistical analysis using a Tukey's multiple comparisons test at  $\alpha=5\%$ .

ns: not significant \*: pvalue < 0.05



**JIM20**



**B**

		Non-elicited condition				
		WT	<i>rra1</i>	<i>rra2</i>	<i>xeg113</i>	<i>p4h2</i>
Genotype	WT		ns	****	****	****
	<i>rra1</i>	ns		*	****	*
	<i>rra2</i>	****	*		****	ns
	<i>xeg113</i>	****	****	****		****
	<i>p4h2</i>	****	*	ns	****	

**C**

		Elicited condition				
		WT	<i>rra1</i>	<i>rra2</i>	<i>xeg113</i>	<i>p4h2</i>
Genotype	WT		***	****	***	ns
	<i>rra1</i>	***		ns	****	ns
	<i>rra2</i>	****	ns		****	**
	<i>xeg113</i>	***	****	****		****
	<i>p4h2</i>	ns	ns	**	****	

**D**

		Non-elicited vs Elicited
Genotype	Condition	ns
<i>rra1</i>	Non-elicited	ns
	Elicited	ns
	Non-elicited	ns
	Elicited	***

**Figure S9: Quantification of fluorescence observed on *Arabidopsis thaliana* mutant root tips immunostained with the JIM20 antibody.**

(A) Immunolabelling were performed on 9-day-old *rra1*, *rra2*, *xeg113*, *p4h2* mutant and wild-type roots using the JIM20 anti-extensin monoclonal antibody. Roots were either elicited with 1  $\mu$ M Flg22 or not elicited. Fluorescence area was measured and was related to the observed root area to calculate the corresponding ratio. For each condition, 5 plant root tips were observed. Bars show the standard deviations.

(B), (C), (D) Results of the statistical analysis using a Tukey's multiple comparisons test at  $\alpha=5\%$ .

ns: not significant \*: pvalue < 0.05 \*\*: pvalue < 0.01 \*\*\*: pvalue < 0.001 \*\*\*\*: pvalue <  $10^{-4}$





## 3.2 Caractérisation préliminaire de mutants affectés dans la production de peroxydases

### 3.2.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié le rôle des extensines dans la défense en se focalisant sur leur glycosylation. En effet, la partie glycanique permet de conférer aux extensines une conformation particulière, nécessaire à leur « cross-linking » via les résidus tyrosines (Schnabelrauch *et al.*, 1996; Velasquez *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). Ce « cross-linking » résulte ainsi de liaisons dityrosine, pulchérosine ou di-isodytrosine (Smith *et al.*, 1986; Held *et al.*, 2004; Lamport *et al.*, 2011) et est catalysé par des peroxydases spécifiques. Si certaines de ces « extensine peroxydases » ont déjà été caractérisées chez la tomate (Brownleader *et al.*, 1995; Schnabelrauch *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 2015) et le lupin (Price *et al.*, 2003), aucune n'a, à notre connaissance, été mise en évidence chez *Arabidopsis thaliana*. Nous nous sommes basés sur la bibliographie existante et plus particulièrement sur les travaux de Francoz *et al.* publiés en 2015 (Francoz *et al.*, 2015) pour sélectionner un certain nombre de « mutants peroxydases » dont le gène muté est normalement exprimé dans la racine et qui paraissaient de bons candidats pour cette étude (**Tableau 3**). Une collaboration a alors été entreprise avec le Pr. Christophe Dunand et le Dr. Philippe Ranocha du Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV, UMR 5546-UPS/CNRS) de Toulouse qui nous ont conseillé sur le choix des mutants et nous ont généreusement fourni les graines utilisées dans cette étude.

Mutants	Référence du gène	Commentaire	Référence
<i>p03a</i> <sup>1</sup> et <i>p03b</i> <sup>2</sup>	At1g05260	Induction par le froid. Impliqué dans la réponse à un stress biotique	Francoz et al., 2015
<i>p04a</i> <sup>1</sup> et <i>p04b</i> <sup>1</sup>	At1g14540	Rôle potentiel dans la résistance au pathogène. Mutant plus sensible à <i>Botrytis cinerea</i>	Francoz et al., 2015
<i>p30a</i> <sup>2</sup> et <i>p30b</i> <sup>2</sup>	At3g21770	Impliqué dans la réponse à un stress oxydatif	Francoz et al., 2015
<i>p69a</i> <sup>2</sup> et <i>p69b</i> <sup>1</sup>	At5g64100	Impliqué dans la réponse à un stress oxydatif	Francoz et al., 2015
<i>p53b</i> <sup>2</sup>	At5g06720	Gène surexprimé lors de la réponse à une blessure physique et au nématode <i>Heterodera schachtii</i>	Francoz et al., 2015
<i>p54a</i> <sup>2</sup>	At5g06730	Impliqué dans la réponse à un stress oxydatif	Francoz et al., 2015
<i>OE p53 1.0</i> <sup>3</sup> et <i>OE p53 2.0</i> <sup>3</sup>	At5g06720	Surexprimeur du gène codant pour la peroxydase 53. Graines fournies au Pr. Christophe Dunand par le Pr. Thomas J. Baum (Iowa State University)	Communication C. Dunand
<i>35S:p54a.1</i> <sup>3</sup> et <i>35S:p54a.5</i> <sup>3</sup>	At5g06730	Surexprimeur du gène codant pour le peroxydase 54	Communication C. Dunand
<i>p54a compl 1</i> <sup>3</sup> et <i>p54a compl 6</i> <sup>3</sup>	At5g06730	Mutant <i>p54a</i> complémenté	Communication C. Dunand
<i>ARNi p53 p54</i> <sup>3</sup>	At5g06720, At5g06730	Double mutant	Communication C. Dunand
<i>p33*p34</i>	At3g49110, At3g49120	Double mutant. Rôle dans l'élongation cellulaire et la défense.	Communication C. Dunand

**Tableau 3 : Liste des « mutants peroxydases » utilisés dans la présente étude.**

Ces mutants ont pour fond génétique Col-0 et ont été généreusement fournis par le Pr. Christophe Dunand et le Dr. Philippe Ranocha du Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV, UMR 5546-UPS/CNRS) de Toulouse. Les mutants ont été sélectionnés et reçus en plusieurs fois, d'où cette répartition en séries. Le double mutant *p33\*p34* ne fait partie d'aucune série car il a été sélectionné seul et en dernier.

<sup>1</sup>: Mutants de la série 1

<sup>2</sup>: Mutants de la série 2

<sup>3</sup>: Mutants de la série 3

Dans ce projet, nous avons dans un premier temps examiné si ces mutants présentaient un phénotype particulier au niveau de la racine. Pour cela, nous avons mesuré la longueur des racines et observé l'aspect général des cellules apparentées aux cellules bordantes (BLCs : Border-Like Cells) ainsi que la production de mucilage. Nous avons également réalisé une inoculation avec l'oomycète *Phytophthora parasitica* pour étudier leur sensibilité à la colonisation de ce pathogène. Enfin nous avons réalisé des immunomarquages au niveau de la pointe racinaire avec l'anticorps anti-extensine LM1 afin de voir si la mutation pouvait affecter la distribution des épitopes associés aux extensines.

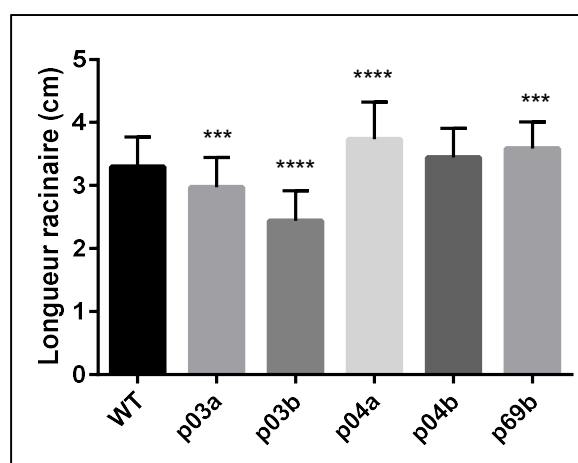
Remarque : Toutes ces expériences sont préliminaires. De plus, la sélection de mutants pour ce projet s'est faite en plusieurs fois, d'où la répartition en séries. Ceci explique que certaines expériences n'ont été réalisées que pour certains mutants et que certains résultats n'ont pu être regroupés.

## 3.2.2 Résultats

### 3.2.2.1 Phénotype racinaire

#### ➤ Mesure de la croissance racinaire

Dans un premier temps, nous avons observé la racine de différents mutants après 7 jours de culture afin de déterminer si ceux-ci présentaient un phénotype particulier. Pour cela, nous avons mesuré la longueur de la racine des mutants et comparé avec celle du sauvage (**Figure 13**, **Figure 14** et **Figure 15**). Parmi les mutants de la première série, *p04a* et *p69b* présentent ainsi une racine significativement plus longue (13% et 9% respectivement) alors que *p03a* et *p03b* présentent une racine significativement plus courte (10 et 23% respectivement) (**Figure 13**). Aucune différence n'a été observée chez le mutant *p04b* (**Figure 13**).

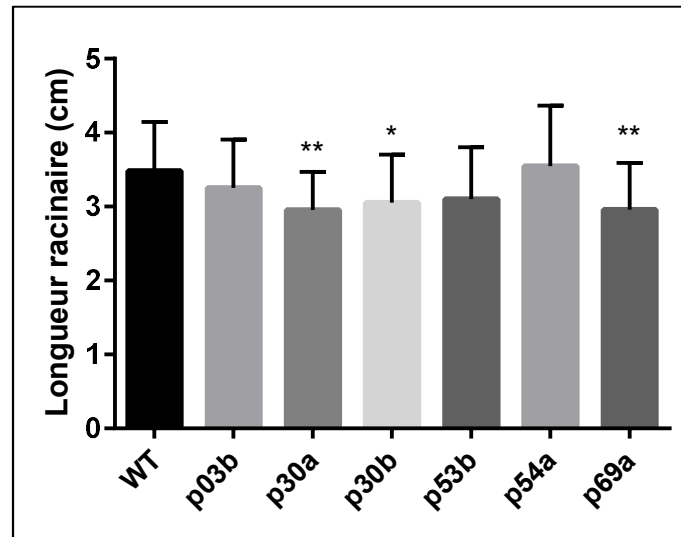


**Figure 13** : Longueur des racines de « mutants peroxydases » de la première série après 7 jours de culture.

La longueur des racines a été mesurée après 7 jours à partir de photos des boîtes de culture et en utilisant le logiciel ImageJ. Ces résultats sont issus de 4 expériences indépendantes.

$n \geq 33$ , chaque population suit une loi Normale (test de D'Agostino à  $\alpha = 5\%$ ) sauf « *p04a* ». Les variances des populations « WT », « *p03a* », « *p03b* », « *p04b* » et « *p69b* » sont supposées égales (test de Fisher à  $\alpha = 5\%$ ). Comparaison de « *p03a* », « *p03b* », « *p04b* » et « *p69b* » par rapport au sauvage (WT): t-test à  $\alpha = 5\%$ . Comparaison de « *p04a* » par rapport au sauvage (WT): Test de Mann-Whitney à  $\alpha = 5\%$ . \*\*\*:  $p$ value < 0.001 \*\*\*\*:  $p$ value <  $10^{-4}$

Parmi les mutants de la seconde série, *p30a*, *p30b* et *p69a* présentent une racine significativement plus courte (15%, 12% et 15% respectivement) tandis que la longueur racinaire des mutants *p03b*, *p53b* et *p54a* est similaire à celle du sauvage (**Figure 14**).

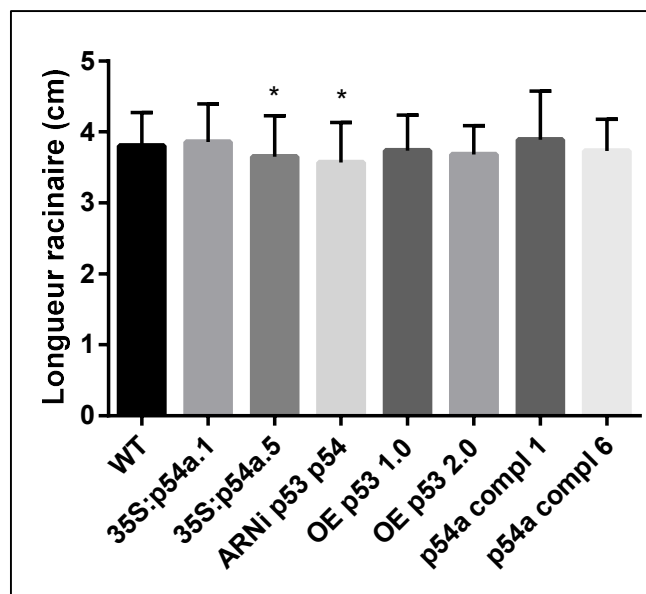


**Figure 14 : Longueur des racines de « mutants peroxydases » de la seconde série après 7 jours de culture.**

*La longueur des racines a été mesurée après 7 jours à partir de photos des boîtes de culture et en utilisant le logiciel ImageJ. Ces résultats sont issus de 2 expériences indépendantes.*

*n ≥ 26, les populations « WT », « p30b » et « p69a » ne suivent pas une loi Normale (test de D'Agostino à α = 5%). Comparaison de chaque mutant par rapport au sauvage (WT): Test de Mann-Whitney à α = 5%. \*: pvalue < 0.05 \*\*: pvalue < 0.01*

Enfin parmi les mutants de la troisième série, seuls *35S:p54a.5* et *ARNi p53 p54* présentent une racine significativement plus courte, bien que cette différence soit infime (4% et 6% respectivement) (**Figure 15**).



**Figure 15 : Longueur des racines de « mutants peroxydases » de la troisième série après 7 jours de culture.**

La longueur des racines a été mesurée après 7 jours à partir de photos des boîtes de culture et en utilisant le logiciel ImageJ. Ces résultats sont issus de 3 expériences indépendantes.

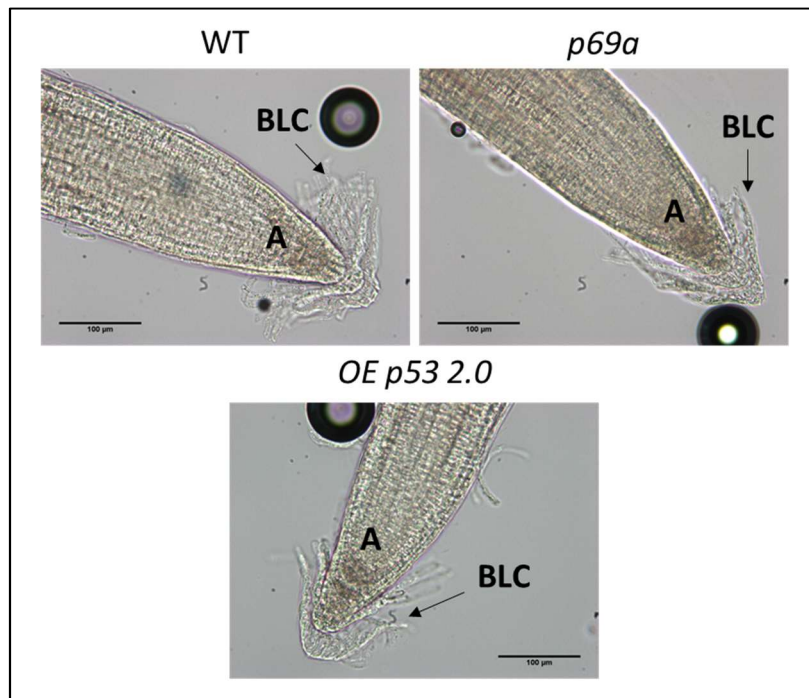
$n \geq 32$ , chaque population suit une loi Normale (test de D'Agostino à  $\alpha = 5\%$ ) sauf « 35S:p54a.1 » et « 35S:p54a.5 ». Les variances des populations « WT », « ARNi p53 p54 », « OE p53 1.0 », « OE p53 2.0 » et « p54a compl 6 » sont supposées égales (test de Fisher à  $\alpha = 5\%$ ). Ce n'est pas le cas pour la population « p54a compl 1 ». Comparaison de « ARNi p53 p54 », « OE p53 1.0 », « OE p53 2.0 » et « p54a compl 6 » par rapport au sauvage (WT): t-test à  $\alpha = 5\%$ . Comparaison de « p54a compl 1 » par rapport au sauvage (WT): t-test avec correction de Welch à  $\alpha = 5\%$ . Comparaison de « 35S:p54a.1 » et « 35S:p54a.5 » par rapport au sauvage (WT): Test de Mann-Whitney à  $\alpha = 5\%$ . \*: pvalue < 0.05

Si l'on résume tous ces résultats, les mutants affectés au niveau de la peroxydase 03 (*p03a* et *p03b*) et de la peroxydase 30 (*p30a* et *p30b*) ont une racine significativement plus courte que le sauvage. En revanche, chez les mutants affectés au niveau de la peroxydase 04 (*p04a* et *p04b*) ou surexprimant la peroxydase 54 (*p35S:p54.1* et *p35S:p54a.5*), seule une des constructions présente une différence par rapport au sauvage, à savoir une racine significativement plus longue chez *p04a* et plus courte chez *p35S:p54a.5*. Plus surprenant, les deux mutants affectés au niveau de la peroxydase 69 présentent des résultats contraires puisque *p69a* présente une racine significativement plus courte tandis que *p69b* comporte une racine plus longue que le sauvage. Notons toutefois que même si les différences de longueur racinaire sont significatives statistiquement, les écarts sont plutôt faibles. Il convient donc d'interpréter ces résultats avec beaucoup de précaution.



➤ Morphologie des cellules apparentées aux cellules bordantes et mucilage

L'aspect général des BLCs a également été observé chez les mutants de la seconde et la troisième série (voir **Tableau 3**) après 7 jours de culture (**Figure 16**). Toutefois, comme on peut le voir sur les images proposées en exemple en **Figure 16**, aucune différence n'a été relevée par rapport au sauvage.



**Figure 16 : Cellules apparentées aux cellules bordantes (BLC) chez les « mutants peroxydases » de la seconde et la troisième série après 7 jours de culture.**

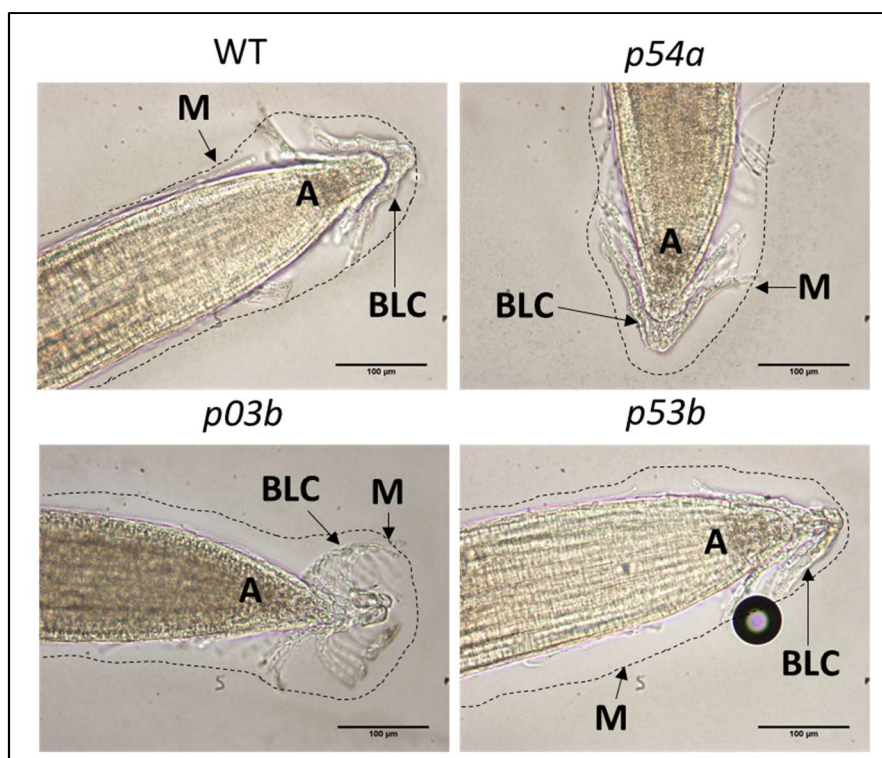
*2 à 3 racines ont été observées pour chacun des mutants.*

*Observations au microscope à épifluorescence droit Leica DMLB, caméra DFC 300FX.*

*Barres d'échelle: 100 µm*

*A: Apex. BLC: Cellules apparentées aux cellules bordantes (Border-Like Cells).*

Enfin, une coloration négative à l'encre de Chine a été effectuée sur les mutants de la seconde série permettant de mettre en évidence la présence d'une fine couche de mucilage autour de la pointe racinaire (**Figure 17**). Là encore, comme on peut le voir sur les images proposées en exemple en **Figure 17**, aucune différence n'a été observée entre les mutants et le sauvage.



**Figure 17 : Coloration négative à l'encre de Chine du mucilage au niveau de la pointe racinaire chez les « mutants peroxydases » de la seconde série après 7 jours de culture.**

2 à 3 racines ont été observées pour chacun des mutants.

Observations au microscope à épifluorescence droit Leica DMLB, caméra DFC 300FX.

Barres d'échelle: 100 µm

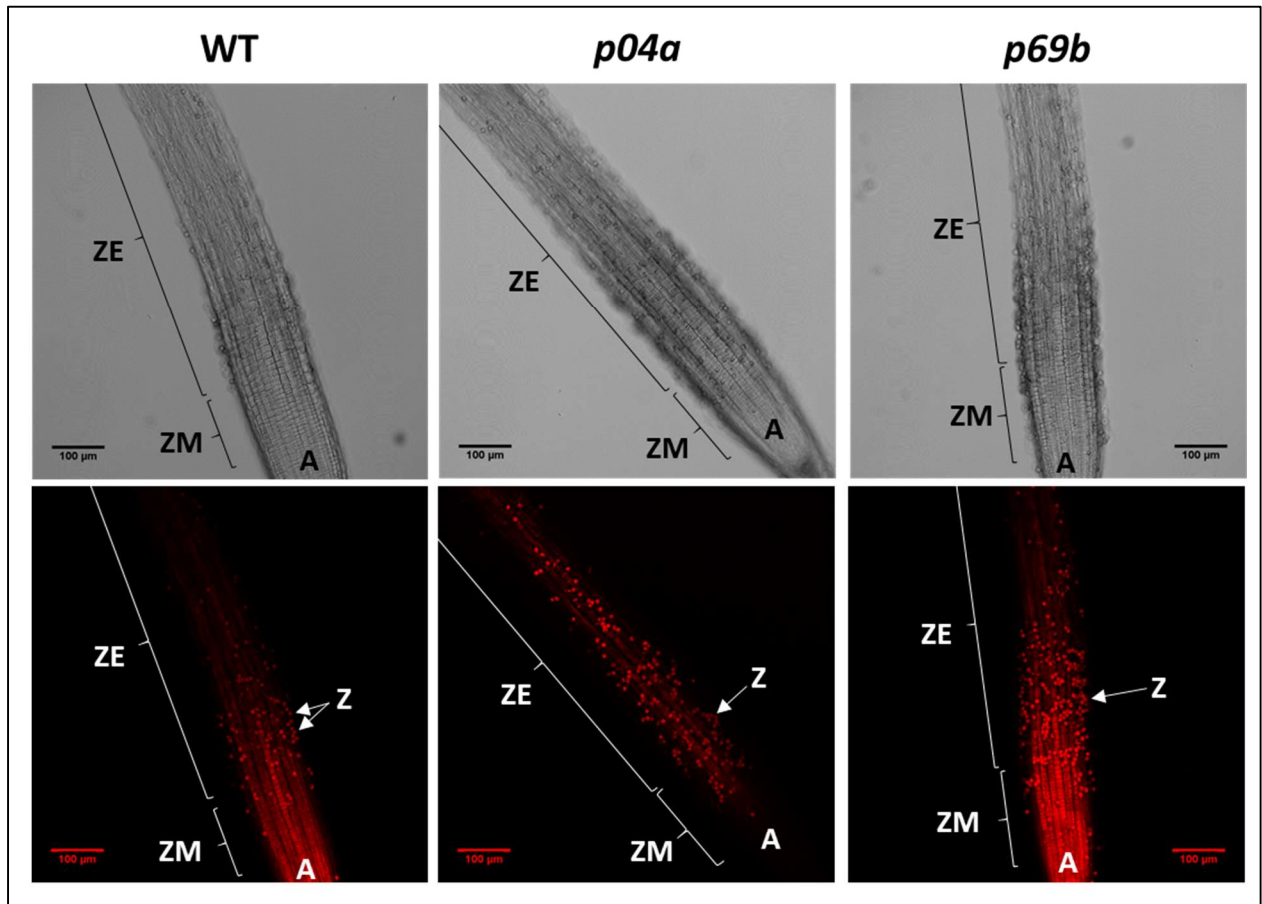
A: Apex. BLC: Cellules apparentées aux cellules bordantes (Border-Like Cells). M: Mucilage.

### 3.2.2.2 Inoculation avec *Phytophthora parasitica*

Nous avons ensuite mis ces mutants en présence de zoospores de *Phytophthora parasitica* afin de tester leur sensibilité à la colonisation de la racine par cet oomycète. Ici, nous avons utilisé la souche 310 de *P. parasitica* et non pas la souche Race 0 comme dans le chapitre précédent. En effet, au moment de réaliser ces inoculations la souche 310 produisait encore des zoospores. Ces difficultés ont conditionné le choix de la souche selon les projets. Ces souches ont été généreusement fournies par le Dr. Agnès Attard de l'institut Sophia Agrobiotech (INRA 1355-CNRS 7254) de Sophia Antipolis. Il est à noter que les souches 310 et Race 0 infectent toutes les deux la racine d'*A. thaliana* bien que Race 0 soit plus virulente (Communication personnelle du Dr. Agnès Attard).

Après 3 heures d'inoculation avec la souche 310, une accumulation de zoospores survient au niveau de la même zone racinaire, chez le sauvage comme chez les mutants, à savoir fin de la zone méristématique - début de la zone d'élongation. En revanche, la quantité

de zoospores accumulées semble légèrement plus importante chez les mutants *p04a*, *p69b* (**Figure 18**) *p03b*, *p30a*, *p30b*, *p53b*, *35S:p54.5* (données non montrées) et *35S:p54.1* ainsi que le double mutant *ARNi p53/p54* (**Figure 19**).



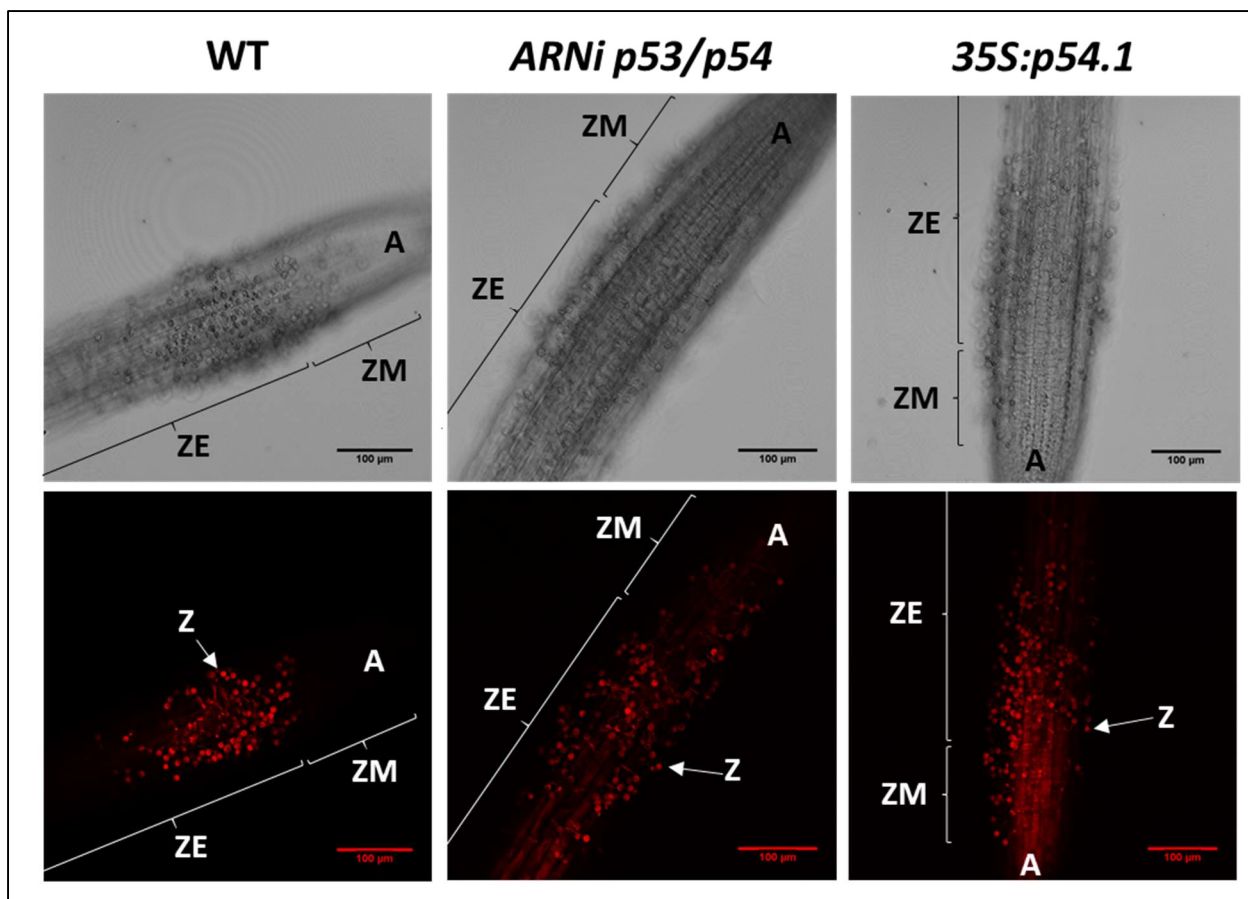
**Figure 18 : Accumulation des zoospores de *Phytophthora parasitica* (souche 310) chez les « mutants peroxydases » de la première série après 3 heures d'inoculation.**

*Les zoospores s'accumulent entre la fin de la zone méristématique et le début de la zone d'élongation. 3 à 5 racines ont été observées pour chaque condition.*

*Observations au microscope confocal à balayage laser Leica SP2 ( $\lambda_{excitation} : 561 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{émission} : 570 - 612 \text{ nm}$ ).*

*Barres d'échelle: 100  $\mu\text{m}$*

*A: Apex. Z: Zoospore. ZM: Zone Méristématique. ZE: Zone d'Élongation*



**Figure 19 : Accumulation des zoospores de *Phytophthora parasitica* (souche 310) chez les « mutants peroxydases » de la troisième série après 3 heures d'inoculation.**

Les zoospores s'accumulent entre la fin de la zone méristématique et le début de la zone d'élongation. 3 à 5 racines ont été observées pour chaque condition.

Observations au microscope confocal à balayage laser Leica SP2 ( $\lambda_{excitation}$  : 561 nm;  $\lambda_{émission}$  : 570 – 612 nm).

Barres d'échelle: 100  $\mu$ m

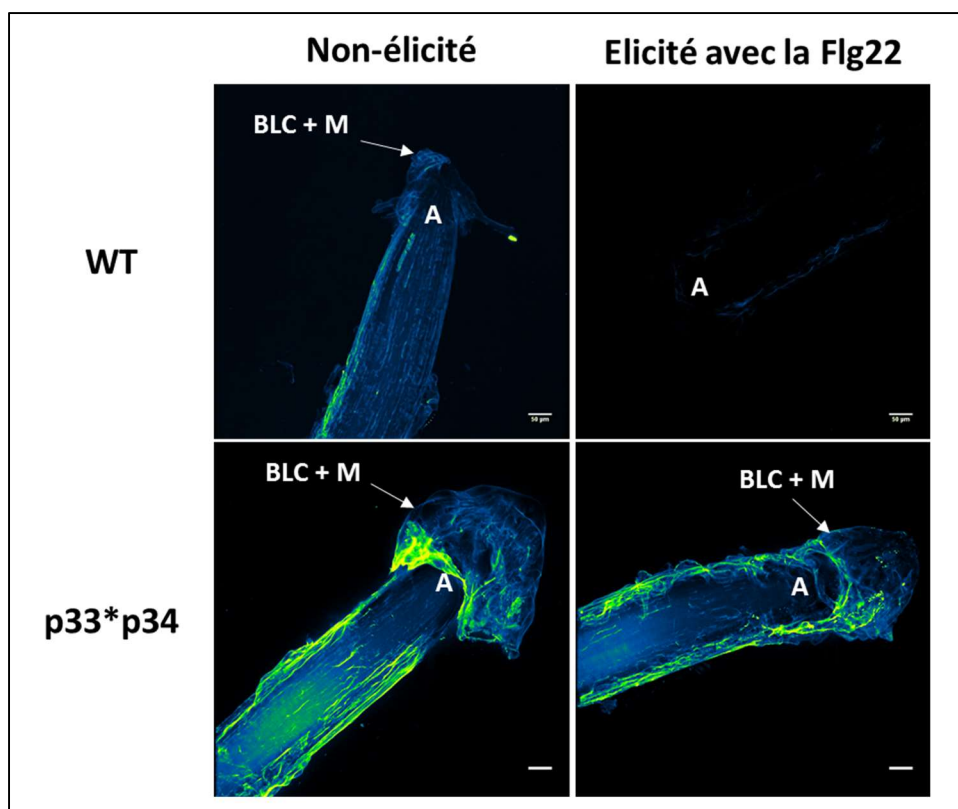
A: Apex. Z: Zoospore. ZM: Zone Méristématique. ZE: Zone d'Elongation

Toutefois, ces résultats, tout prometteurs qu'ils soient, sont à prendre avec beaucoup de précaution car les expériences d'infection n'ont été réalisées qu'une seule fois pour chaque mutant. Or, ce type d'expériences a tendance à donner des résultats très variables. Ainsi, des quantifications du nombre de zoospores accumulées seraient nécessaires, et ce, sur davantage de racines inoculées. L'analyse des symptômes ainsi que l'utilisation d'outils de biologie moléculaire pour quantifier le pathogène dans la racine pourraient également compléter ces expériences (Schena *et al.*, 2006; Attard *et al.*, 2010).

### 3.2.2.3 Immunomarquages des racines avec l'anticorps anti-extensine LM1

Deux autres peroxydases nous sont apparues comme de bonnes candidates pour catalyser le « cross-linking » des extensines. En effet, des résultats de qRT-PCR obtenus par le Dr. Barbara Plancot au sein de notre laboratoire montrent une induction de l'expression du gène codant pour la peroxydase 34 dans la racine en réponse à une élicitation avec la flagelline 22 (Plancot *et al.*, unpublished). De plus, la peroxydase 34 et son homologue la peroxydase 33 sont associées à la paroi et impliquées dans l'élongation cellulaire au niveau de la racine (Passardi *et al.*, 2006), tout comme le sont les extensines (Velasquez *et al.*, 2011; Nguema-Ona *et al.*, 2014; Velasquez *et al.*, 2015). Il a été montré par ailleurs que la baisse d'expression des gènes codant pour ces deux peroxydases entraînait une baisse de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en réponse à un éliciteur ou à un pathogène, une plus grande susceptibilité à différents types de pathogènes ainsi qu'une réduction de l'activité des peroxydases liées à la paroi (Bindschedler *et al.*, 2006). Récemment, il a été proposé que ces deux peroxydases puissent jouer un rôle dans le « cross-linking » de composés de la paroi, même si dans cette hypothèse les auteurs évoquent les pectines mais ne mentionnent pas les extensines (Daudi *et al.*, 2012). A partir de toutes ces données, nous avons voulu tester si ces deux peroxydases pouvaient avoir un lien avec les extensines.

Par conséquent, des immunomarquages avec un anticorps monoclonal anti-extensine (LM1) ont été réalisés par le Dr. Barbara Plancot sur les racines du double mutant *p33\*p34* et, du marquage a été observé le long de la racine avec un signal qui semble plus intense que chez le sauvage (**Figure 20**). Après élicitation à la flagelline 22, un faible signal voire aucun marquage n'est détecté chez le sauvage, conformément aux résultats présentés dans le chapitre précédent ou déjà publiés (Plancot *et al.*, 2013). En revanche, ce marquage est toujours présent chez le double mutant suggérant ainsi que la double mutation *p33\*p34* a un impact sur la distribution des épitopes LM1 en réponse à une élicitation à la flagelline 22. Ceci est d'autant plus intéressant que des résultats similaires ont été obtenus avec certains mutants affectés dans la glycosylation des extensines (voir chapitre précédent).



**Figure 20 : Immunomarquages avec l'anticorps anti-extensine LM1 sur la pointe racinaire de plantules sauvages d'*Arabidopsis thaliana* et du double mutant *p33\*p34*.**

Les immunomarquages ont été réalisées avec l'anticorps monoclonal anti-extensine LM1 sur des plantules de 9 jours préalablement élicitées ou non pendant 48 heures avec la flagelline 22 (1  $\mu$ M). 3 à 5 racines ont été observées pour chaque condition.

Les photos sont des reconstitutions en 3D à partir d'une série de photos de 1  $\mu$ m de section. Ces photos ont été prises au microscope confocal inversé à balayage laser Leica SP2 ( $\lambda_{excitation}$  : 488 nm;  $\lambda_{émission}$  : 507 – 550 nm).

Barres d'échelle: 50  $\mu$ m

A: Apex. BLC + M: Border-like cells et mucilage.

Plancot et al. (unpublished)

### 3.2.3 Conclusion

La plupart des expériences réalisées dans le cadre de ce projet ne permettent pas de lier plus ou moins directement les peroxydases avec les extensines mais plutôt de mettre en évidence un potentiel rôle dans la croissance racinaire ou dans la défense vis-à-vis d'un oomycète pathogène. Toutefois, les résultats obtenus sont difficilement concluants à cause du faible nombre de répliques et/ou de la faiblesse de la variation observée. Des analyses supplémentaires auraient été nécessaires afin de donner davantage de valeur à ces résultats avant de réaliser des expériences qui auraient pu permettre d'étudier un éventuel lien entre ces peroxydases et les extensines. Malheureusement, le projet de thèse et toutes les

contraintes que cela peut impliquer, ont imposé de devoir faire certains choix et de se focaliser sur d'autres travaux.

Toutefois, des résultats très prometteurs ont été obtenus avec les immunomarquages avec l'anticorps anti-extensine LM1 sur le double mutant *p33\*p34*, faisant des peroxydases 33 et 34 des candidates extrêmement intéressantes dans l'optique de mettre en évidence les peroxydases spécifiques catalysant le cross-linking des extensines chez *Arabidopsis thaliana*. L'étude de ces deux peroxydases mériterait d'être approfondie afin peut-être d'identifier pour la première fois des « extensine-peroxydases » chez *A. thaliana*. Cela aurait l'avantage d'avoir une approche supplémentaire et de pouvoir profiter de tous les outils et les données déjà disponibles chez cette plante modèle, y compris les résultats présentés dans le chapitre précédent, afin d'établir un nouveau projet visant à mieux comprendre le mécanisme de « cross-linking » des extensines dans la défense racinaire.









# Discussion générale et perspectives

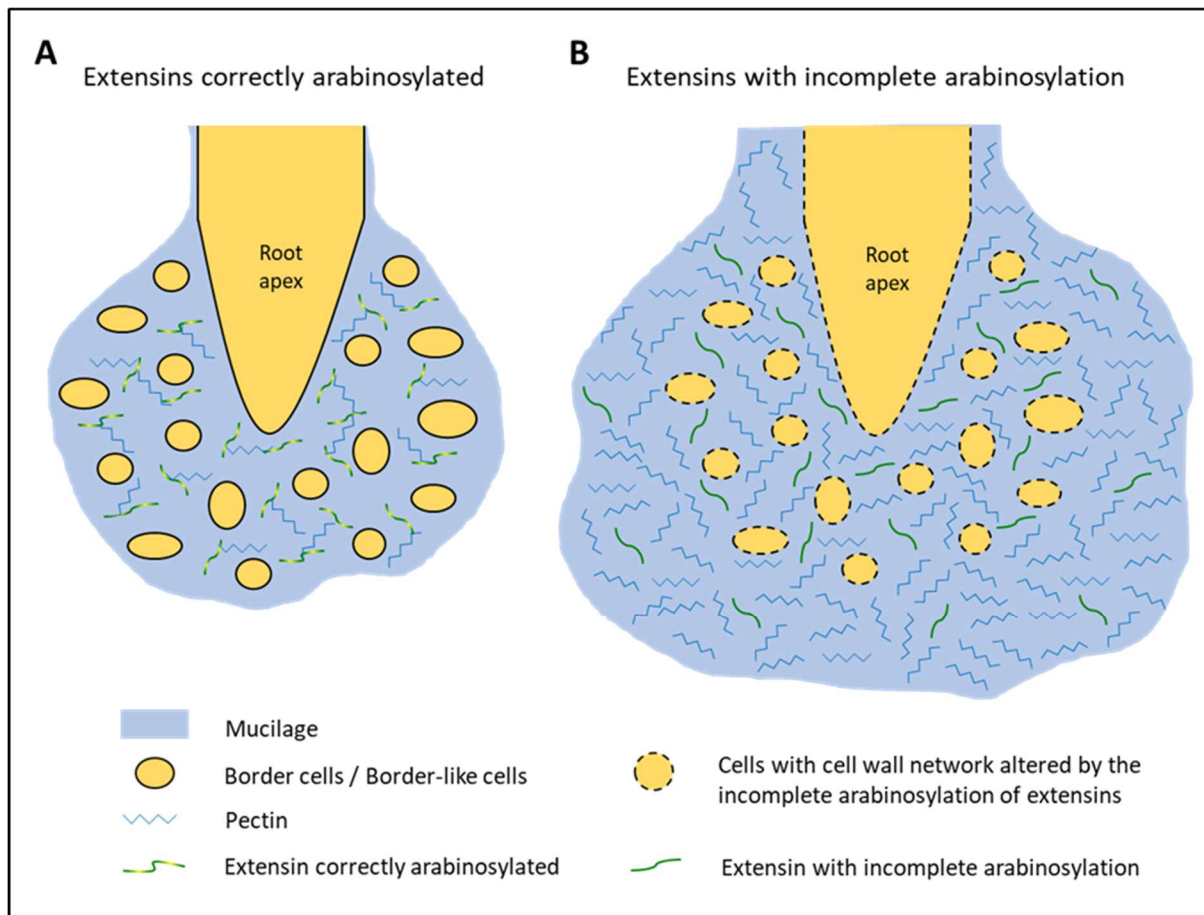


## 4 Discussion générale et perspectives

Le rôle des extensines dans la défense des plantes et plus particulièrement la protection racinaire est encore aujourd'hui mal connu. Néanmoins, les différents travaux réalisés dans le cadre de ce projet de thèse ont apporté une contribution significative dans la compréhension de ce rôle tout en offrant des perspectives et des pistes de recherche très intéressantes.

Tout d'abord, la rédaction d'une revue scientifique répertoriant l'état de l'art sur les extensines et la défense a pour objectif de synthétiser l'avancée des travaux sur ce sujet et d'essayer de combler un certain manque en la matière dans la littérature. En effet, seules deux revues évoquant ce sujet ont été publiées à ce jour. La première datant de 2010 s'intéressait de manière générale aux HRGPs dans la défense (Deepak *et al.*, 2010) tandis que la seconde plus récente n'évoquait les extensines que de manière légèrement succincte à travers un court paragraphe (Rashid, 2016). Ainsi, la revue que nous avons élaborée et qui sera bientôt soumise au journal « Journal of Experimental Botany », permet d'avoir une vision globale et à jour de l'état des connaissances sur le rôle des extensines dans la défense chez les plantes. Les connaissances et hypothèses discutées dans cette revue pourraient ainsi être utiles dans l'élaboration de futurs projets de recherche sur ce sujet.

Nous avons par exemple mis en lumière des données peu exploitées jusque-là ainsi que des travaux plus récents suggérant que les extensines n'étaient pas seulement présentes au niveau de la paroi cellulaire mais pouvaient être aussi retrouvées dans des sécrétions racinaires telles que le mucilage (Kawasaki, 1989; Zagorchev & Odjakova, 2011; Herrmann *et al.*, 2012; Koroney *et al.*, 2016). A partir de ces éléments et de résultats obtenus au sein de notre laboratoire, nous avons alors émis un modèle proposant d'illustrer le rôle structural des extensines et, à travers leur association avec les pectines, l'impact sur l'architecture de la paroi et les sécrétions racinaires (Castilleux *et al.*, en préparation) (**Figure 21**).



**Figure 21 : Modèle illustrant l'impact de l'arabinosylation sur l'organisation de la paroi et les sécrétions racinaires.**

(A) Des extensines et des pectines sont sécrétées dans le mucilage où elles interagissent de la même manière que dans la paroi. (B) L'arabinosylation incorrecte des extensines modifie leur conformation et altère l'organisation de la paroi des cellules de la pointe racinaire et des cellules bordantes. Cela entraînerait alors une augmentation de la sécrétion et/ou une « fuite » des pectines dans le mucilage. En revanche, il n'est pas certain que la sécrétion des extensines dans le mucilage augmente dans ces conditions.

(Castilleux *et al.*, en préparation)

Des études supplémentaires s'avèrent néanmoins nécessaires pour mieux comprendre le mode d'action des extensines au sein de la paroi et dans les sécrétions racinaires. En ce sens, des éléments intéressants pourraient être obtenus à travers la caractérisation plus générale du RET (Root Extracellular Trap), ensemble regroupant les cellules bordantes et les sécrétions. Cette caractérisation du RET fait d'ailleurs l'objet d'un volet du projet de thèse de Marc Ropitiaux mené actuellement au sein du laboratoire.

Dans cette revue, nous avons également réalisé pour la première fois une synthèse des résultats obtenus avec les cinq anticorps monoclonaux anti-extensine les plus souvent utilisés et commercialisés par PlantProbes®, à savoir LM1, JIM11, JIM12, JIM19 et JIM20

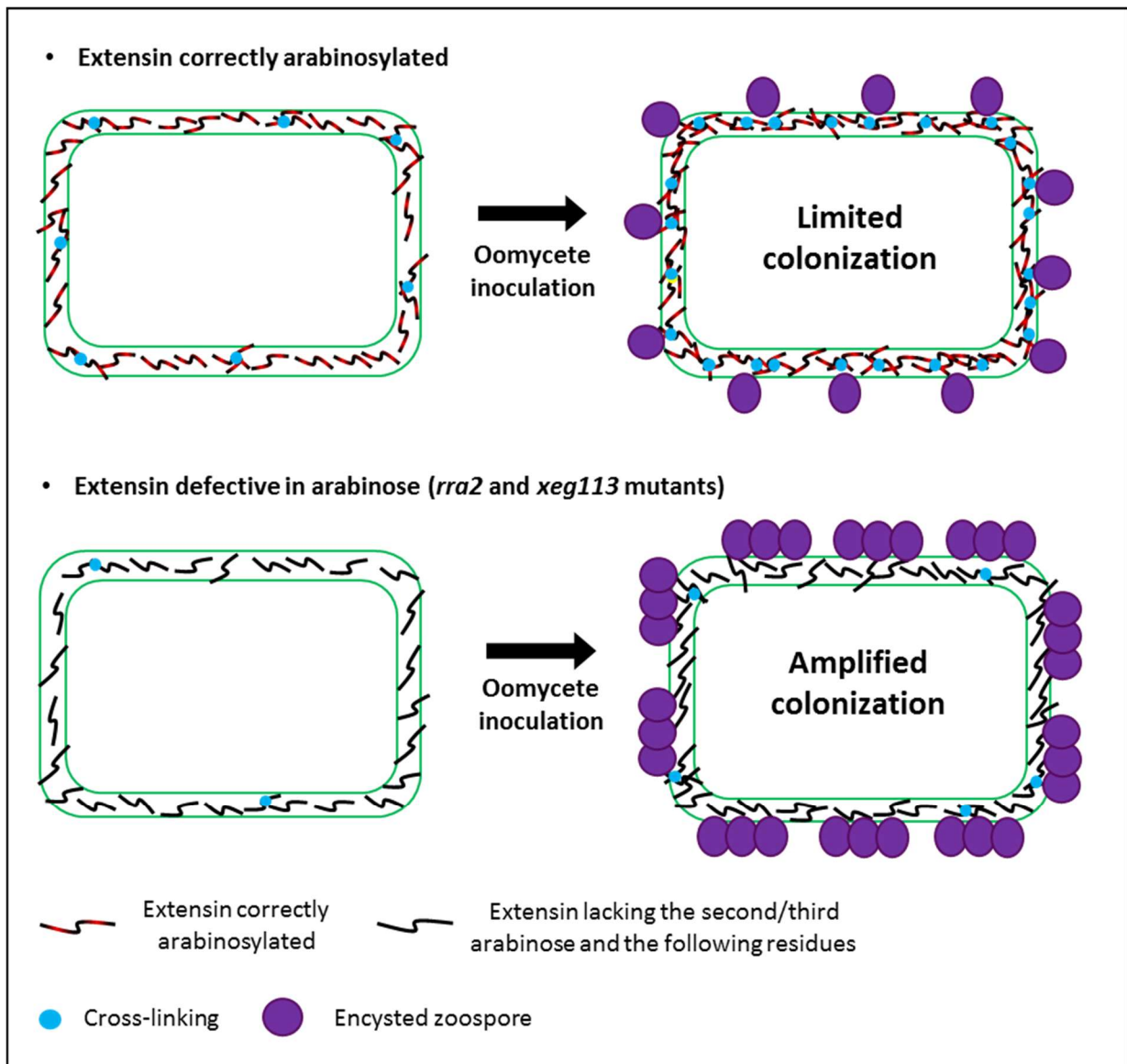
(Smallwood *et al.*, 1994; Knox *et al.*, 1995; Smallwood *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995). Ce travail pourrait aider la communauté scientifique lors du choix des anticorps à utiliser pour étudier les extensines. Nous avons montré en effet que les épitopes associés au LM1, JIM11, JIM12 et JIM20 sont largement répandus chez les plantes, et ce, quel que soit le tissu. Ce n'est pas le cas en revanche pour les épitopes associés au JIM19 qui n'ont été retrouvés que dans de rares exemples. Surtout, nous avons répertorié tous les cas où la détection des épitopes anti-extensine différaient après un traitement enzymatique, une élicitation, une blessure ou une inoculation avec un pathogène. Cela a permis de faire ressortir les épitopes reconnus par les anticorps LM1, JIM11 et JIM20 comme pouvant être des marqueurs de défense chez la plante. Une hypothèse similaire avait récemment été proposée pour les épitopes reconnus par l'anticorps JIM11 (Wu *et al.*, 2017) et a été confortée depuis par nos résultats obtenus avec les anticorps LM1 et JIM11 (Castilleux *et al.*, soumis). Comme cela a été décrit dans le premier chapitre de résultats, l'élicitation de la racine d'*Arabidopsis thaliana* avec la flagelline 22 a occasionné une disparition du signal associé au LM1, de manière analogue aux résultats de Plancot *et al.* en 2013, ainsi qu'une intensification du signal associé au JIM11. Ceci est une parfaite illustration du caractère spécifique de la réponse immunitaire au niveau des épitopes associés aux extensines, cette réponse dépendant aussi selon l'espèce végétale, le tissu et le type d'éliciteur ou de pathogène.

L'utilisation des anticorps LM1, JIM11 et JIM20 comme marqueurs de défense pourrait être très opportune notamment dans les tests préliminaires sur la capacité d'un produit à stimuler l'immunité de la plante. Ils pourraient constituer une très bonne alternative aux tests de détection des dépôts de callose ou de la production d'espèces réactives de l'oxygène, lesquels occasionnent très souvent une grande variabilité expérimentale (Luna *et al.*, 2011). Les immunomarquages avec les anticorps anti-extensine ont en effet pour avantage de donner des résultats plus constants et robustes pour une même condition tout en étant plutôt rapides à réaliser et pas particulièrement plus onéreux.

En revanche, l'inconvénient des anticorps anti-extensine est que les épitopes reconnus n'ont pas encore été caractérisés. Les immunomarquages réalisés sur la racine du mutant *xeg113* d'*A. thaliana*, lequel présente une arabinosylation incomplète au niveau des extensines (Gille *et al.*, 2009), suggèrent que les épitopes reconnus par les anticorps LM1, JIM11 et JIM20 contiennent le troisième arabinose et/ou les arabinoses suivants de la partie

glycanique des extensines. Toutefois, ce sont à notre connaissance les seules données sur les épitopes reconnus par les anticorps anti-extensine. Il serait pourtant très intéressant d'identifier plus précisément ces épitopes afin de pouvoir mieux exploiter tous les résultats obtenus avec ces anticorps et mieux cibler à l'avenir la pertinence de l'anticorps à utiliser.

Grâce à l'emploi de ces anticorps et à l'utilisation de mutants affectés dans la glycosylation des extensines, nous avons pu montrer que la partie glycanique avait son importance dans la défense. En effet en réponse à une élicitation à la flagelline 22, une distribution différente des épitopes associés aux extensines a été relevée chez les mutants en comparaison avec le sauvage. Pour confirmer ce rôle de la glycosylation des extensines dans la défense racinaire, nous avons inoculé ces mutants avec des zoospores de l'oomycète pathogène *Phytophthora parasitica*. Si les zoospores se sont toujours accumulées autour d'une même zone de la racine, à savoir la fin de la zone méristématique et le début de la zone d'élongation, cette accumulation était significativement plus importante chez les mutants *xeg113* et *rra2* par rapport au sauvage. Cela suggère que l'arabinosylation des extensines permet de limiter, probablement de manière indirecte, la colonisation de la racine par *P. parasitica*. Il a été démontré que cette partie arabinosylée était nécessaire au « cross-linking » des extensines en conférant une conformation correcte à ces dernières (Velasquez *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). Chez les mutants *xeg113* et *rra2*, l'altération de l'arabinosylation des extensines aurait pour effet de réduire le nombre de « cross-linking », modifiant l'organisation et l'architecture de la paroi. Cela entraînerait alors une plus grande adhésion des zoospores sur les cellules de la racines, amenant ainsi à une colonisation plus importante de la racine par le pathogène (voir le modèle proposé en **Figure 22**) (Castilleux *et al.*, soumis). Ces résultats pourraient être complétés par une quantification du pathogène par qPCR (Schena *et al.*, 2006) au sein de la racine des mutants à différents temps après inoculation afin de voir si l'arabinosylation des extensines pouvait avoir un effet sur la progression du pathogène. Cela avait été envisagé dans le cadre de ce projet, des amorces ayant été commandées en ce sens, mais n'a pas pu être mis en place faute de temps. Une analyse des symptômes chez les mutants inoculés avait également été entreprise au sein de l'institut Sophia Agrobiotech de Sophia Antipolis avec le Dr. Agnès Attard (INRA 1355-CNRS 7254). Cela n'a malheureusement pas pu aboutir à cause de problèmes de contaminations et n'a pas été non plus poursuivi, là encore, faute de temps.



**Figure 22 : Modèle illustrant l'impact de l'arabinosylation des extensines sur la colonisation de la racine d'*Arabidopsis thaliana* par l'oomycète *Phytophthora parasitica*.**

Grâce à leur correcte arabinosylation, les extensines seraient déjà « cross-linkées » dans une certaine mesure au sein de la paroi cellulaire de racines non infectées. L'inoculation des racines avec des zoospores de *P. parasitica* aurait pour effet d'activer différents mécanismes de défense tels que l'augmentation de « cross-linking » des extensines. Cela permettrait de renforcer le réseau de la paroi cellulaire et ainsi de limiter la colonisation de la racine par le pathogène. En revanche, dans le cas d'un défaut d'arabinosylation des extensines, le nombre de « cross-linking » serait fortement réduit, y compris en réponse à l'inoculation de l'oomycète, modifiant ainsi l'organisation structurale de la paroi. Cela entraînerait alors une augmentation de l'adhésion des zoospores sur les cellules de la racine, amenant ainsi à une colonisation plus importante de la racine par le pathogène.

Castilleux *et al.*, (soumis)

Néanmoins, la raison exacte pour laquelle les zoospores sont plus attirées vers la racine lorsque les extensines ne sont pas correctement glycosylées est encore à approfondir. Est-ce



une modification du chimiotactisme ou de l'électrotactisme qui a lieu dans cette interaction ? Ou est-ce la modification de l'organisation de la paroi engendrée par l'altération de l'arabinylation des extensines qui va avoir pour effet de faciliter l'adhésion des premières zoospores et ainsi entraîner un phénomène d'auto-agrégation plus important ? Le chimiotactisme, l'électrotactisme et l'auto-agrégation sont en effet les trois stratégies mises en place par les zoospores de *P. parasitica* afin de coloniser la racine (Walker & van West, 2007) et il n'est pas impossible que plusieurs de ces processus soient affectés dans le cas de la colonisation d'une racine dont la partie glycanique des extensines est altérée. Davantage de travaux s'avèrent par conséquent nécessaires pour comprendre le ou les mécanisme(s) en jeu ici. Toutefois, nous pouvons avancer l'hypothèse que l'arabinylation incomplète des extensines diminuant le nombre de « cross-linking » résulte en un changement de la charge de la paroi ce qui induirait alors une modification de l'électrotactisme.

La correcte glycosylation des extensines n'est pas l'unique élément permettant le « cross-linking ». Ce dernier est en effet catalysé par des peroxydases spécifiques comme cela a été publié chez la tomate (Brownleader *et al.*, 1995; Schnabelrauch *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 2015) et le lupin (Price *et al.*, 2003). Cependant, aucune peroxydase catalysant spécifiquement le « cross-linking » des extensines n'a, à ce jour, été mise en évidence chez *Arabidopsis thaliana*. La tâche peut s'avérer ardue puisque cette plante compte pas moins de 73 peroxydases différentes répertoriées (Francoz *et al.*, 2015). Nous avons néanmoins collaboré avec le Pr. Christophe Dunand et le Dr. Philippe Ranocha du Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV, UMR 5546-UPS/CNRS) de Toulouse afin de sélectionner différents mutants « peroxydases » qui paraissaient être de bons candidats. Parmi la sélection, le double-mutant affecté au niveau des gènes codant pour les peroxydases 33 et 34 était le plus prometteur. En effet, ces deux peroxydases sont décrites comme associées à la paroi (Passardi *et al.*, 2006; Bindschedler *et al.*, 2006) et qu'elles pourraient jouer un rôle dans le « cross-linking » de pectines dans la paroi – la possibilité que ce soit plutôt dans le « cross-linking » des extensines n'a pas été prise en compte dans la publication (Daudi *et al.*, 2012). De plus, des expériences de qRT-PCR réalisées par le Dr. Barbara Plancot au sein de notre laboratoire, et dont les résultats n'ont pas encore été publiés, montrent que l'expression du gène codant pour la peroxydase 34 est induite dans la racine en réponse à une élicitation avec la flagelline 22 (Plancot *et al.*, unpublished). Les immunomarquages réalisés avec l'anticorps anti-

extensine LM1 sur la racine de ce double-mutant ont révélé une différence de réponse à l'élicitation à la flagelline 22. De fait, si une disparition du signal a lieu chez les racines sauvages élicitées, ce n'est pas le cas chez le double-mutant puisque le marquage est toujours détecté après élicitation. La réponse à l'élicitation par la flagelline 22 apparaît donc différente chez le double-mutant en termes de distribution des épitopes associés aux extensines (Plancot *et al.*, unpublished). On peut rapprocher ce résultat aux observations similaires obtenues chez les mutants affectés dans la glycosylation des extensines. Par conséquent, les peroxydases 33 et 34 semblent être des candidats extrêmement prometteurs pour la catalyse du « cross-linking » des extensines. Néanmoins, davantage de travaux sont à mener pour confirmer cette spécificité des peroxydases 33 et 34.


Par ailleurs, l'impact de l'altération de l'arabinosylation des extensines sur l'organisation de la paroi est encore à mettre en évidence afin de mieux cerner le rôle des extensines mais aussi d'identifier les éventuelles associations avec d'autres composés de la paroi. Dans la littérature il a été proposé que les extensines pourraient interagir avec les hémicelluloses (Gille *et al.*, 2009) ou les pectines (MacDougall *et al.*, 2001; Cannon *et al.*, 2008; Nuñez *et al.*, 2009; Valentin *et al.*, 2010; Leroux *et al.*, 2011; Neumetzler *et al.*, 2012) et plus particulièrement le RG-I (Yu *et al.*, 2011) ou le RG-II (Reguera *et al.*, 2010; Chormova & Fry, 2016). Cette possibilité d'association avec les pectines est confortée par les immunomarquages réalisés sur les racines des mutants *xeg113* et *rra2* avec l'anticorps LM19 reconnaissant des épitopes associés aux homogalacturonanes. En comparaison avec le sauvage, le signal détecté est en effet bien plus intense et diffus chez les mutants, aussi bien au niveau de l'apex racinaire qu'autour de ce dernier dans le mucilage. De plus, l'analyse de la composition monosaccharidique de la paroi chez le mutant *xeg113* a montré une augmentation de la proportion de galactose combinée à une diminution de celle d'arabinose. Cette dernière diminution a été attribuée à l'arabinosylation partielle des extensines chez ce mutant, si tant est que les extensines sont bel et bien extraites avec les résidus insolubles dans l'alcool (AIR). La hausse de la proportion en galactose et plus particulièrement en 3-galactose pourrait provenir du RG-I ou des AGPs, tous deux riches en ce monosaccharide. Cela renforce encore l'hypothèse d'une association entre extensines et pectines, probablement par des liaisons de type ionique (MacDougall *et al.*, 2001; Cannon *et al.*, 2008), sans exclure une interaction entre extensines et AGPs. Ces dernières jouent en effet un rôle dans l'adhésion

cellulaire (Gaspar *et al.*, 2004; Seifert & Roberts, 2007; Ellis *et al.*, 2010) tout comme nos résultats le suggèrent pour les extensines (Castilleux *et al.*, soumis). On peut ainsi imaginer que les extensines puissent agir en synergie avec les pectines et/ou les AGPs. Des études supplémentaires apparaissent nécessaires afin de déterminer si les extensines sont bien associées avec les pectines et/ou les AGPs, quel type de liaisons cela fait intervenir et comment cela impacte la structure et la fonction de défense de la paroi.

Pour conclure, ce projet de thèse a permis de souligner l'importance des extensines dans la défense des plantes, particulièrement au niveau racinaire, et de mettre en évidence pour la première fois l'importance de la partie arabinosylée dans ce rôle. Ces travaux ont également fait naître des perspectives intéressantes en offrant des résultats préliminaires prometteurs qui pourraient servir les futurs projets de recherche qui seront élaborés. Ces derniers pourraient, entre autres, avoir pour objectif de caractériser les épitopes reconnus par les anticorps anti-extensine, mettre en évidence l'existence d'une matrice structurant le mucilage racinaire, déterminer le mécanisme par lequel l'arabinylation des extensines affecte la colonisation de la racine par les zoospores, identifier les peroxydases catalysant spécifiquement le « cross-linking » des extensines ou encore établir quels sont les composés de la paroi avec lesquels sont associés les extensines, comment sont-ils liés et pour quelles fonctions?







# Références bibliographiques



## 5 Références bibliographiques

- Attard A, Gourgues M, Callemeyn-Torre N, Keller H. 2010.** The immediate activation of defense responses in Arabidopsis roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytologist* **187**: 449–460.
- Attard A, Gourgues M, Galiana E, Panabières F, Ponchet M, Keller H. 2008.** Strategies of attack and defense in plant–oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). *Journal of Plant Physiology* **165**: 83–94.
- Baetz U, Martinoia E. 2014.** Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science* **19**: 90–98.
- Balmer D, Mauch-Mani B. 2013.** More beneath the surface? Root versus shoot antifungal plant defenses. *Frontiers in Plant Science* **4**: 256.
- Balmer D, de Papajewski DV, Planchamp C, Glauser G, Mauch-Mani B. 2013.** Induced resistance in maize is based on organ-specific defence responses. *The Plant Journal* **74**: 213–225.
- Battaglia M, Solórzano RM, Hernández M, Cuéllar-Ortiz S, García-Gómez B, Márquez J, Covarrubias AA. 2007.** Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings. *Planta* **225**: 1121–1133.
- Baumberger N, Ringli C, Keller B. 2001.** The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development* **15**: 1128–1139.
- Baumberger N, Steiner M, Ryser U, Keller B, Ringli C. 2003.** Synergistic interaction of the two paralogous Arabidopsis genes *LRX1* and *LRX2* in cell wall formation during root hair development. *The Plant Journal* **35**: 71–81.
- Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. 2013.** *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: E1621–E1630.
- Berens ML, Berry HM, Mine A, Argueso CT, Tsuda K. 2017.** Evolution of hormone signaling networks in plant defense. *Annual Review of Phytopathology* **55**.
- Bindschedler LV, Dewdney J, Blee KA, Stone JM, Asai T, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish C, Davies DR, et al. 2006.** Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *The Plant Journal* **47**: 851–863.
- 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.



- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ. 1992.** Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21–30.
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C. 1994.** Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *The Plant Cell* **6**: 1703–1712.
- Brownleader MD, Ahmed N, Trevan M, Chaplin MF, Dey PM. 1995.** Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiology* **109**: 1115–1123.
- Caffall KH, Mohnen D. 2009.** The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* **344**: 1879–1900.
- Cannesan MA, Durand C, Burel C, Gangneux C, Lerouge P, Ishii T, Laval K, Follet-Gueye M-L, Driouich A, Vicre-Gibouin M. 2012.** Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. *Plant Physiology* **159**: 1658–1670.
- Cannesan MA, Gangneux C, Lanoue A, Giron D, Laval K, Hawes M, Driouich A, Vicré-Gibouin M. 2011.** Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*. *Annals of Botany* **108**: 459–469.
- Cannon MC, Terneus K, Hall Q, Tan L, Wang Y, Wegenhart BL, Chen L, Lamport DT, Chen Y, Kieliszewski MJ. 2008.** Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 2226–2231.
- Castilleux R, Plancot B, Gügi B, Attard A, Loutelier-Bourhis C, Lefranc B, Nguema-Ona E, Arkoun M, Yvin J-C, Driouich A, et al. Soumis.** Extensin arabinosylation involvement in root response to elicitors and pathogenic oomycetes.
- Castilleux R, Plancot B, Ropitiaux M, Carreras A, Leprince J, Boulogne I, Follet-Gueye M-L, Popper ZA, Driouich A, Vicré M. En préparation.** Root defence: how important are cell wall extensins?
- Castilleux R, Ropitiaux M, Manasfi Y, Bernard S, Vicré-Gibouin M, Driouich A. Accepted.** Contributions to arabinogalactan proteins analysis. In: Popper ZA, ed. *The Plant Cell Wall. Methods in Molecular Biology*. New York: Springer Press.
- Chen Y, Dong W, Tan L, Held M, Kieliszewski M. 2015.** arabinosylation plays a crucial role in extensin cross-linking *in vitro*. *Biochemistry Insights* **8(S2)**: 1–13.
- Chen J, Zhao J, Ning J, Liu Y, Xu J, Tian S, Zhang L, Sun M-X. 2014.** NtProRP1, a novel proline-rich protein, is an osmotic stress-responsive factor and specifically functions in pollen tube growth and early embryogenesis in *Nicotiana tabacum*: NtProRP1 modulates pollen tube and embryo growth. *Plant, Cell & Environment* **37**: 499–511.
- Choi HW, Klessig DF. 2016.** DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology* **16**.

- Chormova D, Fry SC. 2016.** Boron bridging of rhamnogalacturonan-II is promoted *in vitro* by cationic chaperones, including polyhistidine and wall glycoproteins. *New Phytologist* **209**: 241–251.
- Daudi A, Cheng Z, O'Brien JA, Mammarella N, Khan S, Ausubel FM, Bolwell GP. 2012.** The apoplastic oxidative burst peroxidase in arabidopsis is a major component of pattern-triggered immunity. *The Plant Cell* **24**: 275–287.
- Deepak S, Shailasree S, Kini RK, Muck A, Mithöfer A, Shetty SH. 2010.** Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defence. *Journal of Phytopathology* **158**: 585–593.
- Dhugga KS. 2004.** Guar seed -mannan synthase is a member of the cellulose synthase super gene family. *Science* **303**: 363–366.
- Dong W, Kieliszewski M, Held MA. 2015.** Identification of the pI 4.6 extensin peroxidase from *Lycopersicon esculentum* using proteomics and reverse-genomics. *Phytochemistry* **112**: 151–159.
- Draeger C, Ndinyanka Fabrice T, Gineau E, Mouille G, Kuhn BM, Moller I, Abdou M-T, Frey B, Pauly M, Bacic A, et al. 2015.** Arabidopsis leucine-rich repeat extensin (LRX) proteins modify cell wall composition and influence plant growth. *BMC Plant Biology* **15**.
- Driouich A, Durand C, Cannesan M-A, Percoco G, Vicre-Gibouin M. 2010.** Border cells versus border-like cells: are they alike? *Journal of Experimental Botany* **61**: 3827–3831.
- Driouich A, Follet-Gueye M-L, Vicré-Gibouin M, Hawes M. 2013.** Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 489–495.
- Dumont M, Lehner A, Bouton S, Kiefer-Meyer MC, Voxeur A, Pelloux J, Lerouge P, Mollet J-C. 2014.** The cell wall pectic polymer rhamnogalacturonan-II is required for proper pollen tube elongation: implications of a putative sialyltransferase-like protein. *Annals of Botany* **114**: 1177–1188.
- Egelund J, Obel N, Ulvskov P, Geshi N, Pauly M, Bacic A, Petersen BL. 2007.** Molecular characterization of two *Arabidopsis thaliana* glycosyltransferase mutants, *rra1* and *rra2*, which have a reduced residual arabinose content in a polymer tightly associated with the cellulosic wall residue. *Plant Molecular Biology* **64**: 439–451.
- Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A. 2010.** Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiology* **153**: 403–419.
- Erb M, Lenk C, Degenhardt J, Turlings TC. 2009.** The underestimated role of roots in defense against leaf attackers. *Trends in plant science* **14**: 653–659.
- Fragkostefanakis S, Sedeek KEM, Raad M, Zaki MS, Kalaitzis P. 2014.** Virus induced gene silencing of three putative prolyl 4-hydroxylases enhances plant growth in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Molecular Biology* **85**: 459–471.

- Francoz E, Ranocha P, Nguyen-Kim H, Jamet E, Burlat V, Dunand C. 2015.** Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry* **112**: 15–21.
- Gaspar YM, Nam J, Schultz CJ, Lee L-Y, Gilson PR, Gelvin SB, Bacic A. 2004.** Characterization of the Arabidopsis Lysine-Rich Arabinogalactan-Protein *AtAGP17* Mutant (*rat1*) That Results in a Decreased Efficiency of Agrobacterium Transformation. *Plant Physiology* **135**: 2162–2171.
- Gille S, Hänsel U, Ziemann M, Pauly M. 2009.** Identification of plant cell wall mutants by means of a forward chemical genetic approach using hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 14699–14704.
- Gouveia BC, Calil IP, Machado JPB, Santos AA, Fontes EPB. 2017.** Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. *Frontiers in Microbiology* **7**.
- Hall Q, Cannon MC. 2002.** The cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein RSH is essential for normal embryo development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **14**: 1161–1172.
- Harholt J, Suttangkakul A, Vibe Scheller H. 2010.** Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology* **153**: 384–395.
- Hawes MC, Bengough G, Cassab G, Ponce G. 2003.** Root caps and rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 352–367.
- Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X. 2000.** The role of root border cells in plant defense. *Trends in plant science* **5**: 128–133.
- Held MA, Tan L, Kamyab A, Hare M, Shpak E, Kieliszewski MJ. 2004.** Di-isodityrosine is the intermolecular cross-link of isodityrosine-rich extensin analogs cross-linked *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 55474–55482.
- Hermanns M, Slusarenko AJ, Schlaich NL. 2003.** Organ-specificity in a plant disease is determined independently of *R* gene signaling. *Molecular plant-microbe interactions* **16**: 752–759.
- Herrmann A, König S, Lechtenberg M, Sehlbach M, Vakhrushev SY, Peter-Katalinic J, Hensel A. 2012.** Proteoglycans from *Boswellia serrata* Roxb. and *B. carteri* Birdw. and identification of a proteolytic plant basic secretory protein. *Glycobiology* **22**: 1424–1439.
- Hijazi M, Velasquez SM, Jamet E, Estevez JM, Albenne C. 2014.** An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. *Frontiers in Plant Science* **5**: 395.
- Jensen JK, Sørensen SO, Harholt J, Geshi N, Sakuragi Y, Møller I, Zandleven J, Bernal AJ, Jensen NB, Sørensen C, et al. 2008.** Identification of a xylogalacturonan xylosyltransferase involved in pectin biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**: 1289–1302.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.

- Katagiri F, Tsuda K. 2010.** Understanding the plant immune system. *Molecular plant-microbe interactions* **23**: 1531–1536.
- Kawasaki S. 1989.** Extensin secreted into the culture medium by tobacco cells I. Purification and some properties. *Plant and cell physiology* **30**: 259–265.
- Kitazawa K, Tryfona T, Yoshimi Y, Hayashi Y, Kawauchi S, Antonov L, Tanaka H, Takahashi T, Kaneko S, Dupree P, et al. 2013.**  $\beta$ -galactosyl Yariv reagent binds to the -1,3-galactan of arabinogalactan proteins. *Plant Physiology* **161**: 1117–1126.
- Klepsch MM, Schmitt M, Paul Knox J, Jansen S. 2016.** The chemical identity of intervessel pit membranes in *Acer* challenges hydrogel control of xylem hydraulic conductivity. *AoB Plants* **8**: plw052.
- Knee EM, Gong F-C, Gao M, Teplitski M, Jones AR, Foxworthy A, Mort AJ, Bauer WD. 2001.** Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 775–784.
- Knox JP, Peart J, Neill SJ. 1995.** Identification of novel cell surface epitopes using a leaf epidermal strip assay system. *Planta* **196**: 266–270.
- Kong P, McDowell JM, Hong C. 2017.** Zoospore exudates from *Phytophthora nicotianae* affect immune responses in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **12**: e0180523.
- Koroney AS, Plasson C, Pawlak B, Sidikou R, Driouich A, Menu-Bouaouiche L, Vicré-Gibouin M. 2016.** Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*. *Annals of Botany* **118**: 797–808.
- Lamport DTA, Kieliszewski MJ, Chen Y, Cannon MC. 2011.** Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiology* **156**: 11–19.
- Lanoue A, Burlat V, Schurr U, Röse US. 2010.** Induced root-secreted phenolic compounds as a belowground plant defense. *Plant signaling & behavior* **5**: 1037–1038.
- Lechenet M, Dessaint F, Py G, Makowski D, Munier-Jolain N. 2017.** Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms. *Nature Plants* **3**: 17008.
- Lerouge P, O'Neill MA, Darvill AG, Albersheim P. 1993.** Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Research* **243**: 359–371.
- Leroux O, Knox JP, Masschaele B, Bagniewska-Zadworna A, Marcus SE, Claeys M, van Hoorebeke L, Viane RLL. 2011.** An extensin-rich matrix lines the carinal canals in *Equisetum ramosissimum*, which may function as water-conducting channels. *Annals of Botany* **108**: 307–319.

- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J. 2011.** Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 183–193.
- MacDougall AJ, Brett GM, Morris VJ, Rigby NM, Ridout MJ, Ring SG. 2001.** The effect of peptide–pectin interactions on the gelation behaviour of a plant cell wall pectin. *Carbohydrate Research* **335**: 115–126.
- Manosalva P, Manohar M, von Reuss SH, Chen S, Koch A, Kaplan F, Choe A, Micikas RJ, Wang X, Kogel K-H, et al. 2015.** Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. *Nature Communications* **6**: 7795.
- Marcel S, Sawers R, Oakeley E, Angliker H, Paszkowski U. 2010.** Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell* **22**: 3177–3187.
- Meng Y, Huang Y, Wang Q, Wen Q, Jia J, Zhang Q, Huang G, Quan J, Shan W. 2015.** Phenotypic and genetic characterization of resistance in *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Frontiers in Plant Science* **6**: 378.
- Meng Y, Zhang Q, Ding W, Shan W. 2014.** *Phytophthora parasitica* : a model oomycete plant pathogen. *Mycology* **5**: 43–51.
- Merkouropoulos G, Shirsat AH. 2003.** The unusual Arabidopsis extensin gene *atExt1* is expressed throughout plant development and is induced by a variety of biotic and abiotic stresses. *Planta* **217**: 356–366.
- Millet YA, Danna CH, Clay NK, Songnuan W, Simon MD, Werck-Reichhart D, Ausubel FM. 2010.** Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns. *The Plant Cell* **22**: 973–990.
- Møller SR, Yi X, Velásquez SM, Gille S, Hansen PLM, Poulsen CP, Olsen CE, Rejzek M, Parsons H, Zhang Y, et al. 2017.** Identification and evolution of a plant cell wall specific glycoprotein glycosyl transferase, ExAD. *Scientific Reports* **7**: 45341.
- Mravec J, Guo X, Hansen AR, Schückel J, Kračun SK, Mikkelsen MD, Mouille G, Johansen IE, Ulvskov P, Domozych DS, et al. 2017.** Pea border cell maturation and release involve complex cell wall structural dynamics. *Plant Physiology* **174**: 1051–1066.
- Muthamilarasan M, Prasad M. 2013.** Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences* **38**: 433–449.
- Neumetzler L, Humphrey T, Lumba S, Snyder S, Yeats TH, Usadel B, Vasilevski A, Patel J, Rose JKC, Persson S, et al. 2012.** The *FRIABLE1* gene product affects cell adhesion in Arabidopsis. *PLoS ONE* **7**: e42914.
- Nguema-Ona E, Bannigan A, Chevalier L, Baskin TI, Driouich A. 2007.** Disruption of arabinogalactan proteins disorganizes cortical microtubules in the root of *Arabidopsis thaliana*: Arabinogalactan proteins and cortical microtubules. *The Plant Journal* **52**: 240–251.

- Nguema-Ona E, Coimbra S, Vicro-Gibouin M, Mollet J-C, Driouich A. 2012.** Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Annals of Botany* **110**: 383–404.
- Nguema-Ona E, Vicro-Gibouin M, Cannesan M-A, Driouich A. 2013.** Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions. *Trends in Plant Science* **18**: 440–449.
- Nguema-Ona E, Vicro-Gibouin M, Gotté M, Plancot B, Lerouge P, Bardor M, Driouich A. 2014.** Cell wall *O*-glycoproteins and *N*-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Frontiers in Plant Science* **5**: 499.
- Nuñez A, Fishman ML, Fortis LL, Cooke PH, Hotchkiss AT. 2009.** Identification of extensin protein associated with sugar beet pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 10951–10958.
- Ogawa-Ohnishi M, Matsushita W, Matsubayashi Y. 2013.** Identification of three hydroxyproline *O*-arabinosyltransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology* **9**: 726–730.
- O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P, Darvill AG. 2001.** requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science* **294**: 846–849.
- Passardi F, Tognolli M, De Meyer M, Penel C, Dunand C. 2006.** Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta* **223**: 965–974.
- Pereira AM, Pereira LG, Coimbra S. 2015.** Arabinogalactan proteins: rising attention from plant biologists. *Plant Reproduction* **28**: 1–15.
- Pereira CS, Ribeiro JM, Vatulescu AD, Findlay K, MacDougall AJ, Jackson PA. 2011.** Extensin network formation in *Vitis vinifera* callus cells is an essential and causal event in rapid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced reduction in primary cell wall hydration. *BMC plant biology* **11**: 1.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009.** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* **5**: 308–316.
- Plancot B, Santaella C, Jaber R, Kiefer-Meyer MC, Follet-Gueye M-L, Leprince J, Gattin I, Souc C, Driouich A, Vicro-Gibouin M. 2013.** Deciphering the responses of root border-like cells of *Arabidopsis* and flax to pathogen-derived elicitors. *Plant Physiology* **163**: 1584–1597.
- Price NJ, Pinheiro C, Soares CM, Ashford DA, Ricardo CP, Jackson PA. 2003.** A Biochemical and molecular characterization of LEP1, an extensin peroxidase from lupin. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 41389–41399.
- Rashid A. 2016.** Defense responses of plant cell wall non-catalytic proteins against pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **94**: 38–46.
- Reguera M, Abreu I, Brewin NJ, Bonilla I, Bolaños L. 2010.** Borate promotes the formation of a complex between legume AGP-extensin and Rhamnogalacturonan II and enhances production of *Rhizobium* capsular polysaccharide during infection thread development in *Pisum*

*sativum* symbiotic root nodules: Boron mediated legume-*Rhizobium* cell surface interactions. *Plant, Cell & Environment* **33**: 2112–2120.

**Saito F, Suyama A, Oka T, Yoko-o T, Matsuoka K, Jigami Y, Shimma Y. 2014.** Identification of novel peptidyl serine  $\alpha$ -galactosyltransferase gene family in plants. *Journal of Biological Chemistry* **289**: 20405–20420.

**Scheller HV, Ulvskov P. 2010.** Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 263–289.

**Schena L, Hughes KJD, Cooke DEL. 2006.** Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR: Multiplex detection of forest phytophthoras. *Molecular Plant Pathology* **7**: 365–379.

**Schlink K. 2010.** Down-regulation of defense genes and resource allocation into infected roots as factors for compatibility between *Fagus sylvatica* and *Phytophthora citricola*. *Functional & Integrative Genomics* **10**: 253–264.

**Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizedeh H, Lamport D. 1996.** Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val—Tyr—Lys as putative intermolecular cross-link site. *The Plant Journal* **9**: 477–489.

**Schröder R, Atkinson RG, Redgwell RJ. 2009.** Re-interpreting the role of endo- $\beta$ -mannanases as mannan endotransglycosylase/hydrolases in the plant cell wall. *Annals of Botany* **104**: 197–204.

**Seifert GJ, Roberts K. 2007.** The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 137–161.

**Showalter AM. 2001.** Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **58**: 1399–1417.

**Showalter AM, Keppler BD, Liu X, Lichtenberg J, Welch LR. 2016.** Bioinformatic identification and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology* **16**: 229.

**Smallwood M, Beven A, Donovan N, Neill SJ, Peart J, Roberts K, Knox JP. 1994.** Localization of cell wall proteins in relation to developmental anatomy of the carrot root apex. *The Plant Journal* **5**: 237–246.

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

**Smith JJ, Muldoon EP, Willard JJ, Lamport DT. 1986.** Tomato extensin precursors P1 and P2 are highly periodic structures. *Phytochemistry* **25**: 1021–1030.

**Somerville C. 2006.** Cellulose synthesis in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**: 53–78.

- Souza C de A, Li S, Lin AZ, Boutrot F, Grossmann G, Zipfel C, Somerville SC. 2017.** Cellulose-derived oligomers act as damage-associated molecular patterns and trigger defense-like responses. *Plant Physiology* **173**: 2383–2398.
- Sujkowska-Rybkowska M, Borucki W. 2014.** Accumulation and localization of extensin protein in apoplast of pea root nodule under aluminum stress. *Micron* **67**: 10–19.
- Svetek J, Yadav MP, Nothnagel EA. 1999.** Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose arabinogalactan proteins. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 14724–14733.
- Tran TM, MacIntyre A, Hawes M, Allen C. 2016.** Escaping underground nets: extracellular DNases degrade plant extracellular traps and contribute to virulence of the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *PLOS Pathogens* **12**: e1005686.
- Valentin R, Cerclier C, Geneix N, Aguié-Béghin V, Gaillard C, Ralet M-C, Cathala B. 2010.** Elaboration of extensin–pectin thin film model of primary plant cell wall. *Langmuir* **26**: 9891–9898.
- Velasquez SM, Marzol E, Borassi C, Pol-Fachin L, Ricardi MM, Mangano S, Juarez SPD, Salter JDS, Dorosz JG, Marcus SE, et al. 2015.** Low sugar is not always good: impact of specific *O*-glycan defects on tip growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **168**: 808–813.
- Velasquez SM, Ricardi MM, Dorosz JG, Fernandez PV, Nadra AD, Pol-Fachin L, Egelund J, Gille S, Harholt J, Ciancia M, et al. 2011.** *O*-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science* **332**: 1401–1403.
- Velasquez M, Salter JS, Dorosz JG, Petersen BL, Estevez JM. 2012.** recent advances on the posttranslational modifications of EXTs and their roles in plant cell walls. *Frontiers in plant science* **3**: 93.
- Vicré M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A. 2005.** Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with Rhizobacteria. *Plant Physiology* **138**: 998–1008.
- Voiniciuc C, Schmidt MH-W, Berger A, Yang B, Ebert B, Scheller HV, North HM, Usadel B, Günl M. 2015.** MUCILAGE-RELATED10 produces galactoglucomannan that maintains pectin and cellulose architecture in *Arabidopsis* seed mucilage. *Plant Physiology* **169**: 403–420.
- Walker CA, van West P. 2007.** Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biology Reviews* **21**: 10–18.
- Wang M, Heimovaara-Dijkstra S, Meulen RM, Knox JP, Neill SJ. 1995.** The monoclonal antibody JIM19 modulates abscisic acid action in barley aleurone protoplasts. *Planta* **196**: 271–276.
- Wang Y, Meng Y, Zhang M, Tong X, Wang Q, Sun Y, Quan J, Govers F, Shan W. 2011.** Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Phytophthora parasitica* and identification of variation in



host specificity: The Arabidopsis-Phytophthora pathosystem. *Molecular Plant Pathology* **12**: 187–201.

**Wen F, VanEtten HD, Tsaprailis G, Hawes MC. 2007.** Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. *Plant Physiology* **143**: 773–783.

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

**Wu Y, Fan W, Li X, Chen H, Takáč T, Šamajová O, Fabrice MR, Xie L, Ma J, Šamaj J, et al. 2017.** Expression and distribution of extensins and AGPs in susceptible and resistant banana cultivars in response to wounding and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports* **7**: 42400.

**Wyrsh I, Domínguez-Ferreras A, Geldner N, Boller T. 2015.** Tissue-specific FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) expression in roots restores immune responses in Arabidopsis *fls2* mutants. *New Phytologist* **206**: 774–784.

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

**Xie F, Williams A, Edwards A, Downie JA. 2012.** A plant arabinogalactan-like glycoprotein promotes a novel type of polar surface attachment by *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 250–258.

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

**Youl JJ, Bacic A, Oxley D. 1998.** Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 7921–7926.

**Yu X, Feng B, He P, Shan L. 2017.** From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annual Review of Phytopathology* **55**: 109–137.

**Yu L, Zhou Y, Knox JP. 2011.** Ginseng root water-extracted pectic polysaccharides originate from secretory cavities. *Planta* **234**: 487–499.

**Zagorchev L, Odjakova M. 2011.** Hydroxyproline rich proteins in salt adapted embryogenic suspension cultures of *Dactylis Glomerata* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **25**: 2321–2328.

**Zhang C, Pan S, Chen H, Cai T, Zhuang C, Deng Y, Zhuang Y, Zeng Y, Chen S, Zhuang W. 2016.** Characterization of *NtRELI*, a novel root-specific gene from tobacco, and upstream promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts. *Plant Cell Reports* **35**: 757–769.

**Zhang X, Ren Y, Zhao J. 2008.** Roles of extensins in cotyledon primordium formation and shoot apical meristem activity in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Experimental Botany* **59**: 4045–4058.





# Annexes



## Annexes

### Annexe 1 : Article 3 : Contributions to arabinogalactan proteins analysis

**Castilleux R, Ropitiaux M, Manasfi Y, Bernard S, Viché-Gibouin M, Driouich A.** (Accepté) Contributions to arabinogalactan proteins analysis. In: Popper ZA, ed. The Plant Cell Wall. Methods in Molecular Biology. New York: Springer Press.

Ce chapitre de livre a été accepté et sera publié prochainement dans le livre « The Plant Cell Wall. Methods in Molecular Biology. » aux éditions Springer Press.

Les ArabinoGalactane Protéines (AGPs) sont des protéoglycannes de la famille des HRGPs (Hydroxyproline-Rich Glycoproteins), impliquées dans un grand nombre de fonctions biologiques chez les plantes. Elles sont présentes en quantité importante dans la racine, notamment au niveau de la paroi cellulaire des cellules bordantes (BC) et apparentées (BLC) ainsi que dans les sécrétions. Afin d'étudier la diversité structurale et fonctionnelle des AGPs, des techniques de détection, localisation, extraction et quantification des AGPs s'avèrent par conséquent nécessaires.

Le savoir-faire de notre laboratoire en la matière a été mis à contribution pour détailler différents protocoles adaptés à l'étude des racines pour caractériser les AGPs. Ces protocoles font intervenir des méthodes immunocytochimiques à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-AGPs, ainsi que différentes approches biochimiques rendues possibles grâce au réactif de  $\beta$ -D-glucosyl Yariv.

## Contributions to arabinogalactan proteins analysis

**Romain Castilleux, Marc Ropitiaux, Youssef Manasfi, Sophie Bernard,  
Maïté Vicré-Gibouin, Azeddine Driouich**

### Abstract

Arabinogalactan proteins (AGPs) are important plant proteoglycans involved in many development processes. In roots, AGPs occur in the cell wall of root cells and root cap derived-cells as well as in the secreted mucilage. Detection, localization and quantification techniques are therefore essential to unravel the AGPs diversity of structures and functions. This chapter details root-adapted immunocytochemical methods using monoclonal antibodies, and a collection of biochemical analysis protocols using  $\beta$ -D-glucosyl Yariv reagent for comprehensive AGPs characterization.

**Key-words:** Arabinogalactan proteins, Cell wall,  $\beta$ -D-glucosyl Yariv, Electrophoresis, Immunocytochemistry, Monoclonal antibodies, Root.

### 1. Introduction

Arabinogalactan proteins (AGPs) are widespread proteoglycans in plants, present in all organs such as leaves, stems and roots (1). They are specifically found in the cell wall, the plasma membrane and secretions. The binding to the plasma membrane is mediated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (2, 3). AGPs are classified as hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) due to their particular structure with a protein core rich in hydroxyproline residues that are *O*-glycosylated (4). The *O*-glycan moiety is mostly composed of D-galactose linked in  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,6, and L-arabinose linked in  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,5 and  $\beta$ -1,3. Other monosaccharides such as L-rhamnose, L-fucose, D-xylose or D-glucuronic acid can also be present on AGP glycans as “minor” sugars (4–6).

However, the composition and the structure of AGPs are diverse, which may explain the strong heterogeneity of their biological functions. AGPs have been shown to be important for many aspects of plant survival and development, including cell growth and morphology, pollen tube guidance, somatic embryogenesis and root development (6, 7). Recent studies have demonstrated that AGPs are essential in the interaction between roots and soil-borne microorganisms (8–10). AGPs are indeed required for both root colonization by beneficial microbes such as *Rhizobium sp.* and root protection against pathogens by either repelling or trapping them (8–11). This implies that AGPs are not only present within the cell wall but also in the root mucilage (9, 12, 13). The mucilage is mainly secreted by root cap cells and root cap-derived cells, namely border cells (BCs) or border-like cells (BLCs) depending on the plant species (8, 14).

The immunocytochemistry approach is a very useful technique to unravel the presence of AGP epitopes within root tissues using monoclonal antibodies. A large set of anti-AGP antibodies including LM2 (15, 16), LM14 (17), JIM4 (16, 18, 19), JIM8, JIM13, JIM14, JIM15, JIM16 (16, 20) and MAC207 (16, 21) are commercially available. The exact nature of the recognized epitopes is not always clearly identified. However, the LM2 antibody is known to recognize a  $\beta$ -linked glucuronic acid epitope whereas JIM4, JIM13 and MAC207 are believed to bind to a

GlcA $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)GalA $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)Rha motif. These antibodies are valuable and highly useful tools to investigate the diversity of AGPs structure, function and location.

It is worth noting that immunodetection is limited by the requirement of an unmasked epitope and the likelihood that some AGPs in a given sample would not be recognized by any of these antibodies. A complementary approach to immunolocalization and cell imaging is therefore needed to characterize in more details AGPs. This can be achieved by using the  $\beta$ -D-glucosyl Yariv reagent ( $\beta$ -D-GlcY) that enables purification of AGPs, as well as their biochemical analyses using electrophoresis techniques (e.g. Rocket or Cross electrophoresis) and others (e.g. radial gel diffusion) (9, 22–27).  $\beta$ -D-GlcY is widely used as a probe that binds and precipitates  $\beta$ -1,3-galactan-containing AGPs (28–31).

In order to detect, localize and extract AGPs, immunocytochemical and biochemical methods have been already described in the previous book edition (27, 32). Nevertheless, significant improvements have been made since then, either for routine experiments or for specific purposes. In the present chapter, we describe new protocols for AGPs immunolocalization specifically dedicated to root tissues, root border cells and root mucilage. As a matter of fact, root BCs and/or root BLCs and mucilage can be easily lost during “classical” immunolabeling procedure, and it is important to have them preserved during manipulations. Moreover, a purification step has been added to the AGPs extraction and a supplemental analysis tool has been set up.

Therefore, two methods to immunolocalize AGP epitopes are presented here in this chapter. The first one is adapted for very thin roots releasing several files of root BLCs as it occurs in the model plant *Arabidopsis thaliana*. The second method is more appropriate for plants with a thicker root releasing isolated BCs and an abundant mucilage such as in the leguminous species, e.g. *Pisum sativum*. Finally, AGPs extraction and purification procedures as well as analysis techniques, such as Rocket electrophoresis and radial gel diffusion, are also presented.

## 2. Materials

### 2.1 Immunolabeling of « thin » root tips with BLCs (e.g. *Arabidopsis thaliana*)

1. Plant material.
2. Scalpel and tweezers.
3. Superfrost diagnostic slides 10-wells 8 mm (Zuzi, ref: 30503101).
4. Micropipette.
5. 200  $\mu$ L pipette tips.
6. Gloves.
7. Flow hood.
8. Stock solution paraformaldehyde (PFA) 16% (EMS, ref: 15710). Storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
9. Phosphate-buffered saline (PBS) 0.01 M : NaCl 137 mM, KCl 47 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{H}_2\text{O})_{12}$  7 mM (pH 7.2). Autoclave before storage at  $+4^{\circ}\text{C}$  (see **Note 1**).
10. Refrigerator.
12. Bovine serum albumine (BSA; AURION, ref: 900.011) for blocking non-specific binding sites. Storage at  $+4^{\circ}\text{C}$ .
13. Tween 20 (SIGMA, ref: P1379).
14. Primary monoclonal antibody (PlantProbes, www.plantprobes.net/). Storage at  $+4^{\circ}\text{C}$ .
15. A wet chamber for maintaining air humidity (**Fig. 1.**, see **Note 2**).
16. Secondary antibody: Anti-rat IgG coupled with FITC (Fluorescein isothiocyanate; SIGMA, ref: F6258). Storage at  $+4^{\circ}\text{C}$ .



17. Coverslip (Menzel-Glaser; 24 x 60 mm # 1).
18. Nail polish (EMS, ref: 72180).

## **2.2 Immunolabeling of “thick” root tips with BCs and mucilage (e.g. *Pisum sativum*)**

1. Plant material.
2. Ultrathin tweezers.
3. Microscope slides 18-wells-Poly-L-Lysine sterile (IBIDI, ref: 81824).
4. Micropipette.
5. 200  $\mu$ L pipette tips.
6. Gloves.
7. Flow hood.
8. Stock solution paraformaldehyde (PFA) 16% (EMS, ref: 15710). Storage in  $-20^{\circ}\text{C}$ .
9. PIPES (Alfa Aesar, ref: A16090).
10.  $\text{CaCl}_2$ .
11. Phosphate-buffered saline (PBS) 0.01 M : NaCl 137 mM, KCl 47 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{H}_2\text{O})_{12}$  7 mM (pH 7.2) (see **Note 1**).
12. Refrigerator.
13. Bovine serum albumine (BSA; AURION, ref: 900.011) for blocking non-specific binding sites. Storage at  $+4^{\circ}\text{C}$ .
14. Primary monoclonal antibody (PlantProbes [www.plantprobes.net/](http://www.plantprobes.net/)). Storage at  $+4^{\circ}\text{C}$ .
15. A wet chamber for maintaining air humidity (**Fig. 1**, see **Note 2**).
16. Secondary antibody: Anti-rat IgG coupled with TRITC (Tetramethylrhodamine; SIGMA, ref: T5778). Storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
17. Citifluor (Agar scientific, ref: AF2 R1320).

## **2.3 AGPs extraction**

1. Plant material.
2. Liquid nitrogen.
3. Mortar and pestle.
4. Freeze-dryer.
5. Gloves.
6. Extraction buffer: 50 mM Tris-base (adjust pH 8 with HCl), 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}(\text{H}_2\text{O})_2$ , 2 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 1% Triton X-100 (see **Notes 14,15**).
7. Corning tube 50 mL.
8. Refrigerator.
9. Rotating shaker.
10. Centrifuge.
11. Ethanol 96%.
12. 50 mM Tris-base (adjust pH 8 with HCl).
13. Dialysis tubing 3.5 kDa.
14. Freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ .
15. 1% NaCl.

## **2.4 Purification of AGPs**

1. 2 mL Eppendorf tubes.
2. Gloves.

3. 2 mg/mL  $\beta$ -D-Glucosyl Yariv reagent ( $\beta$ -D-GlcY).
4. Refrigerator.
5. 1% (w/v) NaCl.
6. 100% methanol.
7. Flow hood.
8. 100% dimethylsulfoxide (DMSO).
9. Sodium hydrosulfite.
10. Vortex.
11. Ultra pure water.
12. PD-10 Desalting Columns containing 8.3 mL of Sephadex™ G-25 Medium from GE Healthcare (**Fig. 6A**).
13. 1.5 mL Eppendorf tubes.
14. Radial gel diffusion (protocol described in methods, paragraph 3.4).

### **2.5 Radial gel diffusion :AGPs detection / semi-quantification**

1. Radial gel diffusion : 1% (w/v) agarose gel containing 0.15 M NaCl, 0.02% (w/v) NaNO<sub>3</sub>, 10  $\mu$ g/mL  $\beta$ -D-GlcY (see **Note 16**).
2. Weighing scale.
3. Square Petri dish 120 mm  $\times$  120 mm.
4. Micropipette.
5. 200  $\mu$ L cut pipette tips.
6. Gum Arabic (Gum Acacia, Fisher scientific, ref : G/1050/53).
7. 1% (w/v) NaCl.
8. Refrigerator.
9. Wet chamber as in **Fig.1**.
10. Shaker platform.

### **2.6 Rocket electrophoresis: AGPs quantification**

1. Rocket gel : 1% (w/v) agarose gel containing 25 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 200 mM glycine, 20  $\mu$ g/mL  $\beta$ -D-GlcY (see **Note 16**).
2. Gel tray 18x15 cm (see **Note 17**).
3. Tape (width 2 cm).
4. 10  $\mu$ L pipette tips.
5. 10  $\mu$ L cut pipette tips.
6. Gum Arabic (Gum Acacia, Fisher scientific, ref: G/1050/53).
7. 1% (w/v) NaCl.
8. Running buffer 1: 25 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 200 mM glycine (see **Note 16**).
9. Isoelectric focusing electrophoresis system (IEF).
10. Shaker platform.

### **2.7 Agarose gel electrophoresis: detection of AGP sub-populations**

1. Agarose gel : 1% (w/v) agarose gel containing 90 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 90 mM boric acid, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> (see **Note 16**).
2. Gel tray 18x15 cm and the comb (see **Note 17**).
3. Tape (width 2 cm).
4. Loading buffer: 32% (v/v) glycerol, 2% (w/v) Bromophenol blue.

5. Vortex.
6. Agarose gel electrophoresis system.
7. Running buffer 2: 90 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 90 mM boric acid, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> (see **Note 16**).
8. β-D-GlcY (see **Note 18**).
9. 1% (w/v) NaCl.
10. Shaker platform.

### **2.8 2D electrophoresis: characterization of AGP sub-populations and quantification**

1. Agarose gel : 1% (w/v) agarose gel containing 90 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 90 mM boric acid, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> (see **Note 16**).
2. Gel tray 18x15 cm and the comb (see **Note 17**).
3. Tape (width 2 cm).
4. Loading buffer: 32% (v/v) glycerol, 2% (w/v) Bromophenol blue.
5. Vortex.
6. Agarose gel electrophoresis system.
7. Running buffer 2: 90 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 90 mM boric acid, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> (see **Note 16**).
8. Scalpel.
9. Rocket gel : 1% (w/v) agarose gel containing 25 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 200 mM glycine, 20 μg/mL β-D-GlcY (see **Note 18**).
10. Running buffer 1: 25 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 200 mM glycine.
11. Isoelectric focusing electrophoresis system (IEF).
12. 1% (w/v) NaCl.
13. Shaker Platform.

### 3. Methods

#### 3.1 Immunolabeling of « thin » root tips with BLCs (e.g. *Arabidopsis thaliana*)

This protocol allows to have a general view of the root apex and provides an optimal preservation of BLCs organization at the root tip (see **Note 3**). This method has been adapted from (33).

- 1) Cut root tips using a scalpel (**Fig. 2A.**), place them onto a 10 wells superfrost diagnostic slide (**Fig. 2B.**) and fix them by adding 20  $\mu$ L of 4% PFA (Paraformaldehyde) (**Fig. 2C.**) for 30 to 40 minutes at room temperature (RT). The liquid is removed gently by placing the pipette tip at the top of the root to limit the loss of BLCs (**Fig. 2D**, see **Note 4**).
- 2) Wash briefly at RT with PBS 1X (see **Note 5**).
- 3) Incubate for 30 to 45 minutes at RT with 3% (w/v) BSA diluted in PBS 1X (see **Note 6**).
- 4) Wash briefly at RT with PBS 1X and then with PBS 1X + 0.1% (v/v) Tween 20 (PBST) (see **Note 7**).
- 5) Incubate overnight (O/N) with primary antibody at +4°C in a wet chamber. Primary antibody is diluted at 1:5 with PBST (see **Note 8**).
- 6) Wash twice briefly at RT with PBST.
- 7) Incubate 2 hours at RT in darkness with the secondary antibody diluted at 1:30 in PBST, in a wet chamber. The second antibody is an Anti-rat IgG coupled with FITC (see **Notes 9,10**).
- 8) Wash briefly 3 times at RT with PBST.
- 9) Cover the slide with a coverslip and fix with nail polish.
- 10) Observe with a confocal laser-scanning microscope (Excitation : 488 nm ; Emission : 500-535 nm). Results are shown in **Fig. 3**.

#### 3.2 Immunolabeling of “thick” root tips with BCs and mucilage preservation (e.g. *Pisum sativum*)

The immunolabeling of “thick” root tips protocol provides a good preservation of BCs and mucilage despite several washing steps (see **Note 11**). This method has been adapted from (9).

- 1) Cut root tips using ultrathin tweezers (**Fig. 4A.**), place it onto a sterile 18-wells microscope slide Poly-L-Lysine (**Fig. 4B.**), and fix with 20  $\mu$ L of 4% PFA diluted in 50 mM PIPES, pH 7 and 1 mM CaCl<sub>2</sub> (**Fig. 4C.**) for 40 minutes at RT. The liquid is gently removed by placing the pipette tip at the top of the root to limit the loss of BCs (**Fig. 4D**, see **Note 4**).
- 2) Wash 10 minutes 4 times at RT with PBS 1X containing 1% (w/v) BSA (see **Notes 5,6**).
- 3) Incubate O/N with the primary antibody at +4°C in a wet chamber. Primary antibody is diluted at 1:5 with PBS 1X containing 1% (w/v) BSA (see **Note 8**).
- 4) Wash 10 minutes 4 times at RT with PBS 1X containing 1% (w/v) BSA.
- 5) Incubate 2 hours at +25°C in darkness with the secondary antibody diluted at 1:50 in PBS 1X containing 1% (w/v) BSA in a wet chamber. The second antibody is an Anti-rat IgG coupled with TRITC (see **Notes 9, 10**).
- 6) Wash 10 minutes 4 times at RT with PBS 1X containing 1% (w/v) BSA.
- 7) Finally wash at RT with PBS 1X for 10 minutes.
- 8) Add a drop of Citifluor (see **Notes 12,13**).

- 9) Observe with a confocal laser-scanning microscope (Excitation : 550 nm ; Emission : 560-600 nm). Results are shown in **Fig. 5**.

### 3.3 Extraction of AGPs

This method has been adapted from previously published protocols (**9, 23, 25, 27**).

- 1) Grind 10 g of plant material with liquid nitrogen using a mortar and a pestle.
- 2) Freeze the ground material then freeze-dry it (see **Note 19**).
- 3) Mix 1 g of the freeze-dried material with 40 mL of extraction buffer in 50 mL corning tube and incubate at +4°C O/N under agitation (see **Note 20**).
- 4) Centrifuge for 10 minutes at +4°C, 14000×g.
- 5) Recover the supernatant and add 5 volumes of 96% ethanol.
- 6) Incubate at +4°C O/N to precipitate high molecular weight molecules.
- 7) Centrifuge for 10 minutes at +4°C, 14000×g.
- 8) Carefully remove the supernatant and suspend the pellet in 40 mL of 50 mM Tris-base (adjust pH 8 with HCl).
- 9) Centrifuge for 10 minutes at +4°C, 14000×g.
- 10) Collect the supernatant and resuspend the pellet in 20 mL of 50 mM Tris-base previously adjusted to pH 8 with HCl.
- 11) Centrifuge for 10 minutes at +4°C, 14000×g.
- 12) Collect the supernatant and pool it with the one collected step 10.
- 13) Put the pooled supernatant under dialysis at 3.5 kDa.
- 14) After dialysis, freeze and freeze-dry the solution.
- 15) Dissolve the freeze-dried sample in 1 mL of 1% (w/v) NaCl (see **Note 21**).

### 3.4 Purification of AGPs

This method has been adapted from previously published protocols (**9, 24**).

Because of their structural heterogeneity, binding of AGPs to  $\beta$ -D-GlcY can vary depending on the sub-populations present in the sample, and therefore impacts purification quality.

- 1) Precipitate the AGPs in 2 mL Eppendorf tube by adding an equal volume of 2 mg/mL  $\beta$ -D-GlcY to the solubilized AGPs solution (see **Note 18**).
- 2) Incubate at +4°C for 48 hours.
- 3) Centrifuge for 90 minutes at RT, 10000×g.
- 4) Recover the pellet containing  $\beta$ -D-GlcY /AGPs complex.
- 5) Add 1 mL of 1% (w/v) NaCl to the pellet and vortex.
- 6) Centrifuge for 10 minutes at RT, 10000×g.
- 7) Discard the supernatant and repeat the steps 5 and 6 twice.
- 8) Add 1 mL of pure methanol to the pellet and vortex (see **Note 22**).
- 9) Centrifuge for 10 minutes at RT, 10000×g.
- 10) Discard the supernatant and repeat the steps 8 and 9 twice.
- 11) Dry the pellet under a flow hood.
- 12) Dissolve the pellet by adding 500  $\mu$ L of pure DMSO and vortex (see **Note 23**).
- 13) Add 10% to 30% (w/v) sodium hydrosulfite and vortex. Then, add ultra-pure water until the color becomes clear yellow (see **Note 24**).
- 14) Desalt the clear yellow solution with a size exclusion chromatography (PD-10 desalting columns). Recover the drops of the eluted solution in a set of 10 Eppendorf tubes of 1.5 mL (**Fig. 6B**).

- 15) Check for the presence of AGPs in each tube by radial gel diffusion (described below in Methods, paragraph 3.5).
- 16) Collect the solutions from the tubes that contain AGPs and gather them in a 15 mL corning tube.
- 17) Freeze-dry the sample.
- 18) Dissolve in 0.5 mL 1% (w/v) NaCl (see **Note 25**). Store AGPs-containing solution at -20°C until use.

### 3.5 Radial gel diffusion for rapid AGPs detection

This method has been adapted from previous published protocols (*9, 22, 23, 27*).

- 1) Prepare 100 mL of radial gel diffusion. After heating, keep the gel under agitation and add 10 µg/mL β-D-GlcY. Then, pour it in a square Petri dish (see **Notes 16, 18, 26**).
- 2) Cut out wells in the gel using 200 µL cut pipette tips (**Fig. 7A**).
- 3) Load into the wells 40 µL of gum Arabic of different concentrations as standards (e.g., 0.125 mg/L, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL). As a negative control, load 1% (w/v) NaCl.
- 4) Load 40 µL of the sample.
- 5) Incubate the gel in a wet chamber at +4°C, O/N.
- 6) The presence of AGPs is indicated by the appearance of a red halo around the wells due to the interaction with the β-D-GlcY. If the AGPs are not detected, concentrate the sample and load it again (get back to step 4).
- 7) Incubate the gel in 1% (w/v) NaCl under gentle agitation onto shaker platform to remove the excess of β-D-GlcY. Results are shown **Fig. 7B-G** (see **Note 27**).

### 3.6 Rocket electrophoresis for AGPs quantification

This method has been adapted from previously published protocols (*9, 23, 25*).

- 1) Prepare 60 mL of rocket gel (see **Notes 16, 18**).
- 2) Pour the rocket gel into the gel tray with both ends sealed with tape and without the comb installed (see **Note 30**).
- 3) Carefully transfer the rocket gel from the gel tray to the IEF platform.
- 4) Load the IEF wells with the running buffer 1 and install the filter paper salt bridges (see **Note 28**).
- 5) Cut out wells in the rocket gel using 10 µL cut pipette tips.
- 6) Load into the wells 7 µL of gum Arabic at different concentrations as standards (0.125 mg/L, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL). As a negative control, load 7 µL of 1% (w/v) NaCl.
- 7) Load 7 µL of AGPs sample.
- 8) Run the IEF electrophoresis for 16h at 200 V, 5 mA, 10 W.
- 9) Red precipitation triangle-shaped lines are formed due to the interaction between the β-D-GlcY and AGPs.
- 10) Incubate the rocket gel in 1% (w/v) NaCl under a gentle agitation to remove the excess β-D-GlcY. Results are shown **Fig. 8A** (see **Note 27**).
- 11) Calculate the surface area of each peak (Formula : Area = (bxh)/2; b : base of the peak and h : height of the peak), as detailed in **Fig. 8B**.
- 12) Associate the calculated surface area of each peak to the standard concentration to make a calibration range.

13) Quantify the sample using the calibration range (see **Note 29**).

### 3.7 Agarose gel electrophoresis : detection of AGP sub-populations

This method has been adapted from previously published protocols (**9, 23, 25, 26**).

- 1) Prepare 200 mL of agarose gel (see **Note 16**).
- 2) Pour the agarose gel into a gel tray with both ends sealed with tape and the comb installed (see **Note 30**).
- 3) Solubilize 10 to 25  $\mu\text{g}$  of AGPs samples in 30  $\mu\text{L}$  of 1% (w/v) NaCl. Then, add 10  $\mu\text{L}$  of loading buffer and vortex.
- 4) Take off the tape once the agarose gel is polymerized.
- 5) Put the gel tray with the agarose gel inside into the electrophoresis tank and add the running buffer 2.
- 6) Load the samples into the wells and run the agarose gel electrophoresis at 250 V, 120 mA for 50 minutes, or until the dye front move 8 cm. If 8 cm is not enough to separate the different AGP sub-populations, let migrating for a longer distance.
- 7) After electrophoresis, stain the gel in 10  $\mu\text{g}$   $\beta\text{-D-GlcY}$ , O/N (see **Note 18**).
- 8) A red precipitation smear is formed due to binding of AGPs by the  $\beta\text{-D-GlcY}$ .
- 9) Incubate the agarose gel in 1% (w/v) NaCl under gentle agitation to remove the excess of  $\beta\text{-D-GlcY}$ . Results are shown **Fig. 9A** (see **Note 27**).
- 10) Calculate the retention factor (Rf):  $Rf = D_s/D_d$  (**Fig. 9B**, see **Note 31**).

### 3.8 2D electrophoresis: characterization of AGP sub-populations and quantification

This method has been adapted from previously published protocols (**9, 23, 25**).

The technical steps for 2D electrophoresis are detailed in **Fig. 10**.

- 1) Prepare an agarose gel as described above (see paragraph 3.7, steps 1-6).
- 2) After agarose gel electrophoresis, cut the lanes of AGPs migration (AGP-containing strips of gel) with a scalpel.
- 3) Put them in a gel tray with both ends sealed with a tape (see **Note 30**).
- 4) Prepare a rocket gel as described above (see paragraph 3.6, step 1) and pour it into the gel tray around the cut strips.
- 5) When the rocket gel is casted around the strips, carefully transfer it from the gel tray to the IEF platform.
- 6) Load the IEF wells with the running buffer 1 and install the salt bridges (see **Note 28**).
- 7) Run the IEF electrophoresis for 16 hours at 200 V, 5 mA, 10 W.
- 8) A red precipitation area is formed due to binding of AGPs to  $\beta\text{-D-GlcY}$ .
- 9) Incubate the gel in 1% (w/v) NaCl under gentle agitation onto shaker platform to remove the excess of  $\beta\text{-D-GlcY}$  (**Fig. 11**, see **Note 27**).
- 10) Calculate the retention factor (Rf)  $Rf = D_s/D_d$  (**Fig. 11**, see **Note 31**).
- 11) Calculate the relative percentage area of each population:  $RA = (A_s/A_t) \times 100$  (**Fig. 11**, see **Note 32**).

#### 4. Notes

- 1) The PBS solution is autoclaved and stored at +4°C. Before each use, this solution is filtered through a 0.2 µm filter tip.
- 2) The wet chamber fits one or two slides.
- 3) Thin roots are slightly pressed between the slide and the coverslip offering an overall view of root cap and associated BLCs.
- 4) The solution is prepared from a 16% stock solution PFA diluted in PBS 1X. This step has to be undertaken under a flow hood due to PFA toxicity.
- 5) Washes are performed by removing the liquid with a pipette and then adding 20 µL of PBS 1X.
- 6) BSA is used for blocking non-specific binding sites. This solution is freshly prepared.
- 7) Tween 20 is used to permeabilize the membrane and help the penetration of the antibody.
- 8) Concentration of primary antibody should be adapted to each plant specimen.
- 9) Secondary antibody can be used at lower concentration down to 1:50.
- 10) Other fluorochromes can be used.
- 11) The absence of the coverslip prevents crushing of thick root tips and disturbance during observation due to instable coverslip.
- 12) Citifluor limits fluorescent photobleaching and increases the resolution for microscopical observation.
- 13) Once citifluor has been added, slides can be stored in a wet chamber in the dark at +4°C for 1 week without any labeling loss.
- 14) The extraction buffer is to be kept under agitation for at least 2 hours for a complete dissolution of the Triton X-100.
- 15) The extraction buffer and the Tris-base are toxic. Gloves are required during preparation.
- 16) The gel and the running buffer are toxic. Gloves are required.
- 17) Pour the gel gently into the gel tray without creating bubbles.
- 18) β-D-GlcY is toxic. Gloves are required.
- 19) The extraction can be performed on a fresh grinded materials.
- 20) The extraction buffer volume depends on the nature of the sample. Add extraction buffer until the sample is totally dissolved in the solution.
- 21) Residues may be present in the solution at this stage prior to purification of AGPs using β-D-GlcY.
- 22) Methanol is toxic and volatile. Use it under a flow hood and wear gloves.
- 23) The pellet should be totally dissolved. If vortexing is not enough, use a micro spatula to help dissolving the pellet.
- 24) Start with 10% (w/v) sodium hydrosulfite then add ultra-pure water until the color becomes clear yellow. If the 2 mL Eppendorf tube is full and the color remains red, add more sodium hydrosulfite to a maximum of 30% (w/v). If the color is still not clear yellow, use a bigger tube and add ultra-pure water until the color becomes clear yellow.
- 25) If the viscosity of AGPs solution is high, add more 1% (w/v) NaCl.
- 26) The plate containing the gel can be stored at +4°C.
- 27) Change the 1% (w/v) NaCl solution every 5 hours until all the excess of β-D-GlcY is removed.
- 28) The filter paper salt bridges (Whatman 17CHR, GE Healthcare Life Science, ref: 3017-915) must be properly soaked in the running buffer before installation.
- 29) To be able to quantify the sample, the resulting peak of the sample has to be in the calibration range. If not, dilute or concentrate the sample.
- 30) The tape must be properly installed by pressing it hard on the edges to avoid any leak.



- 31) Measure the migration distance of the sample (Ds) and of the dye front (Dd). The Rf of each sub-population can be calculated as follows :  $Rf = Ds/Dd$ .
- 32) Measure the area of each sub-population using ImageJ or another appropriate software. The relative percentage area (RA) of each sub-population can be calculated as follows:  
 $RA_s = [As/(At)] \times 100$ ; As : area of one sub-population; At : sum of all sub-populations areas.

## 4. Acknowledgment

The authors are grateful to La Région de Haute Normandie and le Grand Réseau de Recherche-Végétal, Agronomie, Sol et Innovation, l'Université de Rouen and Le Fonds Européen FEDER for financial support. Fluorescence images were obtained on PRIMACEN (<http://www.primacen.fr>), the Cell Imaging Platform of Normandy, Faculty of Sciences, University of Rouen, 76821 Mont Saint Aignan.

A.D. is very grateful to all former students who have contributed in 'AGP biology' work over the years, in his laboratory.

## 5. References

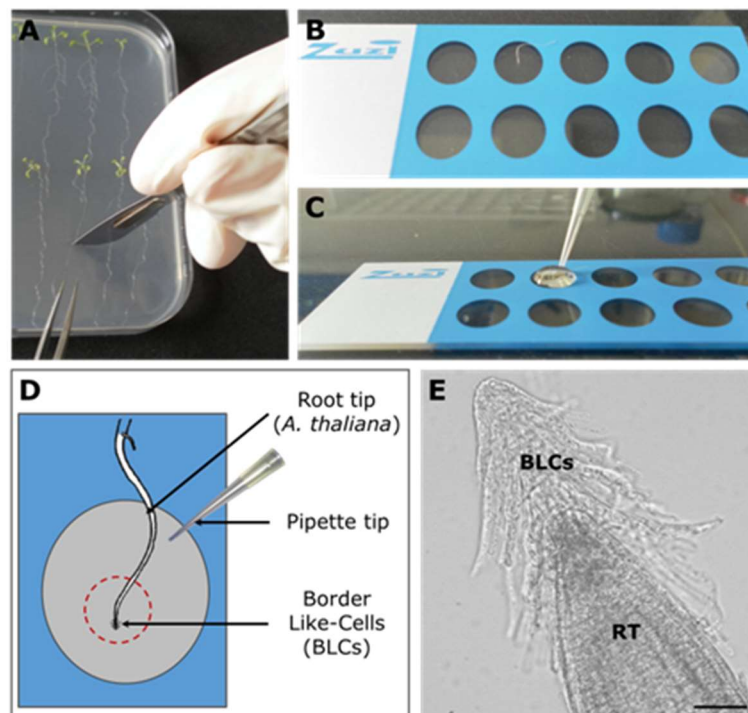
1. G.B. Fincher, B.A. Stone, and A.E. Clarke (1983) Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function, *Annual Review of Plant Physiology*. 34, 47–70.
2. J.J. Youl, A. Bacic, and D. Oxley (1998) Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95, 7921–7926.
3. J. Svetek, M.P. Yadav, and E.A. Nothnagel (1999) Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose arabinogalactan proteins, *Journal of biological chemistry*. 274, 14724–14733.
4. E. Nguema-Ona, M. Vicié-Gibouin, M. Gotté, et al. (2014) Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function, *Frontiers in Plant Science*. 5, 499.
5. A.M. Showalter (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 58, 1399–1417.
6. G.J. Seifert and K. Roberts (2007) The Biology of Arabinogalactan Proteins, *Annual Review of Plant Biology*. 58, 137–161.
7. M. Ellis, J. Egelund, C.J. Schultz, et al. (2010) Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface?, *Plant Physiology*. 153, 403–419.
8. M. Vicié, C. Santaella, S. Blanchet, et al. (2005) Root Border-Like Cells of Arabidopsis. Microscopical Characterization and Role in the Interaction with Rhizobacteria, *Plant Physiology*. 138, 998–1008.
9. M.A. Cannesan, C. Durand, C. Burel, et al. (2012) Effect of Arabinogalactan Proteins from the Root Caps of Pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* Zoospore Chemotaxis and Germination, *Plant Physiology*. 159, 1658–1670.
10. E. Nguema-Ona, M. Vicié-Gibouin, M.-A. Cannesan, et al. (2013) Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions, *Trends in Plant Science*. 18, 440–449.
11. A. Driouich, M.-L. Follet-Gueye, M. Vicié-Gibouin, et al. (2013) Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense, *Current Opinion in Plant Biology*. 16, 489–495.
12. E.M. Knee, F.-C. Gong, M. Gao, et al. (2001) Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source, *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14, 775–784.

13. A.S. Koroney, C. Plasson, B. Pawlak, et al. (2016) Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*, *Annals of Botany*. mcw128.
14. C. Durand, M. Vicre-Gibouin, M.L. Follet-Gueye, et al. (2009) The Organization Pattern of Root Border-Like Cells of Arabidopsis Is Dependent on Cell Wall Homogalacturonan, *Plant Physiology*. 150, 1411–1421.
15. M. Smallwood, E.A. Yates, W. Willats, et al. (1996) Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot, *Planta*. 198, 452–459.
16. E.A. Yates, J.-F. Valdor, S.M. Haslam, et al. (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies, *Glycobiology*. 6, 131–139.
17. I. Moller, S.E. Marcus, A. Haeger, et al. (2008) High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles, *Glycoconjugate Journal*. 25, 37–48.
18. J.P. Knox, S. Day, and K. Roberts (1989) A set of cell surface glycoproteins forms an early marker of cell position, but not cell type, in the root apical meristem of *Daucus carota* L., *Development*. 106, 47–56.
19. N.J. Stacey, K. Roberts, and J.P. Knox (1990) Patterns of expression of the JIM4 arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L., *Planta*. 180, 285–292.
20. J.P. Knox, P.J. Linstead, J. Peart, et al. (1991) Developmentally-regulated epitopes of cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to root tissue pattern formation, *The Plant Journal*. 1, 317–326.
21. R.I. Pennell, J.P. Knox, G.N. Scofield, et al. (1989) A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants., *The Journal of cell biology*. 108, 1967–1977.
22. G.-J. Van Holst and A.E. Clarke (1986) Organ-Specific Arabinogalactan-Proteins of *Lycopersicon peruvianum*(Mill) Demonstrated by Crossed Electrophoresis, *Plant Physiology*. 80, 786–789.
23. G.-J. Van Holst and A.E. Clarke (1985) Quantification of Arabinogalactan-Protein in Plant Extracts by Single Radial Gel Diffusion, *Analytical Biochemistry*. 148, 446–450.
24. A.M. Gane, D. Craik, S.L.A. Munro, et al. (1995) Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana glauca*, *Carbohydrate Research*. 277, 67–85.
25. L. Ding and J.-K. Zhu (1997) A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion, *Planta*. 203, 289–294.
26. R. Girault, I. His, C. Andeme-Onzighi, et al. (2000) Identification and partial characterization of proteins and proteoglycans encrusting the secondary cell walls of flax fibres, *Planta*. 211, 256–264.
27. Z.A. Popper (2011) Extraction and Detection of Arabinogalactan Proteins, In: Popper, Z.A. (ed.) *The Plant Cell Wall: Methods and Protocols*, pp. 245–254 Humana Press, Totowa, NJ.
28. J. Yariv, H. Lis, and E. Katchalski (1967) Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes., *Biochemical Journal*. 105, 1C.
29. W.G.T. Willats and J.P. Knox (1996) A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of beta-glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*., *The Plant Journal*. 9, 919–925.
30. K. Kitazawa, T. Tryfona, Y. Yoshimi, et al. (2013)  $\beta$ -Galactosyl Yariv Reagent Binds to the -1,3-Galactan of Arabinogalactan Proteins, *Plant Physiology*. 161, 1117–1126.

31. B.S. Paulsen, D.J. Craik, D.E. Dunstan, et al. (2014) The Yariv reagent: Behaviour in different solvents and interaction with a gum arabic arabinogalactanprotein, *Carbohydrate Polymers*. 106, 460–468.
32. C. Hervé, S.E. Marcus, and J.P. Knox (2011) Monoclonal Antibodies, Carbohydrate-Binding Modules, and the Detection of Polysaccharides in Plant Cell Walls, In: Popper, Z.A. (ed.) *The Plant Cell Wall: Methods and Protocols*, pp. 103–113 Humana Press, Totowa, NJ.
33. B. Plancot, C. Santaella, R. Jaber, et al. (2013) Deciphering the Responses of Root Border-Like Cells of Arabidopsis and Flax to Pathogen-Derived Elicitors, *Plant Physiology*. 163, 1584–1597.

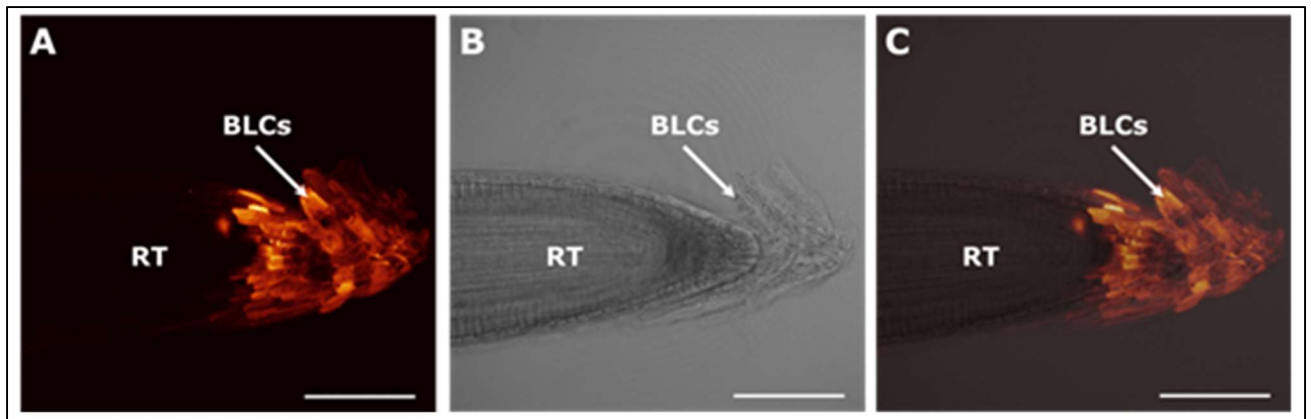


**Fig. 1.** Wet chamber (a square Petri dish containing wet filter paper to keep air humidity).

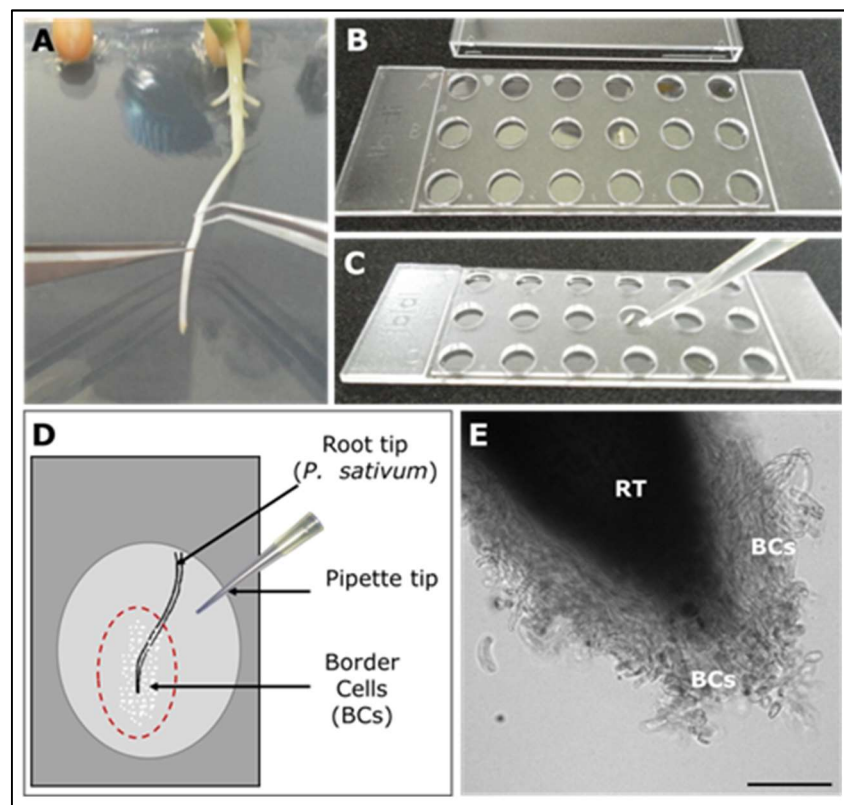


**Fig. 2.** Technical dissection and preparation of *A. thaliana* root tips for optimal BLCs preservation during immunofluorescence labeling. (A) Root tip is cut with a scalpel and collected softly with tweezers. (B) Root tip is placed in the center of the well and (C) 20  $\mu$ L of PFA are gently added (30-40min fixation). (D) PFA is very gently and slowly removed from the well using a pipette to avoid disruption of BLCs. (E) An image of a collected *A. thaliana* root tip and associated BLCs.

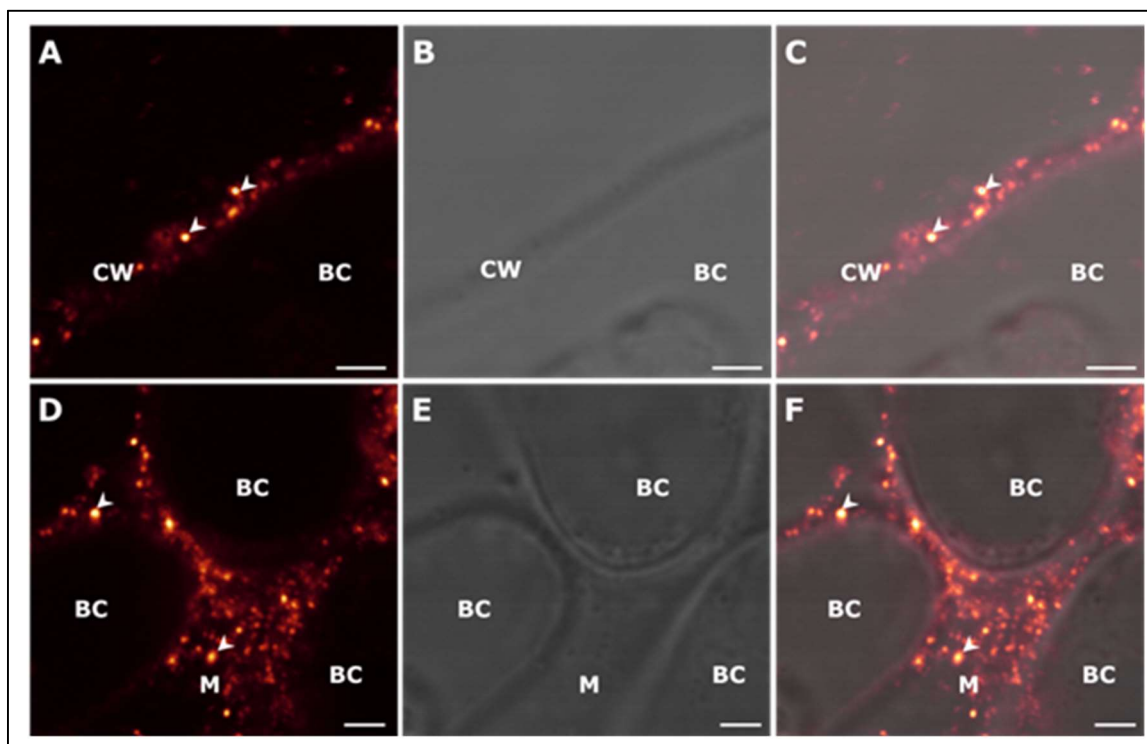
BLCs : Border-Like Cells ; RT : Root tip. Scale bar in E = 50  $\mu$ m.



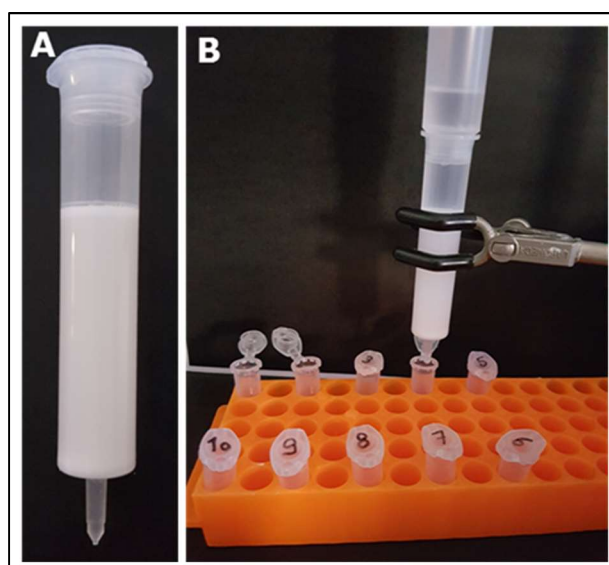
**Fig. 3.** Immunostaining of epitopes associated with AGPs on root tip and BLCs of *Arabidopsis thaliana* using the monoclonal antibody JIM13. **A, B** and **C**: Immunofluorescence images. Observations are made with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP2 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 488 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 500 – 535 nm). **(A)** Maximum intensity Z-projection of several focal planes taken in fluorescence. **(B)** Bright-field microscopy. **(C)** Overlay reconstruction. Note that labeling with JIM13 is associated with the root cap and BLCs. BLCs : Border-like cells ; RT : Root tip ; Scale bars = 100  $\mu\text{m}$



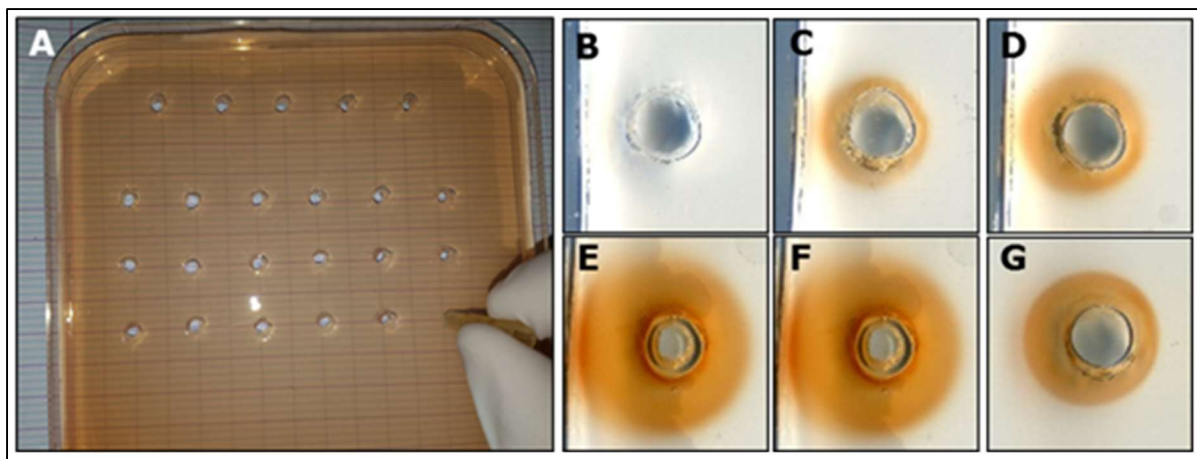
**Fig. 4.** Technical dissection and preparation of *Pisum sativum* root tip for optimal BCs preservation during immunofluorescence labeling. **(A)** Root tip is cut and collected with two tweezers. **(B)** Root tip is placed in the center of the well and **(C)** 20  $\mu\text{L}$  of PFA are gently added. **(D)** PFA is very gently and slowly removed from the well using a pipette to avoid disruption of BCs. **(E)** An image of a collected *P. sativum* root tip and associated BCs. BCs : Border Cells ; RT : Root tip. Scale bar in E = 200  $\mu\text{m}$ .



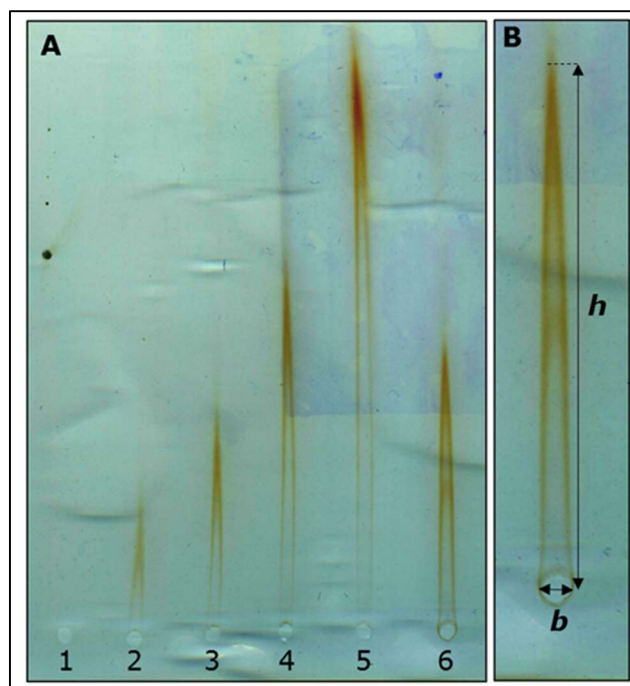
**Fig. 5.** Immunostaining of AGP epitopes at the surface of BCs and mucilage of *Pisum sativum* with the monoclonal antibody JIM13. A punctate staining (arrowheads) is observed (A-C) over the cell wall of BCs and (D-F) over the mucilage surrounding BCs. A, B, C, D, E and F: Immunofluorescence images. Observation are made with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP5 ( $\lambda_{\text{excitation}}$  : 550 nm;  $\lambda_{\text{emission}}$  : 560 – 600 nm). (A, D) Fluorescence. (B, E) Bright-field microscopy. (C, F) Overlay reconstitution. BC : Border cell ; CW : Cell wall ; M : Mucilage ; Scale bars = 2.5  $\mu\text{m}$ .



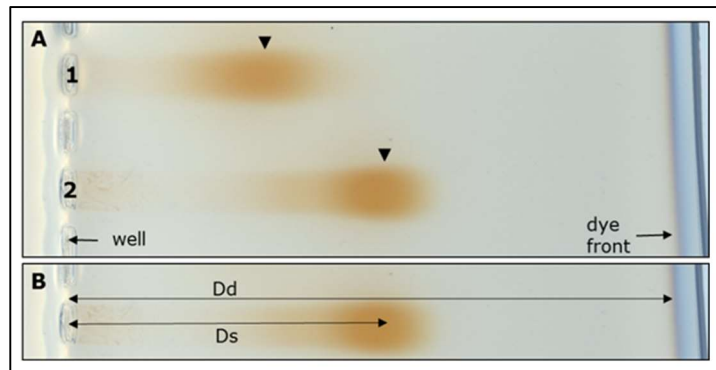
**Fig. 6.** (A) PD-10 column. (B) Desalting the AGPs solution using a PD-10 column and recovering the eluted solution in a set of 10 Eppendorf tubes 1.5 mL.



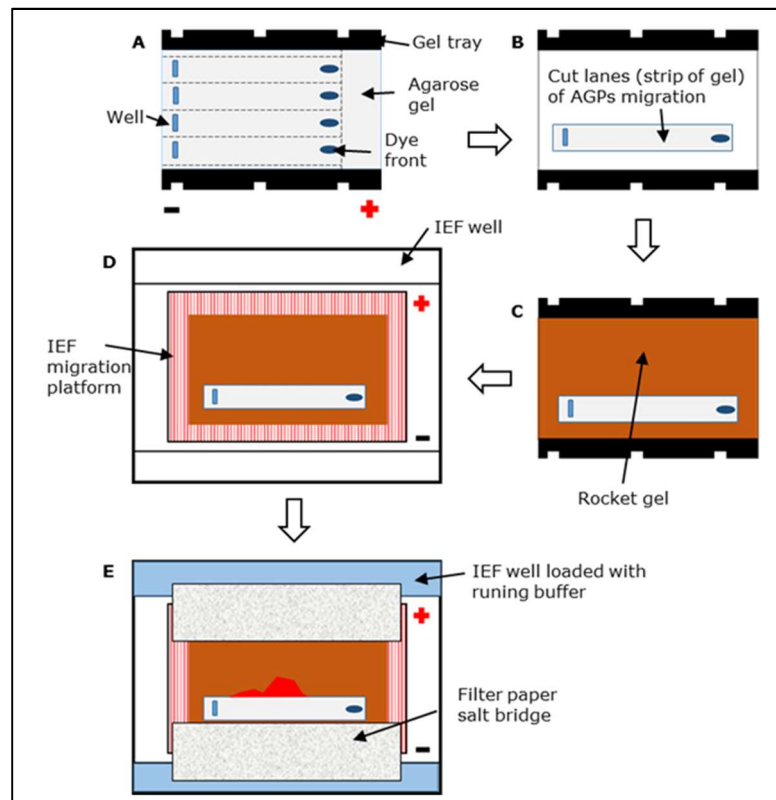
**Fig. 7.** Radial gel diffusion assay. (A) Cutting wells into the gel. (B) 40  $\mu\text{L}$  loading of 1% (w/v) NaCl. (C, D, E and F) 40  $\mu\text{L}$  loadings of 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL and 1 mg/mL of gum Arabic. (G) 40  $\mu\text{L}$  loading of AGP-containing samples.



**Fig. 8.** (A) Rocket gel electrophoresis. (1) 7  $\mu\text{L}$  loading of 1% (w/v) NaCl. (2, 3, 4 and 5) 7  $\mu\text{L}$  loadings of 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL and 1 mg/mL of gum Arabic. (6) 7  $\mu\text{L}$  loading of AGP-containing samples. (B) Peak area measurement ( $h$ ,  $b$ , height and base of the peak).



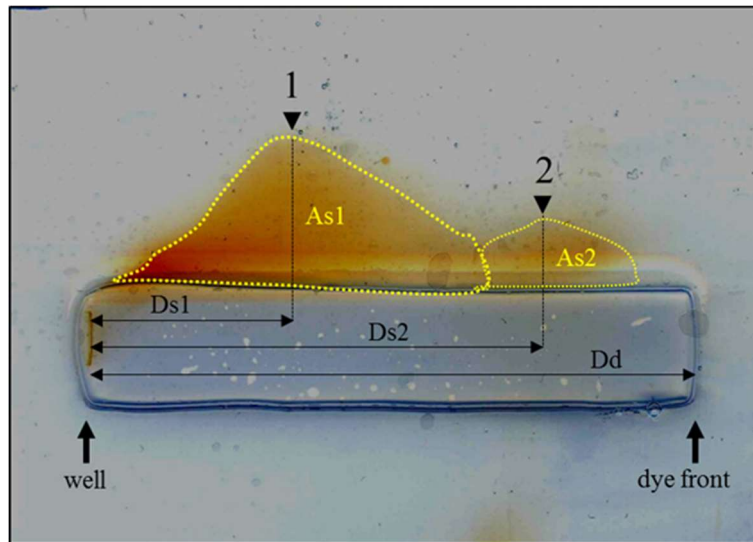
**Fig. 9.** (A) Agarose gel. Linear arabinogalactan proteins profiles revealed by agarose gel electrophoresis followed by staining with  $\beta$ -D-GlcY. The two samples (1 and 2) present different AGP sub-populations indicated by black arrows with different  $R_f$  values. (B) Measurement of the migration distance of the sample and the dye front to calculate the retention factor :  $R_f = D_s/D_d$ .



**Fig. 10.** Technical steps for 2D electrophoresis. (A) AGP samples are loaded on an agarose gel and left to migrate across the gel. (B) The AGP migration lane (strip of gel) is cut and placed in a gel tray (cut strips are indicated by dashed lines in A). (C) A rocket electrophoresis gel (containing  $\beta$ -D-GlcY) is poured into the gel tray, around the cut strip. (D) After polymerization, the gel is transferred into the IEF migration platform. (E) Load the IEF wells with running buffer 1, install the salt bridges and run the IEF electrophoresis. Red-colored precipitation areas are formed (binding of AGPs to  $\beta$ -D-GlcY).

+ and - : electrodes





**Fig. 11.** Cross electrophoresis. Two dimensions profile of arabinogalactan proteins as revealed by cross electrophoresis. Two different sub-populations of AGPs (1 and 2) are indicated by black arrows.

Ds : migration distance of the sample; Dd: migration distance of the dye front.

The surface area of each sub-population is indicated by the yellow dashed line (As1 and As2).





## Annexe 2: Manuel d'utilisation d'ImageJ, GIMP et autres logiciels de traitement d'image

### UTILISATION D'IMAGEJ, GIMP et autres ...



#### TUTORIEL Traitement de photos

Par Julie Despres ([despres.julie@hotmail.fr](mailto:despres.julie@hotmail.fr))  
et Romain Castilleux ([romain.castilleux@gmail.com](mailto:romain.castilleux@gmail.com))





# UTILISATION D'IMAGEJ, GIMP et autres ...



## TUTORIEL Traitement de photos

Par Julie Despres ([despres.julie@hotmail.fr](mailto:despres.julie@hotmail.fr))

et Romain Castilleux ([romain.castilleux@gmail.com](mailto:romain.castilleux@gmail.com))



# UTILISATION D'IMAGEJ, GIMP et autres ...

## TRAITEMENT DE PHOTOS

Aujourd'hui est une belle journée ! Ma manip a marché et j'ai eu de super photos au microscope !! YAY !!  
Passée cette joie immense, je descends (juste un peu) de mon nuage et je me remémore des bruits entendus dans les couloirs :

« Ca fait 3 jours que je fais du traitement d'image avec ImageJ : je rêve de tubes polliniques la nuit ! »  
[Ferdousse]

« Hey ! tu veux voir ma reconstruction 3D de racine en couleur glow que j'ai faite avec ImageJ? ça fait trop bien !! » [Marc]

« J'ai 300 noyaux de cellules à compter, ça va prendre 1000 ans... Romaaaaaaain, t'as pas une macro ImageJ pour ça ? » [Julie]

« Super mes résultats de MALDI me donnent la même chose que ceux donnés par ImageJ » [Gaëtan]  
Parfois enthousiastes, parfois abattus, mes collègues n'ont que ce mot à la bouche « ImageJ ! » et je commence à me demander si le gros travail sur les images ne va finalement pas être APRES avoir pris ma photo au microscope...

Voyons voir ce qu'il y a dans ce manuel, trouvé sur la liste de diffusion de GlycoMEV.

Ce tutoriel a été élaboré avec l'intention de réduire le temps (si précieux) que l'on peut passer à chercher comment analyser des images. Bien évidemment si vous pensez à d'autres astuces, vous êtes les bienvenus pour contribuer à l'amélioration de ce document. Go ahead kids !

## Contenu

<b>AVEC QUOI FAIRE CETTE FAMEUSE ANALYSE D'IMAGE ?</b> .....	3
Comment qu'on ouvre les images ? .....	3
<b>J'AI UNE IMAGE ! 😊 OUI MAIS... QU'EST-CE QUE J'EN FAIS ? JE VEUX POUVOIR EN DISCUTER AVEC MES COLLEGUES SCIENTIFIQUES</b> .....	4
Je dois absolument mettre une échelle ! .....	4
Super photo mais je pourrais l'améliorer avant de leur montrer .....	9
Ajuster l'intensité du signal (luminosité / contraste) .....	9
Ca ne serait pas plus joli en rouge ? .....	10
<b>J'AI PLUSIEURS IMAGES ! COMMENT LES ASSEMBLER ?</b> .....	11
Il faudrait que j'arrive à superposer ces 2 images... (overlay) .....	11
Il faudrait que j'arrive à superposer ces 56 images ! (stack) .....	13
Il faudrait que je reconstitue mon image... ..	14
En fait, il n'y a qu'une partie de l'image qui m'intéresse .....	16
<b>EN 3D, ÇA SERAIT SUPER SYMPA A MONTRER A MES CHEFS !</b> .....	17
... ou une vidéo avec mes images prises à différents temps, encore mieux ! .....	18
<b>ALLEZ, JE M'AUTORISE A REVER ! IMAGINE QUE JE PUISSE PUBLIER CES PHOTOS ! JE DOIS FAIRE UNE PLANCHE PHOTO.</b> .....	20
<b>C'EST BIEN BEAU TOUT ÇA MAIS ÇA MANQUE DE CHIFFRES... QUANTIFICATION ET MESURES</b> .....	23
Je ne pourrais pas utiliser ces images pour « quantifier » mon marquage ? .....	23
Maintenant je dois mesurer les éléments de mon image... ..	24
Et même compter les éléments de mon image... ..	25
<b>FINALEMENT IL Y A PLEIN DE CHOSES A FAIRE AVEC IMAGEJ ! JE PEUX MEME QUANTIFIER LES BANDES DE MON GEL !</b> .....	30
<b>ET LES MACROS C'EST DU POULET ?</b> .....	32
<b>BO-BO-BO-BONUS DU MANUEL</b> .....	33
Description des macros proposées .....	33
Amélioration de l'image par l'application d'un filtre .....	36
L'imagerie en théorie .....	39



## AVEC QUOI FAIRE CETTE FAMEUSE ANALYSE D'IMAGE ?

- ImageJ, ses versions, ses plug-ins
- FIJI (Fiji Is Just ImageJ) la version d'ImageJ contenant déjà la plupart des plug-ins et se mettant automatique à jour
- Logiciel LAS.AF.Lite
- Logiciel Gimp

Suivant l'appareil utilisé, plusieurs types de fichiers peuvent être obtenus:

- Les fichiers « tif » ou « jpg » correspondant à chacune des images.
- Les fichiers « lei » regroupant l'ensemble des acquisitions réalisées lors d'une session au confocal sp2. Les fichiers « lei » sont toujours associés à un fichier « txt » répertoriant toutes les informations sur les différents paramètres utilisés pour chacune des acquisitions (longueurs d'onde, gain, offset, objectif, zoom... etc).
- Les fichiers « lif » regroupant l'ensemble des acquisitions réalisées lors d'une session au confocal sp5 et sp8. Ces fichiers contiennent également toutes les informations sur les différents paramètres utilisés pour chacune des acquisitions (longueurs d'onde, gain, offset, objectif, zoom... etc).

Tous ces fichiers peuvent être ouverts avec ImageJ. Les fichiers « lif » et « lei » nécessitent pour cela d'avoir le plugin « Bio-Formats » installé. Ce plugin est inclus dans Fiji et dans la version d'ImageJ proposée par PRIMACEN.

### Comment qu'on ouvre les images ?

Télécharger ImageJ à partir du site internet :

<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>

(Attention si la version que vous téléchargez est plus récente que ce manuel, il se peut qu'il y ait de nouvelles fonctionnalités non présentées ici).

Il est possible d'ouvrir les fichiers images en allant dans File, Open ou en glissant-déposant ces fichiers sur la fenêtre d'ImageJ.

Les fichiers « lei » et « lif » peuvent être ouverts de la même façon. Dans ce cas-là, une fenêtre s'ouvre permettant de sélectionner les acquisitions à ouvrir. Différentes options peuvent être cochées telles que « Split channels » pour séparer les images prises en lumière transmise de celles prises en « fluo » et « Autoscale » pour que les images soient automatiquement mises à l'échelle.

J'AI UNE IMAGE ! 😊 OUI MAIS... QU'EST-CE QUE J'EN FAIS ? JE VEUX POUVOIR EN DISCUTER AVEC MES COLLEGUES SCIENTIFIQUES

### Je dois absolument mettre une échelle !

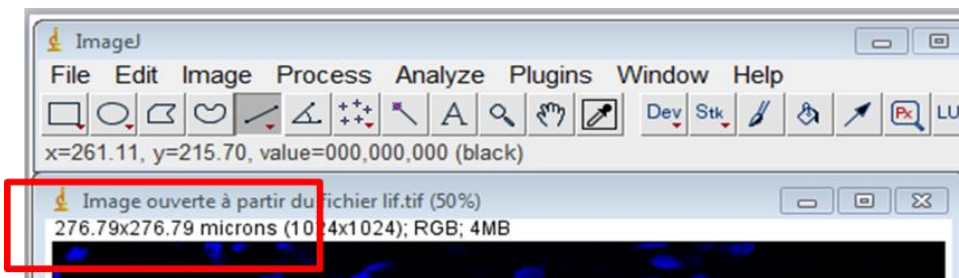
#### Insertion de l'échelle avec Image J, calibration d'image et détermination de l'échelle

Plusieurs cas se présentent :

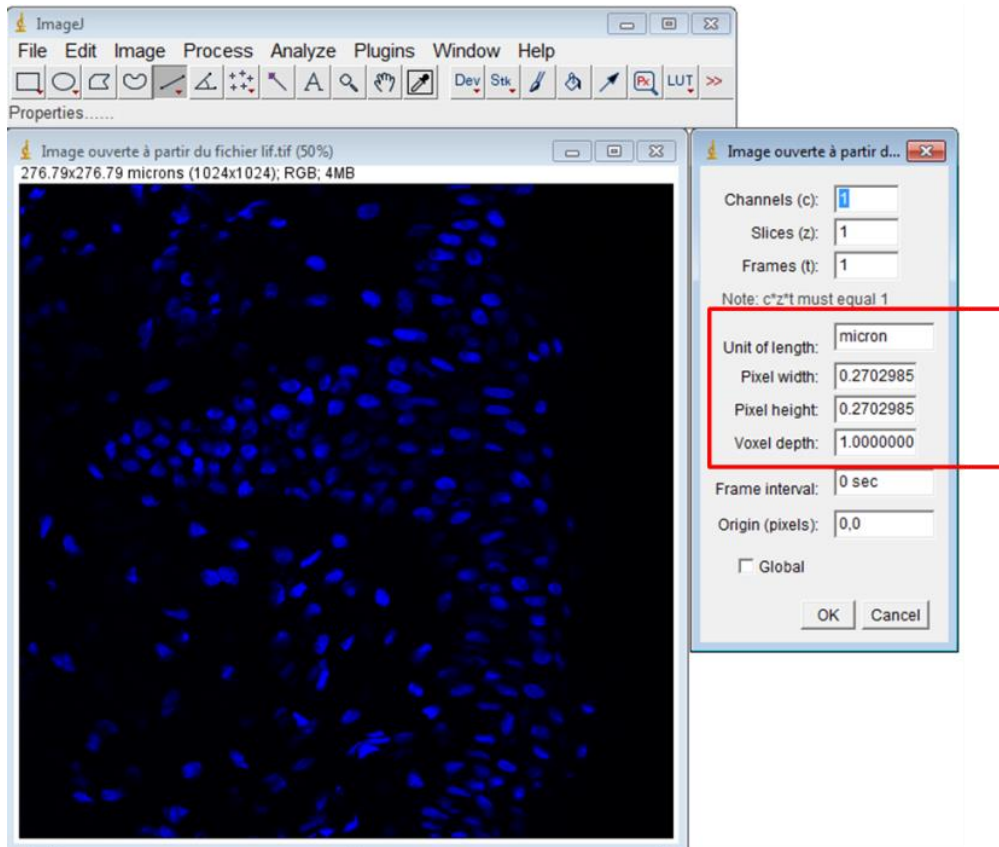
**Cas n° 1 : je dispose de l'image au format .lei ou .lif : l'image est déjà « calibrée » (lorsque les fichiers ouverts dans ImageJ ont les extensions .lei ou .lif).**

Comment savoir si l'image est calibrée ?

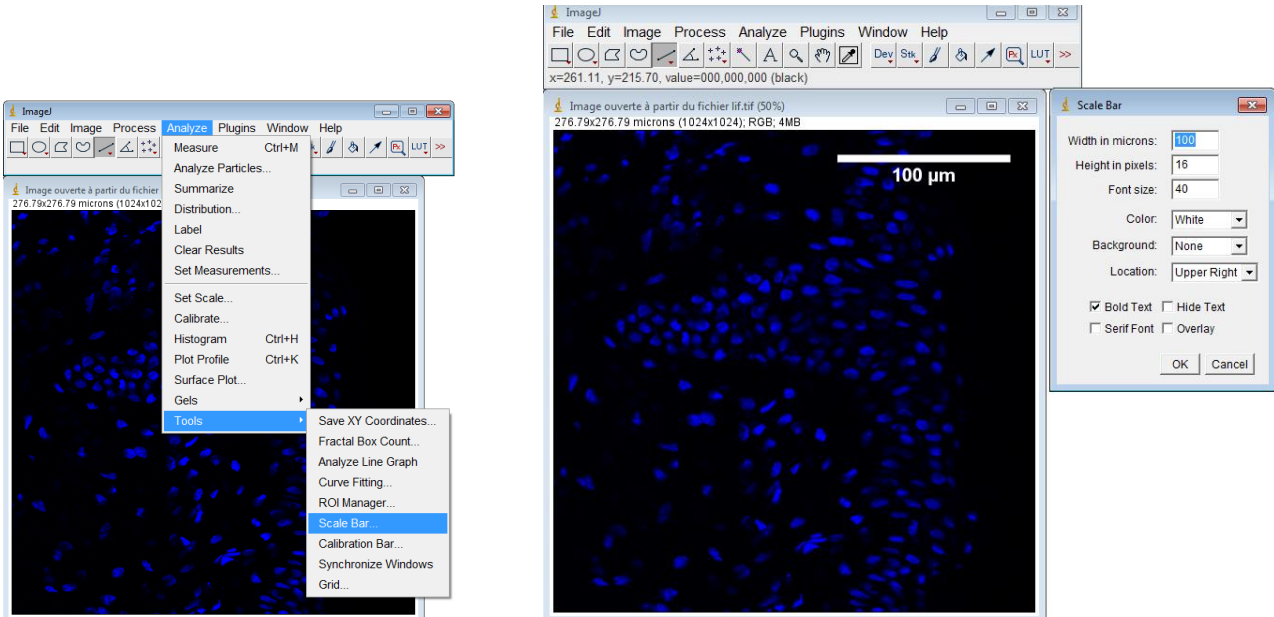
- Indice n°1, le format de l'image est en microns (valeur entre parenthèse en pixels)



- Indice n° 2 : Dans l'onglet image → properties, les unités sont en microns et les tailles de pixel sont fournies



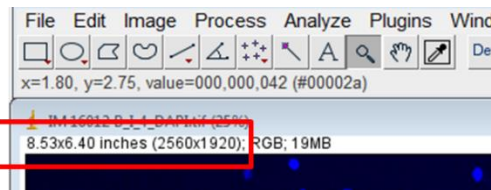
Il ne reste plus qu'à afficher l'échelle



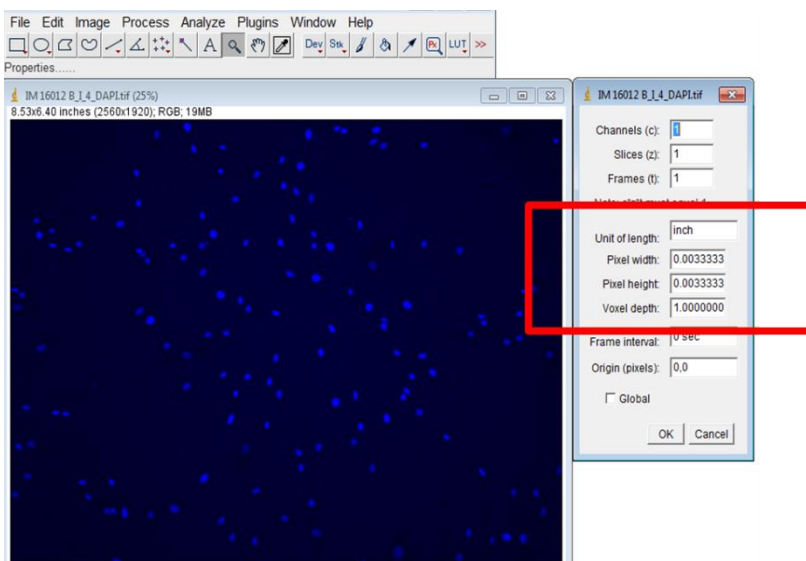
et choisir, la taille de l'échelle (font size), la couleur, la localisation sur l'image.  
(en cas de problème de couleur d'échelle, aller dans l'onglet Image → type → RGB et refaire l'opération)

**Cas n° 2 : l'image est dans un format autre que .lif ou .lei mais j'ai accès au microscope avec lequel j'ai pris l'image (ouf !) : l'image n'est pas calibrée**

- Indice n°1, le format de l'image est en « inches » (valeur entre parenthèse en pixels)



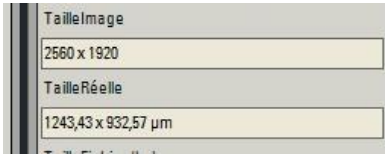
- Indice n° 2 : Dans l'onglet image → properties, les unités sont en « inch » et les tailles de pixel ont une valeur « par défaut »



Que faire... ?

Aller sur le microscope qui a permis de faire cette image et récupérer la valeur de la taille réelle de l'image.

Dans le logiciel LAS (Leica Application Suite), aller dans l'onglet « Parcourir » et cliquer sur votre image. Les données de l'image sont alors affichées avec notamment la taille de l'image (en pixels) et la taille réelle (généralement en  $\mu\text{m}$ ).



Voici les échelles pour chacun des microscopes du laboratoire :

Objectif (Stéréomicroscope Leica M125, Caméra DFC 295)	Taille image (pixels)	Taille réelle (mm)
Obj 1x, zoom 1x	2048 X 1536	10,42 X 7,81
Obj 1,6x, zoom 1x	2048 X 1536	6,51 X 4,88

Objectif (Epifluo droit, Leica DMLB, caméra DFC 300FX)	Taille image (pixels)	Taille réelle ( $\mu\text{m}$ )
5X	1392 x 1040	1795,68 x 1341,60
10X	1392 x 1040	897,84 x 670,80
20X	1392 x 1040	448,92 X 335,40
40X	1392 x 1040	224,46 x 167,70

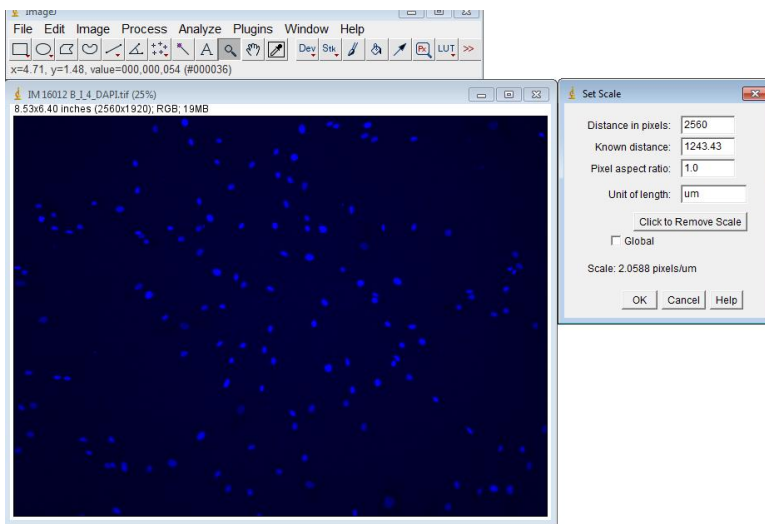
  

Objectif (Epifluo inversé Leica DMI 6000B, caméra DFC 600C)	Taille image (pixels)	Taille réelle ( $\mu\text{m}$ )
10X	2560 X 1920	1243,43 X 932,57
20X	2560 X 1920	621,73 X 466,28
40X	2560 X 1920	310,86 X 233,14

**ATTENTION :** Ces échelles seront différentes si le format de compression d'image est modifié ou si un zoom est effectué.

**Note :** Deux objectifs sont disponibles pour le stéréomicroscope (1x et 1,6x) ainsi que 12 zooms possibles avec la molette de l'appareil (de 0,8x à 10x).

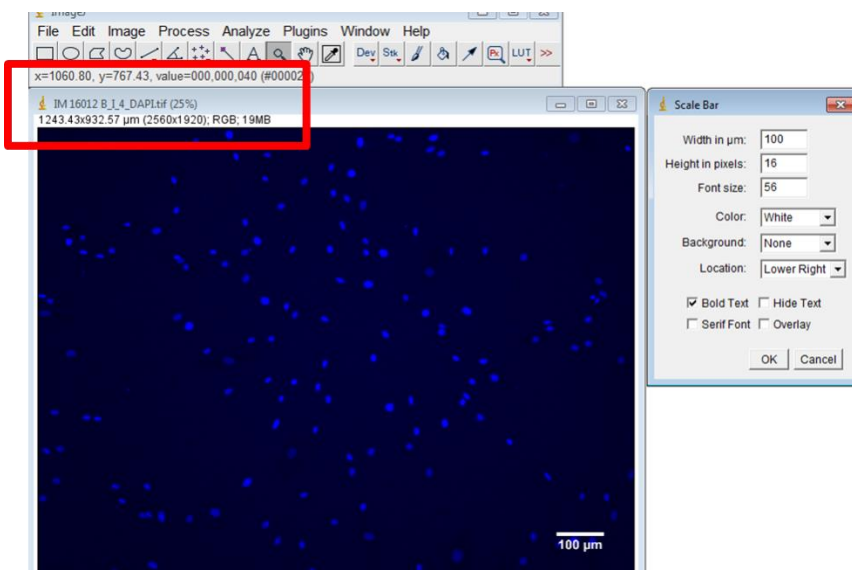
Lorsque les valeurs d'échelle sont récupérées, retourner sur ImageJ et aller dans l'onglet « Analyze » → set scale



### Commentaires :

- la calibration dépend du microscope utilisé
- la calibration est différente si un zoom a été fait lors de l'acquisition
- la calibration dépend du format d'acquisition des images
- dans ImageJ mettre des points au lieu des virgules
- dans ImageJ, il peut être préférable de mettre l'unité de longueur en « um » et non en «  $\mu\text{m}$  » afin d'éviter les caractères spéciaux susceptibles de gêner le logiciel.

Puis, pour afficher l'échelle, onglet « Analyze » → tools → scale bar

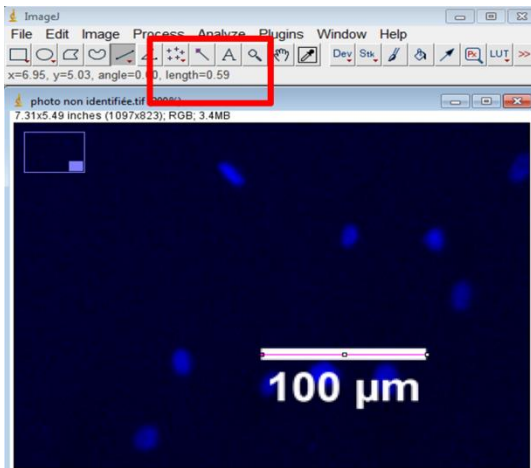


**Cas n° 3 : l'image est dans un format autre que .lif ou .lei et je n'ai pas accès au microscope avec lequel j'ai pris l'image, ni aux métadonnées de l'image... aïe !**

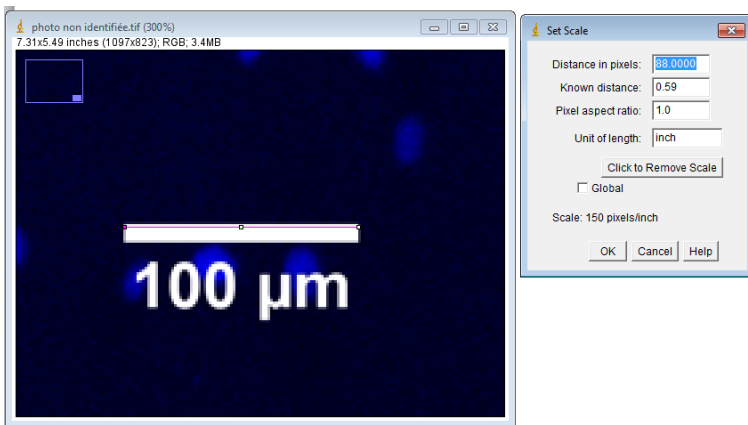
Que faire... ?

Chercher un élément sur l'image dont on connaît la taille (ou si l'image contient une échelle mais qui ne nous plaît pas).

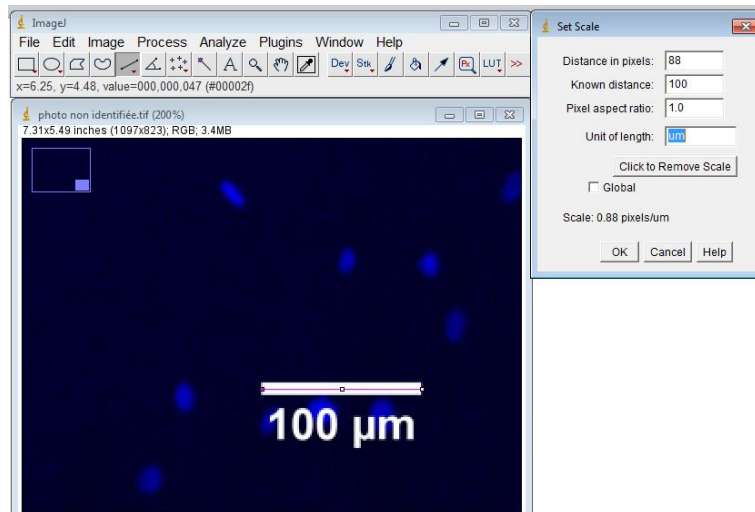
Avec l'icône du « trait » tracer un trait sur l'élément et noter la valeur de la distance en pixel.



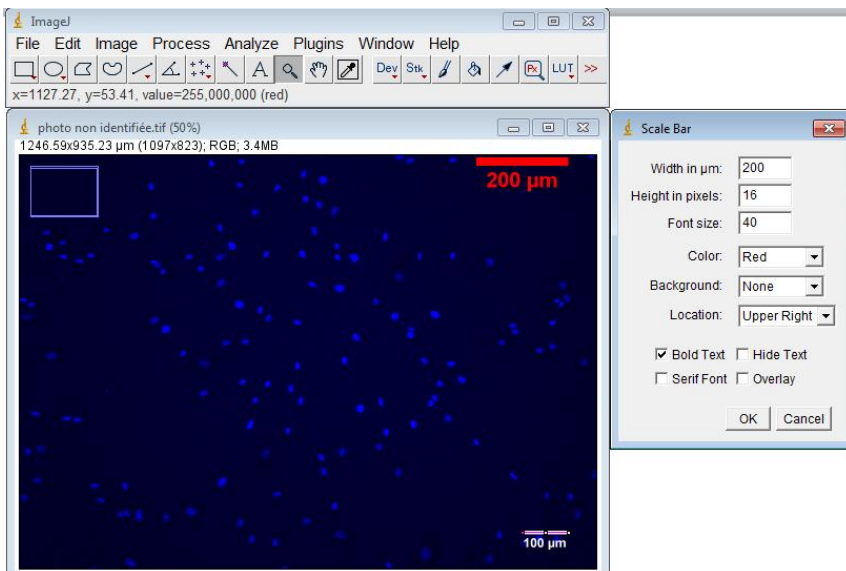
Puis dans « Analyze » → tools → set scale, ImageJ a fait correspondre la distance du trait en pixels (0,59 inch = 88 pixels)



Il faut alors entrer la valeur de l'échelle, dans cet exemple : 100, dans « known distance » et l'unité : um.



L'image est alors calibrée et il est possible de mettre une échelle en cliquant dans l'onglet « Analyze » → tools → scale bar



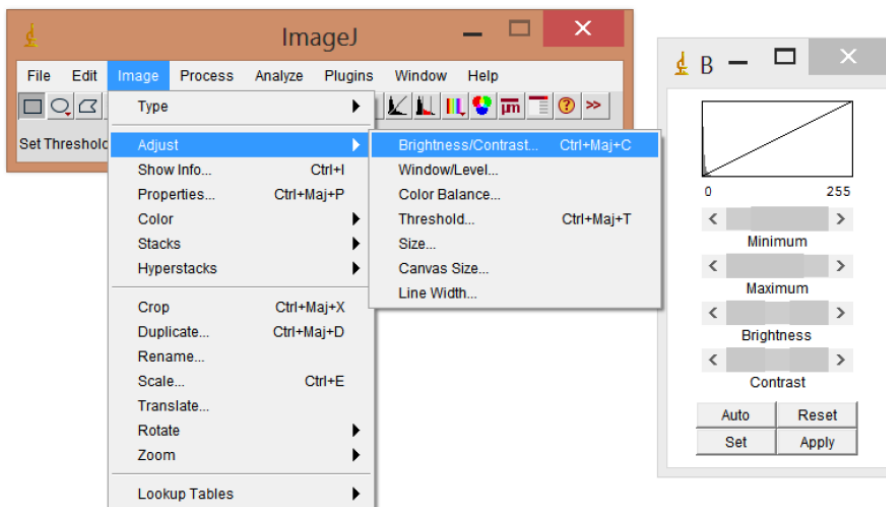
**Remarque :** Une macro peut être utilisée pour insérer une échelle sur plusieurs images à la fois sans refaire 50 fois la même chose (voir p32 et p33).

Super photo mais je pourrais l'améliorer avant de leur montrer...

**Ajuster l'intensité du signal (luminosité / contraste)**

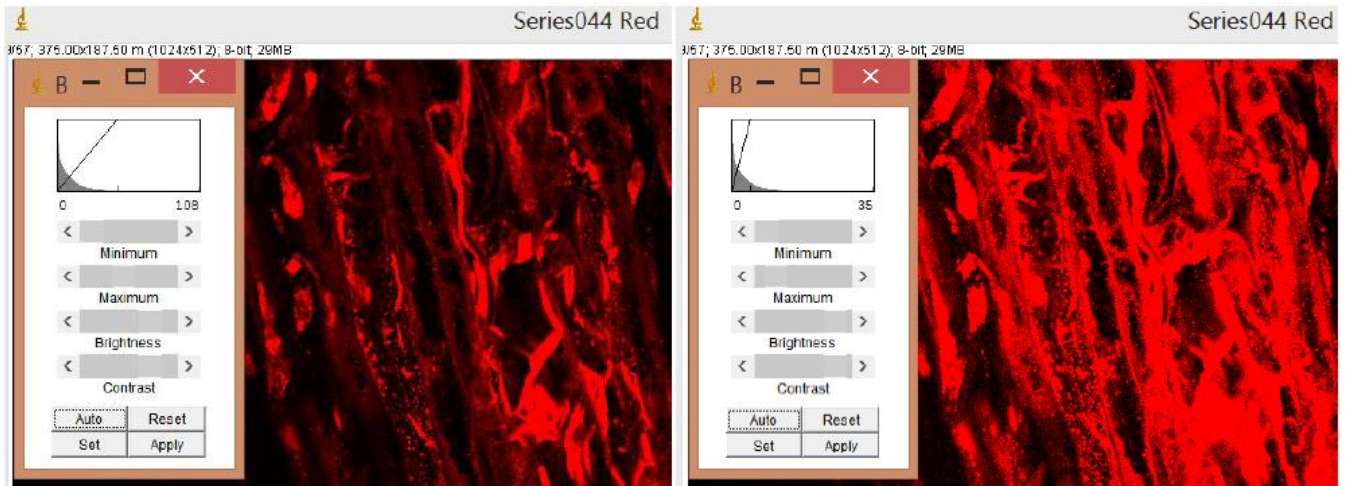
*D'après le tutoriel de Maxime Gotte réalisé pour le laboratoire en 2014.*

Aller dans Image, Adjust, Brightness/Contrast



Utiliser le curseur « Maximum ». Ceci change la pente de la courbe sans quitter le 0, ce qui a pour effet de ne pas dénaturer le signal et de ne pas perdre d'informations. Attention toutefois à ne pas placer le "Maximum" sous le niveau max du signal.

**Exemple :**



Ici le maximum de la courbe reste hors du signal  
= image non saturée



Ici le maximum est sous le niveau max du signal  
= saturation du signal

**Remarque :** la modification du contraste est à proscrire (sauf cas particuliers) ! Elle peut entraîner des modifications de vos résultats remettant en cause leur validité scientifique.

**Ce ne serait pas plus joli en rouge ?**

*Adapté du tutoriel écrit par Maxime Gotte pour le laboratoire en 2014.*

En microscopie confocale, les images sont acquises en nuances de gris. La couleur obtenue est donc une fausse couleur et peut être modifiée selon les envies.

Pour cela, allez dans Image, Lookup Tables et choisir la couleur désirée. Cela peut aussi être réalisé en cliquant sur le raccourci  ou .

Certaines colorations telles que le « glow » ou le « fire blue » (mon préféré !) permettent de mieux discerner les différences d'intensité du signal, tandis que d'autres peuvent être plus « visuelles ». Le mieux est d'en tester plusieurs afin de choisir la coloration pertinente (et la plus belle aussi tant qu'à faire).

Un aperçu des différentes colorations est disponible en allant dans Image, Color, Display LUTs.

Comme le disait Maxime dans son tutoriel :

« C'est pourquoi une acquisition réalisée avec un échantillon GFP pourra très bien être illustrée en rose si le cœur vous en dit ! »

Mais on évitera quand même hein ! Ayons un minimum de goût.



## J'AI PLUSIEURS IMAGES ! COMMENT LES ASSEMBLER ?

### Il faudrait que j'arrive à superposer ces 2 images... (overlay)

#### Superposition d'images

Avoir de belles images avec de la fluorescence ne suffit pas toujours pour illustrer parfaitement et précisément ce que l'on observe. Par exemple, si l'on veut montrer la localisation du signal au niveau de notre échantillon, les images prises en lumière transmise seront également importantes. De même, lorsque l'on réalise un marquage multiple on est souvent amené à vouloir comparer la répartition de chacun des signaux pour un même échantillon.

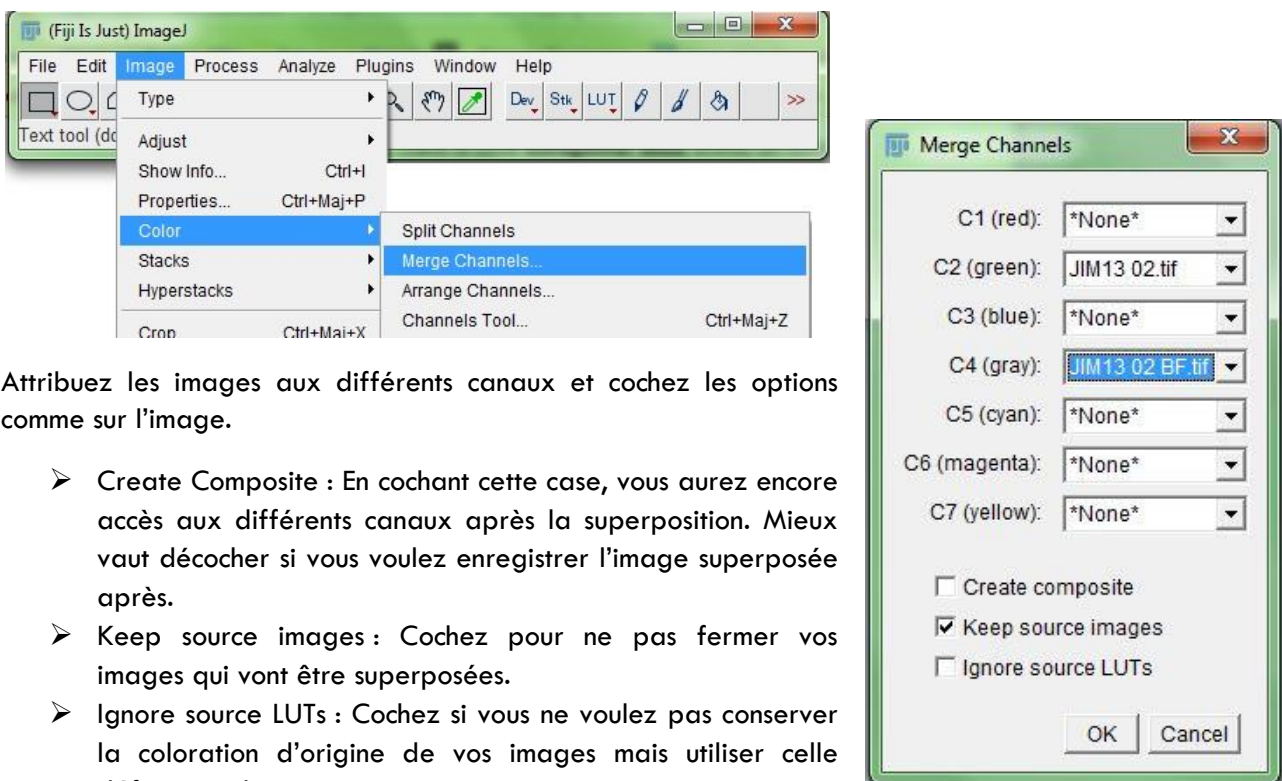
Quoi de mieux dans ces cas-là que de superposer les images pour avoir toute l'information en une seule photo ?

Deux façons de faire sont proposées dans ce tutoriel : avec ImageJ et avec GIMP.

#### Superposer avec ImageJ :

Avec ImageJ, ouvrez les images que vous voulez superposer.

Allez dans Image, Color, Merge Channels



Attribuez les images aux différents canaux et cochez les options comme sur l'image.

- Create Composite : En cochant cette case, vous aurez encore accès aux différents canaux après la superposition. Mieux vaut décocher si vous voulez enregistrer l'image superposée après.
- Keep source images : Cochez pour ne pas fermer vos images qui vont être superposées.
- Ignore source LUTs : Cochez si vous ne voulez pas conserver la coloration d'origine de vos images mais utiliser celle définie par les canaux.

Appuyez sur OK et vous obtenez votre superposition.

**Note :** Cette méthode est particulièrement utile pour faire de la colocalisation.

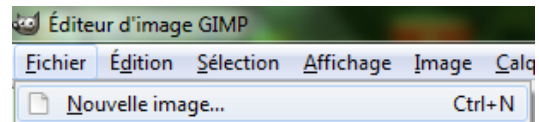
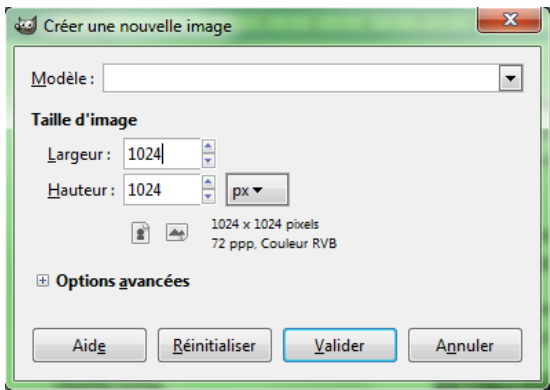
#### Superposer avec GIMP :

Lorsqu'il s'agit de superposer la fluorescence sur une image acquise en lumière transmise, le résultat obtenu avec ImageJ (méthode décrite ci-dessus) n'est pas toujours très satisfaisant. En effet, cette méthode ne permet pas d'ajuster la transparence afin de rendre plus visible une des 2 images à superposer.

Une des solutions peut être d'ajuster l'intensité du signal (voir p9) mais cela peut s'avérer être un peu long quand on veut simplement faire une superposition.

Une autre solution est d'utiliser le logiciel GIMP, un programme gratuit permettant de faire à peu près tout ce qui est possible et imaginable. En résumé, c'est Photoshop mais en gratuit.

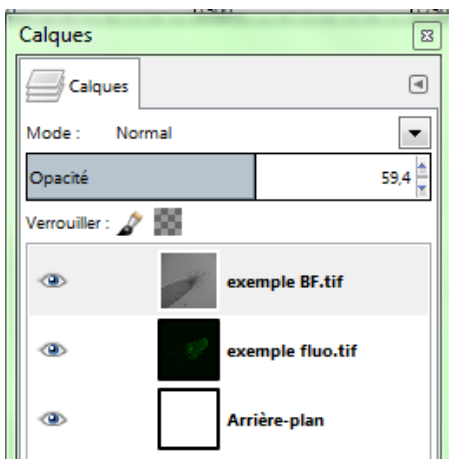
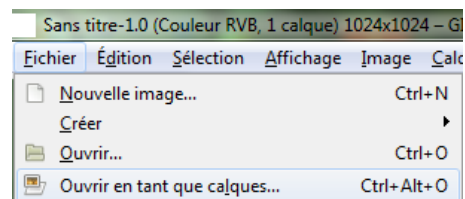
Ouvrez Gimp et allez dans Fichier, Nouvelle Image.



Une fenêtre de dialogue apparaît pour paramétrer la taille de l'image. Entrez la longueur et la largeur exacte des images que vous souhaitez superposer puis validez. Dans l'exemple présenté ici, les images font 1024x1024 pixels.

Maintenant, il vous faut insérer les images que voulez superposer. Pour cela, allez dans Fichier, Ouvrir en tant que calques...

Choisissez vos images et appuyez sur Ouvrir.



Vos images sont maintenant ouvertes sous forme de calques. Dans la fenêtre Calques, vous pouvez voir la liste des images. Sélectionnez l'une d'entre elles, celle en image transmise par exemple, et réglez l'opacité pour réaliser une superposition à votre convenance.

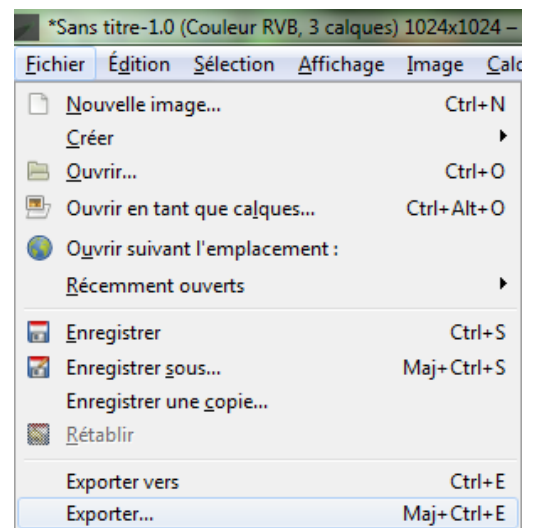
Il ne reste plus maintenant qu'à sauvegarder. Pour cela, attention petites subtilités.

Si vous allez dans Fichier, Enregistrer sous..., vous devrez n'enregistrer que sous le format XCF spécifique de GIMP. Ceci ne permet pas de sauvegarder votre image mais votre projet. Ceci peut s'avérer intéressant si vous souhaitez retravailler votre superposition plus tard sans recommencer à zéro.

Pour enregistrer l'image, allez plutôt dans Fichier, Exporter...

Dans la fenêtre de dialogue qui apparaît, choisissez l'endroit où vous voulez sauvegarder l'image et choisissez le format TIF (soit en ajoutant « .tif » au nom de votre image soit en allant dans « sélectionner le type de fichier »). Appuyez sur Exporter. Le logiciel va alors vous proposer quel type de compression vous souhaitez, choisissez « Aucune » et appuyez sur Exporter.

Vous avez maintenant votre belle superposition enregistrée.



## Il faudrait que j'arrive à superposer ces 56 images ! (stack)

### Transformer en une seule image : projection en Z

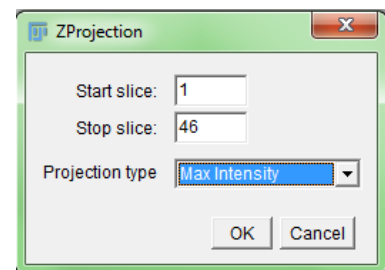
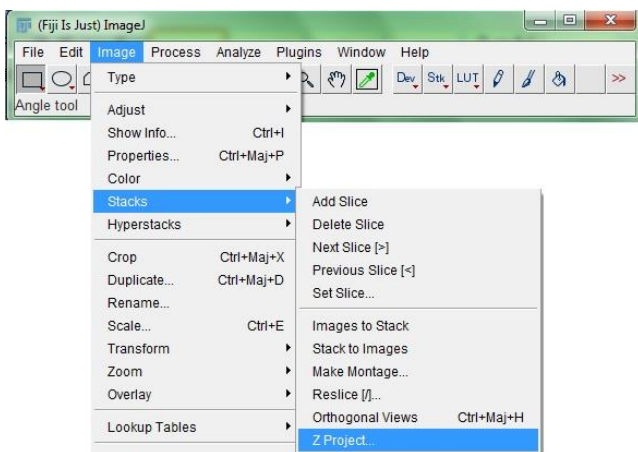
Il arrive souvent que l'on prenne plusieurs images à différents plans focaux et que l'on réalise ainsi un stack. Ceci est très utile car suivant le plan focal on n'obtient pas la même information. Le problème c'est que l'on se retrouve rapidement avec plein d'images sans toujours savoir comment les exploiter au mieux. Se pose ainsi la question : Comment faire pour en tirer de manière simple et visuelle le maximum d'informations ?

Une des possibilités est de réaliser une reconstitution en 3D. Pour cela, le mieux est d'utiliser le logiciel Imaris sur la plateforme PRIMACEN (nécessite d'avoir la formation avant utilisation). Cela peut également se faire sur ImageJ (voir p17). Toutefois, une reconstitution en 3D peut s'avérer un peu fastidieuse et le résultat n'est pas toujours à la hauteur des espérances.

Une méthode plus simple et plus rapide pourrait être ainsi privilégiée avant de se lancer dans la 3D : la projection en Z avec ImageJ. Cet outil va permettre de représenter tous les plans focaux en une seule image.

Avec ImageJ, ouvrez votre stack d'images.

Allez dans Image, Stacks, Z Project...



Une fenêtre de dialogue apparaît. Vous pouvez choisir à partir de quelle image de votre stack vous voulez commencer et finir votre projection.

Plus important, vous pouvez choisir le type de projection : Maximum Intensity, Average Intensity, Minimum Intensity, Sum Slices, Median, Standard Deviation.

Chacune de ces options donnant un résultat sensiblement différent, le mieux est donc d'en tester plusieurs afin de sélectionner ce qui est le plus pertinent pour vos images. Les options Minimum Intensity, Standard Deviation et Median semblent être les moins intéressantes.

Appuyez sur OK et vous aurez réalisé une projection en Z de votre stack.

**Note :** La projection en Z « Sum Slices » peut ne pas prendre en compte le « LUT » d'origine. Il suffit dans ce cas de recolorer l'image obtenue avec le « LUT » qui vous plaît.

**Note 2 :** Si vous voulez comparer plusieurs images issues de projections en Z, le même type de projection doit bien évidemment être choisi.

**Note 3 :** Il est très conseillé de noter dans la légende de vos photos si ce sont des projections en Z et quel de type de projection a été utilisé.

**Note 4 :** Afin de tester rapidement les 3 types de projection en Z (Maximum Intensity, Average Intensity et Sum Slices) sur un stack, une macro est proposée (voir p33).

## Il faudrait que je reconstitue mon image...

### Reconstituer une image avec GIMP

Parfois, l'échantillon à observer est beaucoup trop grand pour l'avoir en intégralité sur une seule photo et avec un bon niveau de détail. Pour remédier à cela, on peut prendre plusieurs photos à différents endroits et associer les images entre elles pour reconstituer l'échantillon en une seule image.

Certains microscopes du laboratoire permettent de faire cela automatiquement même si malheureusement cela ne fonctionne pas toujours.

Cependant, il est possible de le faire manuellement de manière relativement simple grâce au logiciel GIMP.

Dans GIMP, allez dans Fichier, Nouvelle image...

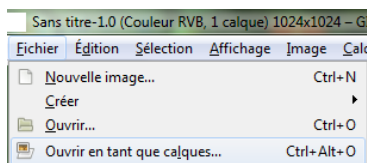
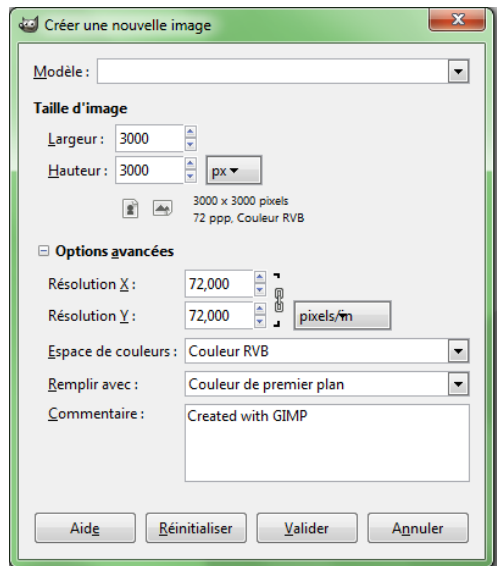
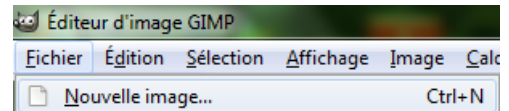
Une fenêtre s'ouvre où vous pourrez régler différents paramètres de l'image.

Définissez une taille d'image assez grande (3000x3000 par exemple) afin de pouvoir travailler confortablement par la suite.

Cliquez sur Options avancées et à la ligne « Remplir avec », choisissez Couleur de premier plan. La couleur de premier plan étant le noir par défaut, vous aurez un fond noir.

Pour un fond blanc, choisissez Blanc (et oui !). Pour une autre couleur, choisissez une autre couleur de premier plan ou d'arrière-plan. Si vous ne voulez pas de fond, choisissez « Transparence ».

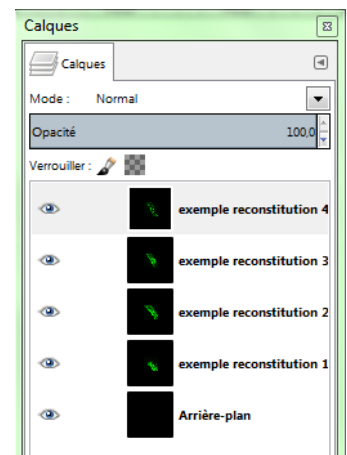
Une fois ces paramètres réglés, appuyer sur Valider et votre image sera créée.




Ouvrez ensuite vos images à reconstituer en allant dans Fichier, Ouvrir en tant que calques...

Choisissez vos images et appuyez sur Ouvrir.

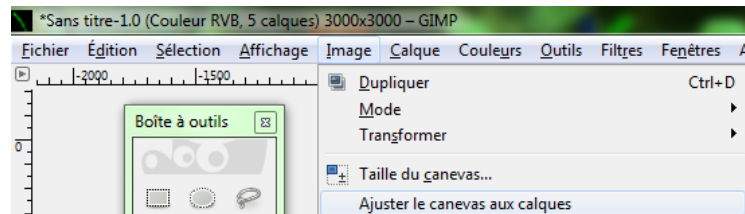
Vos images sont maintenant ouvertes sous forme de calques. Dans la fenêtre Calques, vous pouvez voir la liste des images avec un œil à côté. En cliquant sur cet œil vous pouvez choisir d'afficher ou masquer le calque. N'affichez qu'un seul calque et l'arrière-plan.




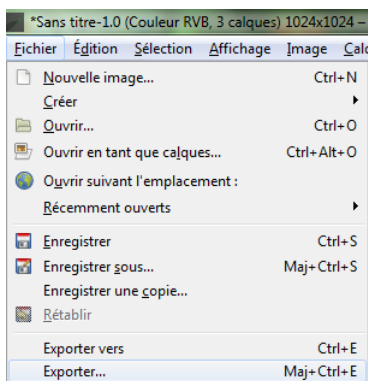
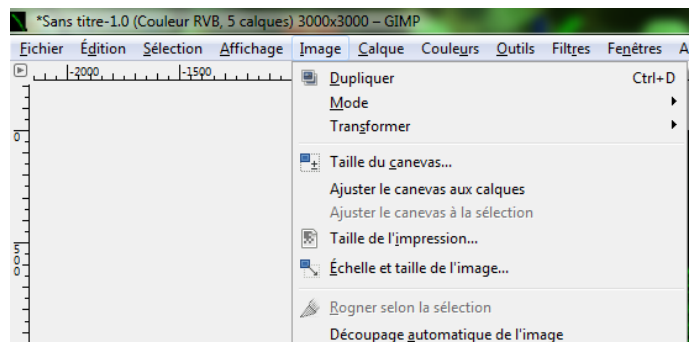
Dans la fenêtre Boîte à outils, cliquez sur  et déplacez ce premier calque où vous le souhaitez.

Affichez maintenant un 2<sup>e</sup> calque et baissez l'opacité. Cela va vous permettre de voir la superposition entre les 2 premiers calques. Déplacez le 2<sup>e</sup> calque afin de superposer les zones communes entre les 2 calques. Lorsque c'est bien superposé, remettez l'opacité à 100% pour le 2<sup>e</sup> calque. Continuez de la même façon avec vos autres calques.

Si vos calques débordent de l'image, allez dans Image, Ajuster le canevas aux calques.



Lorsque votre reconstitution est terminée, quelques finitions seront sûrement nécessaires comme rogner et ajuster la taille de l'image. Pour cela, cliquez d'abord sur « Arrière-plan » dans la fenêtre des calques puis cliquez sur  dans la fenêtre Boîte à outils, ajustez le quadrillage à votre image et appuyez sur « Echelle ». Enfin, allez dans Image, Découpage automatique de l'image.



Vous allez pouvoir maintenant sauvegarder votre travail.


Si vous allez dans Fichier, Enregistrer sous., vous devrez enregistrer sous le format XCF spécifique de GIMP. Ceci ne permet pas de sauvegarder votre image mais votre projet. Ceci peut s'avérer intéressant si vous souhaitez retravailler votre reconstitution plus tard.

Pour enregistrer l'image, allez plutôt dans Fichier, Exporter...

Dans la fenêtre de dialogue qui apparaît, choisissez l'endroit où vous voulez sauvegarder l'image et choisissez le format TIF (soit en ajoutant « .tif » au nom de votre image soit en allant dans « sélectionner le type de fichier »).

Appuyez sur Exporter. Le logiciel va alors vous proposer quel type de compression vous souhaitez, choisissez « Aucune » et appuyez sur Exporter.

Votre reconstitution d'image est maintenant sauvegardée.

**Note :** Vous pouvez zoomer sur l'image soit avec le bouton () en bas à gauche de l'écran, soit en allant dans Affichage, Zoom.

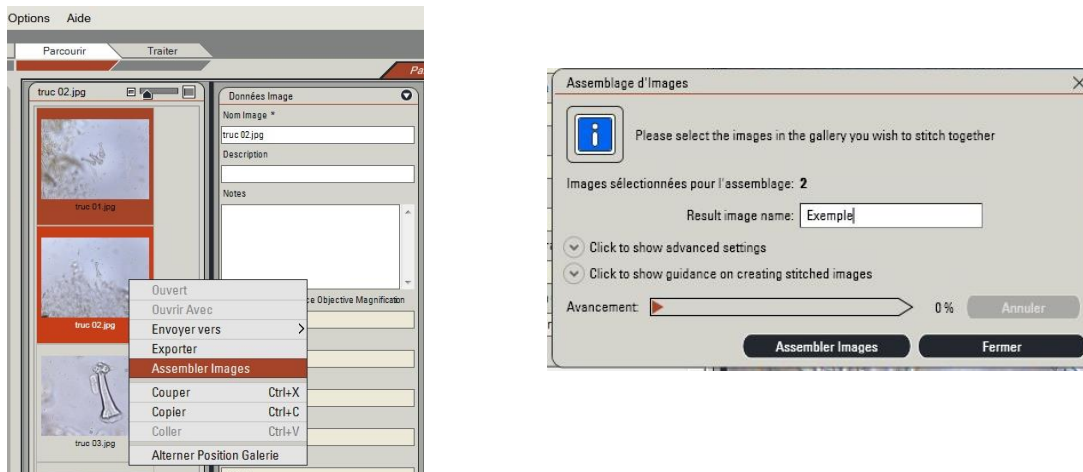
**Note 2 :** Ne jamais modifier la taille de vos calques. JAMAIS. Autrement, plus rien ne sera à l'échelle.

**Note 3 :** Lorsque vous sélectionnez un calque dans la fenêtre Calques, celui-ci se retrouve encadré par un contour en pointillés sur l'image. Ce contour peut être gênant lorsque l'on essaye de reconstituer l'image. Pour le masquer, allez dans Affichage, Afficher les bords du calque.

## Reconstituer une image avec le microscope directement

Les logiciels LAS du stéréomicroscope et de l'épifluo inversé (mais pas de l'épifluo droit) permettent de fusionner automatiquement les photos qui ont au moins 25% de recouvrement.

Pour cela, il suffit d'aller dans l'onglet « Parcourir » du logiciel LAS et de sélectionner les photos à assembler. Faites ensuite un clic droit et sélectionnez « Assembler ». Faites ensuite un clic droit et sélectionnez « Assembler ».



Une fenêtre apparaît dans laquelle vous pouvez donner un nom à l'image qui sera créée et éventuellement modifier différents paramètres. Cliquez enfin sur « Assembler Images » et le logiciel s'occupe de tout.


**Note :** Comme précisé plus haut, il faut absolument qu'il y ait au moins 25% de recouvrement entre les photos pour que l'assemblage fonctionne correctement.

**Note 2 :** L'assemblage ne peut être réalisé que sur des photos prises au même grossissement.

**Note 3 :** D'après la consigne du logiciel, vous pouvez assembler jusqu'à 50 photos en même temps.

## En fait, il n'y a qu'une partie de l'image qui m'intéresse

*D'après le tutoriel écrit par Maxime Gotte pour le laboratoire en 2014.*

Utiliser une de ces icônes  (de gauche à droite : rectangle, ovale, polygone, main levée, trait) afin de sélectionner la zone d'intérêt.

Un clic droit sur la zone sélectionnée ouvre un menu permettant de dupliquer, effacer ou remplir par une couleur la zone d'intérêt.

Pour ne travailler que sur la zone sélectionnée et éliminer ce qu'il y a autour, il suffit d'aller dans Edit, Clear Outside.

A l'inverse, pour éliminer la zone sélectionnée, aller dans Edit, Clear.

## EN 3D, ÇA SERAIT SUPER SYMPA A MONTRER A MES CHEFS !

### Faire une projection 3D avec ImageJ

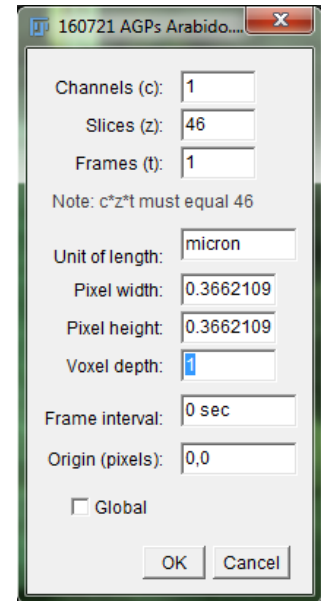
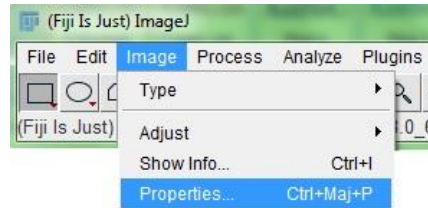
Pour réaliser une projection en 3D d'un stack, le mieux est d'utiliser le logiciel Imaris sur la plateforme PRIMACEN. Ce logiciel est très intuitif et permet de créer de belles projections 3D mais nécessite néanmoins de suivre une petite formation préalable (2 à 3 heures).

Heureusement, il est également possible en quelques clics d'effectuer cette projection 3D avec ImageJ même si le rendu ne sera pas aussi joli qu'avec Imaris.

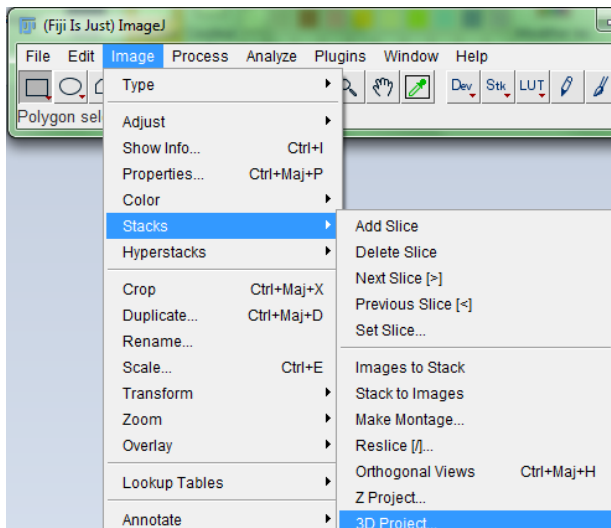
Avec ImageJ, ouvrez votre stack d'images. Si celui-ci n'est pas mis à l'échelle, faites-le (Analyze, Set Scale).

Allez dans Image, Properties...

Dans la fenêtre qui s'ouvre, entrez dans le champ « Voxel depth » la distance entre chacun des plans focaux et appuyer sur OK.



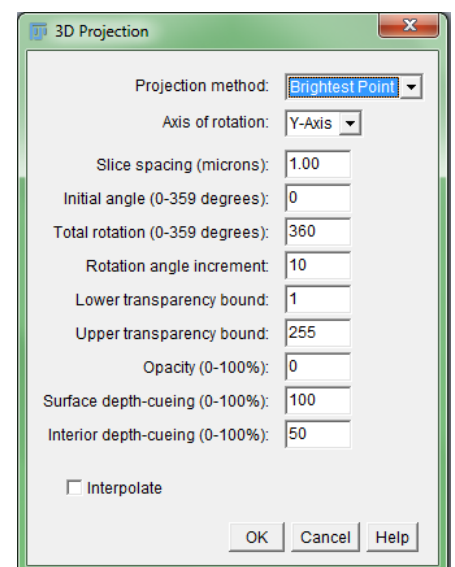
Allez dans Image, Stacks, 3D Project...



Une fenêtre s'ouvre alors dans laquelle vous allez pouvoir régler certains paramètres :

- Projection Method : Brightest Point, Nearest Point, Mean Value. N'hésitez pas à tester chacune de ces méthodes pour choisir celle qui est la plus adaptée.
- Axis of rotation : Choisissez l'axe sur lequel vous allez faire pivoter votre reconstitution. En général, c'est l'axe y.
- Slice spacing : Distance entre chacun des plans focaux. Vérifiez que cela correspond avec celle définie précédemment.

Lorsque vous avez réglé vos paramètres, cliquez sur OK et votre projection 3D sera générée. Vous pouvez faire pivoter votre image à l'aide du bandeau défilant.



## ... ou une vidéo avec mes images prises à différents temps, encore mieux !

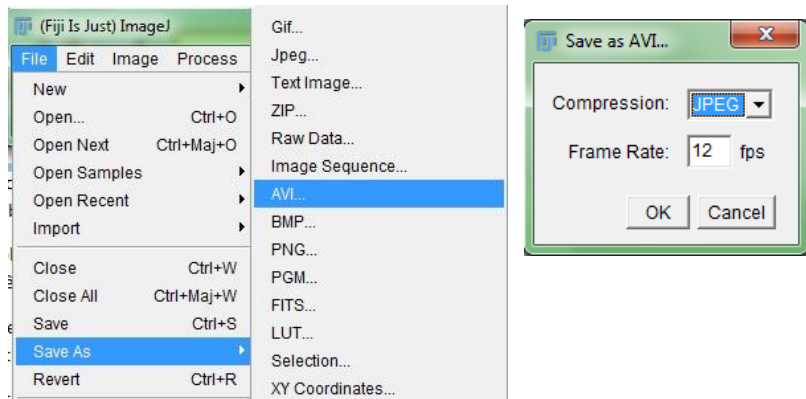
### Faire une vidéo ou une animation gif avec ImageJ

Réaliser une vidéo ou une animation gif peut paraître très compliqué. Mais ce n'est pas le cas. En fait, avec ImageJ c'est relativement simple.

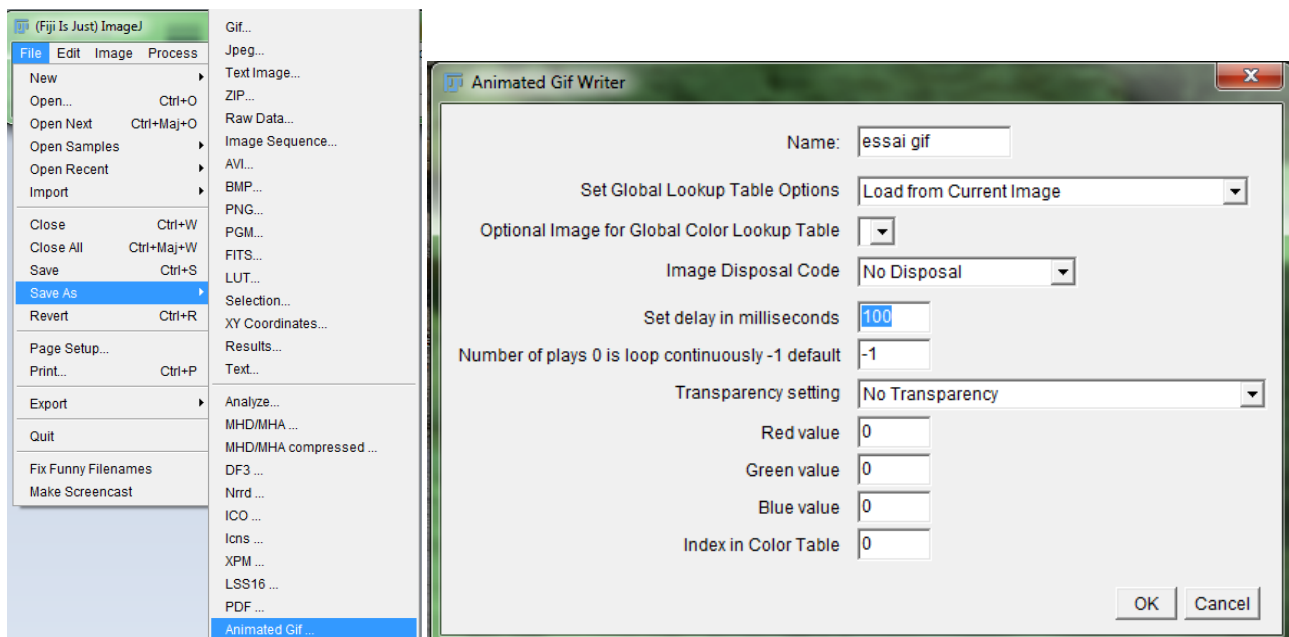
Dans ImageJ, mettez les images qui vont composer votre vidéo/animation sous forme d'un stack.

Pour une vidéo, allez dans File, Save as, AVI...

Une fenêtre s'ouvre vous proposant le type de compression (Aucun, PNG ou JPEG) et la vitesse de lecture en images/seconde. Choisissez ce qu'il vous convient et appuyez sur OK. Indiquez enfin où vous voulez sauvegarder votre film.



Pour une animation Gif, allez dans File, Save as, Animated Gif...



Une fenêtre s'ouvre vous proposant plusieurs options dont voici les plus importantes :

- Name : Nom du fichier
- Set Global Lookup Table Options : Type de coloration pour l'animation. Mettez "Load from Current Image" pour garder les mêmes couleurs que vos images d'origine.
- Set delay in milliseconds : Intervalle de temps entre 2 images définissant ainsi la vitesse de lecture
- Number of loop... : Nombre de répétitions de l'animation. Mettre sur 0 ou -1 pour que l'animation tourne en boucle.

Choisissez les options qui vous conviennent et appuyez sur OK. Indiquez enfin où vous voulez sauvegarder votre fichier gif.



**Note :** Il est possible de réaliser un gif de manière encore plus rapide en allant dans Fichier, Save as, Gif... Aucune option ne vous sera proposée et vous fera donc gagner du temps. Il faut juste espérer que l'animation vous convienne à la fin.

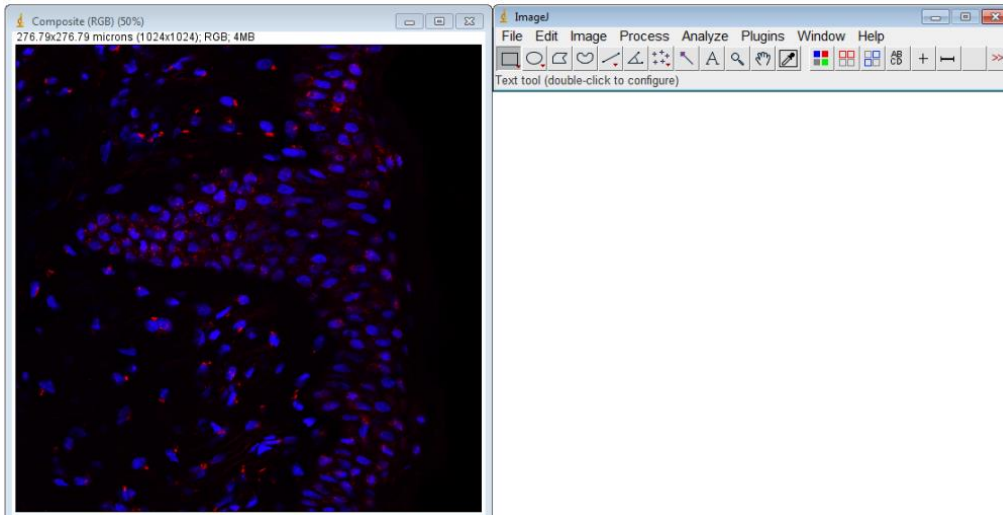
**Note 2 :** Il semble possible de rendre l'arrière-plan transparent pour votre animation gif grâce à l'option « Transparency ». A tester.

**Note 3 :** Réaliser une vidéo ou une animation gif n'est donc pas très long ni compliqué en soit. Ajuster la vitesse de lecture est finalement ce qu'il y a de plus fastidieux.

ALLEZ, JE M'AUTORISE A REVER ! IMAGINE QUE JE PUISSE PUBLIER CES PHOTOS ! JE DOIS FAIRE UNE PLANCHE PHOTO.

Pour cela, on va utiliser la macro « magic montage ». Pour la télécharger, aller sur le site web ImageJ, cliquer sur Plugins puis Tools set puis Tool set folder et enfin Magic Montage. Le fichier .txt obtenu est à placer dans votre dossier où se trouve ImageJ : sous-dossier macros puis toolsets.

Ouvrir une image RGB et cliquer sur  puis sur « Magic montage »

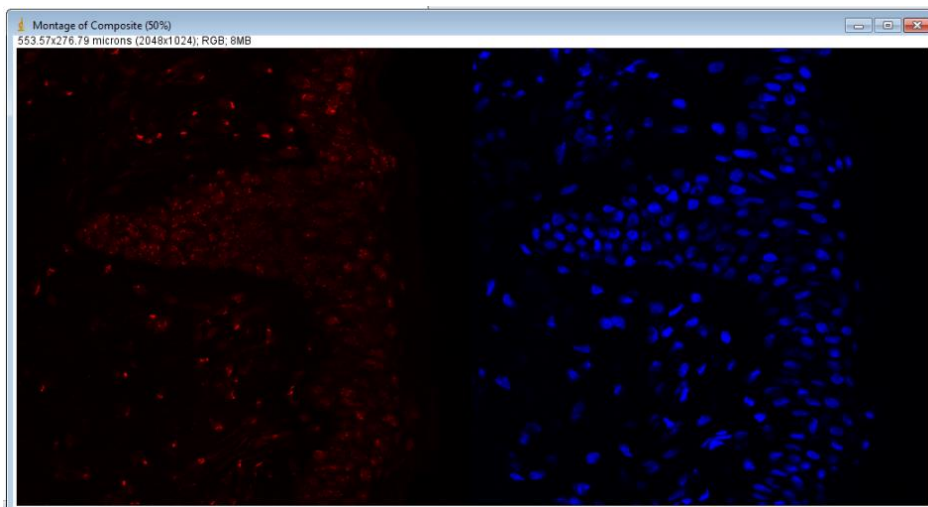


Si l'image n'est pas en RGB :

- Image → color → spit channels
- Image → color → merge channels
- Image → color → stack to RGB

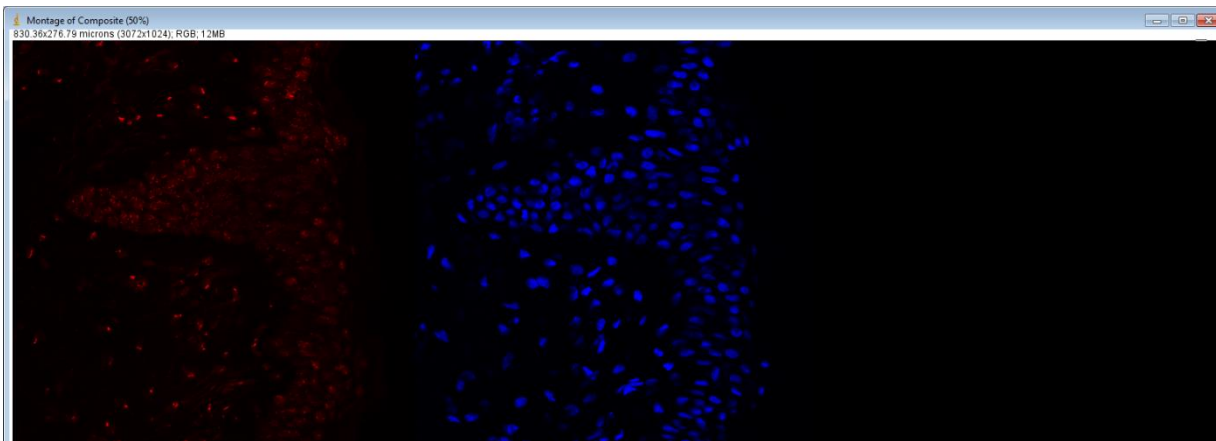
Dans cet exemple il n'y a que deux channels : un bleu et un rouge

Cliquer sur  : sépare les 3 images





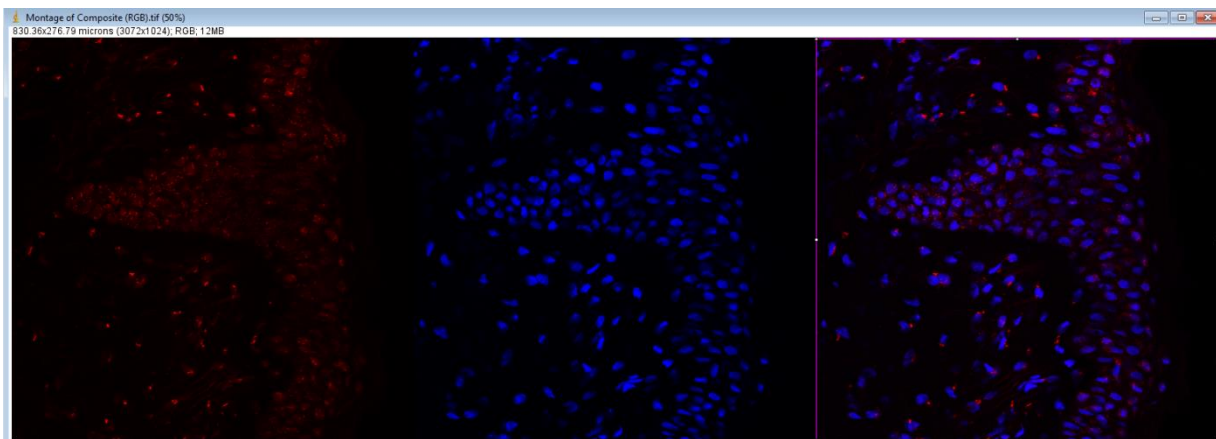
“tire bouchon” vers la droite : ajoute une case vide



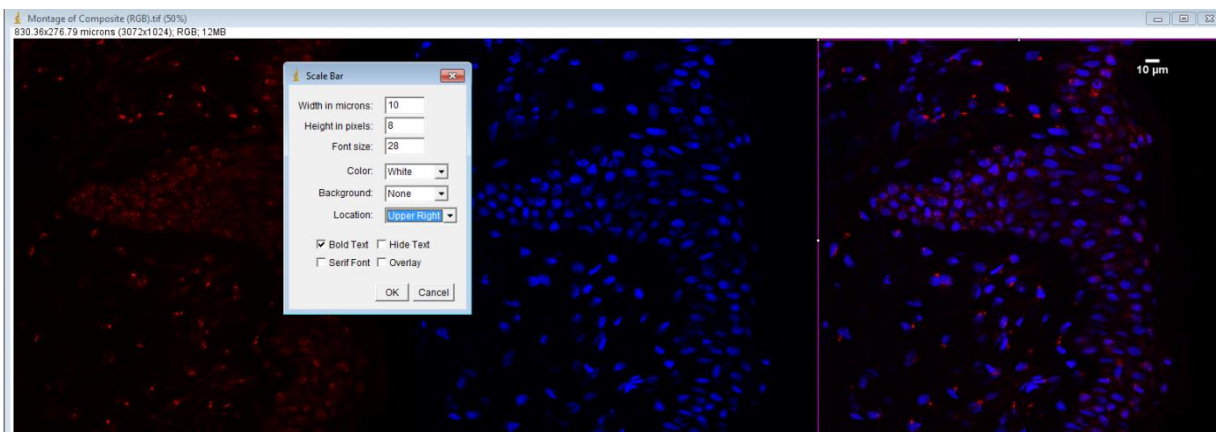
d'une image vers une autre : échange les images de place

En cliquant sur l'icône , on peut modifier les images :

**Exemple** : clic droit sur une image 1 (rouge) « copier » et coller dans la case vide de droite de même, copier l'image 2 (bleue) puis la coller sur la case de droite : on obtient une superposition

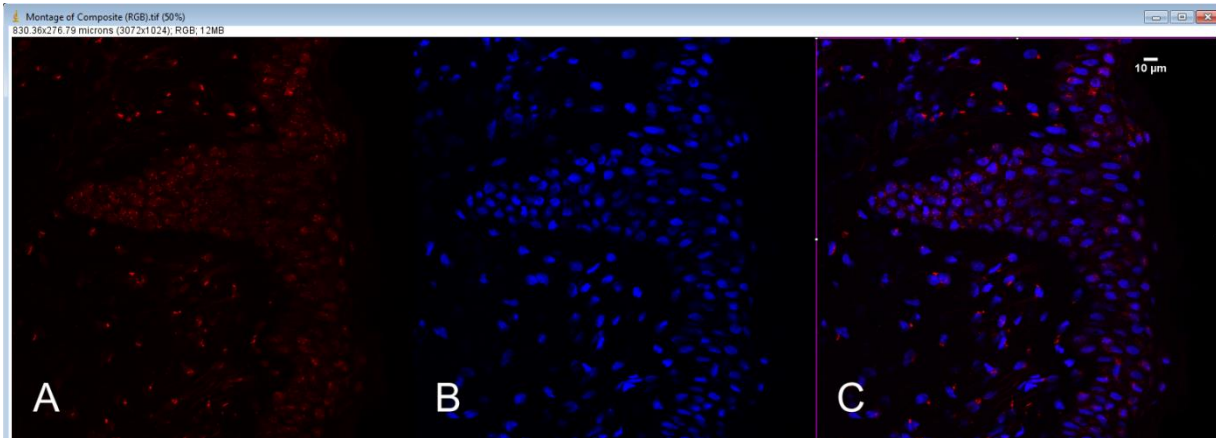


: Ajouter barre d'échelle





: ajoute des lettres sur images (cliquer sur la position où l'on veut la lettre)



Tuto sur internet concernant magic montage :

[http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=video:utilities:creating\\_montages\\_with\\_magic\\_montage](http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=video:utilities:creating_montages_with_magic_montage)

## C'EST BIEN BEAU TOUT ÇA MAIS ÇA MANQUE DE CHIFFRES... QUANTIFICATION ET MESURES

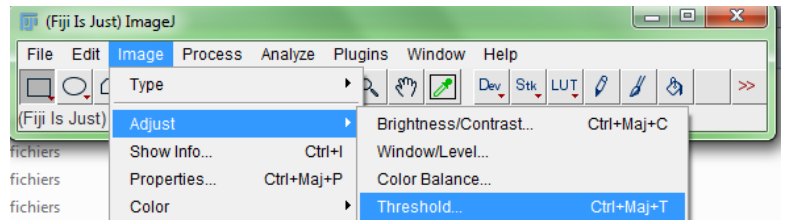
Je ne pourrais pas utiliser ces images pour « quantifier » mon marquage ?

### Quantifier la fluorescence due au signal

Afin de comparer plusieurs images obtenues en microscopie on peut être amené à vouloir quantifier la fluorescence due au signal. Cela est possible en utilisant ImageJ.

Ouvrez votre photo dans ImageJ et réglez l'échelle si nécessaire.

Dans un premier temps, il vous faut régler le seuillage de l'image. Concrètement il s'agit de choisir à partir de quelle intensité le signal peut être considéré comme n'étant pas du bruit de fond. L'image sera ainsi « binarisée » : votre signal d'intérêt sera en noir, le reste en blanc.

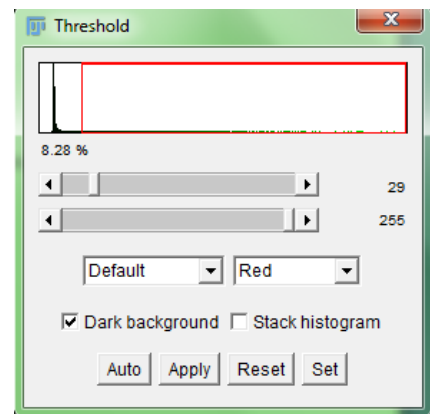


Allez dans Image, Adjust, Threshold...

Une partie de votre image apparaîtra alors en rouge et une fenêtre de dialogue apparaît alors avec différentes options.

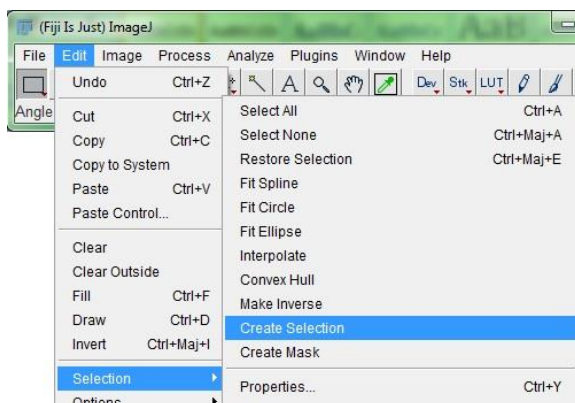
En haut, vous aurez d'abord un diagramme représentant l'intensité du signal.

En dessous se trouvent 2 barres : la première vous permet de régler l'intensité minimum, la seconde de régler l'intensité maximale. Ces 2 barres d'intensité permettent de délimiter le signal (en rouge sur votre image) qui sera sélectionné.



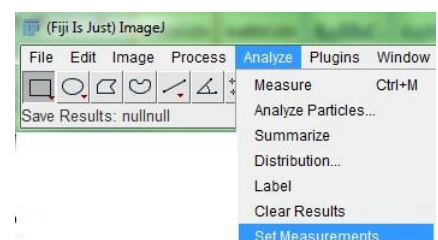
Quand vous aurez ainsi réglé le seuillage, appuyez sur Apply. Votre image passe alors en noir et blanc.

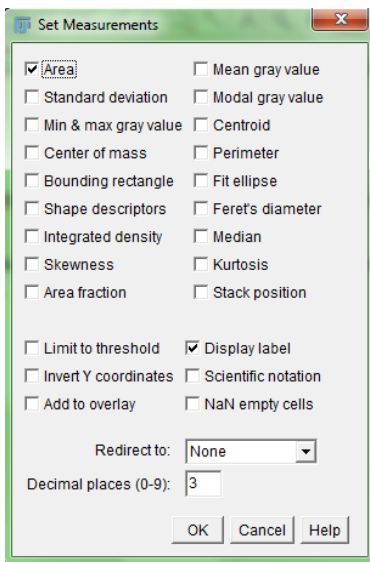
Allez ensuite dans Edit, Selection, Create Selection.



Cela permet de sélectionner l'intégralité de votre signal.

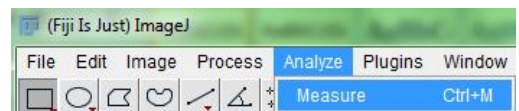
Vous n'avez qu'à mesurer la surface de ce signal. Allez dans Analyze, Set Measurements pour choisir les types de mesures et le types d'informations qui vous seront affichées.





Cochez « Area » pour avoir la surface et « Display Label » pour que le nom de votre image soit affiché dans la fiche de résultats. D'autres options peuvent être cochées selon votre convenance.

Vous pouvez maintenant effectuer la mesure. Cliquez sur Analyze, Measure (Vous pouvez taper sur Ctrl+M pour aller plus vite).




Une fenêtre s'ouvre vous donnant le résultat de la mesure. Cette fenêtre Results peut s'enregistrer sous format excel en allant dans File, Save as...

**Note :** Lorsque l'on veut comparer la surface de fluorescence de plusieurs photos, il est important de fixer la même valeur pour le seuillage. Cela nécessite de faire des essais avec plusieurs photos pour trouver la valeur de seuillage la plus adéquate.


**Note 2 :** Une macro est proposée pour quantifier la fluorescence de plusieurs images simultanément (voir p33). Pensez à y modifier les valeurs de seuillage.

### Maintenant je dois mesurer les éléments de mon image...

Il est préférable de travailler sur une image calibrée dont on connaît l'échelle (cf p4)

Tracer un trait sur l'élément à mesurer à l'aide de l'icône  puis cliquer sur Analyze → Mesure (ou Ctrl+M)

On obtient alors le tableau « results » sur lequel est indiquée la longueur (dans l'unité de mesure utilisée pour calibrer l'image, exemple :  $\mu\text{m}$ ).

Si l'élément à mesurer est de forme elliptique, utiliser l'icône  et tracer un trait sur l'élément d'intérêt puis cliquer sur Analyze → Mesure (ou Ctrl+M)


On obtient alors le tableau « results » sur lequel sont indiqués différents paramètres : l'aire (en  $\mu\text{m}^2$  ou autre selon la calibration de l'image), le périmètre etc

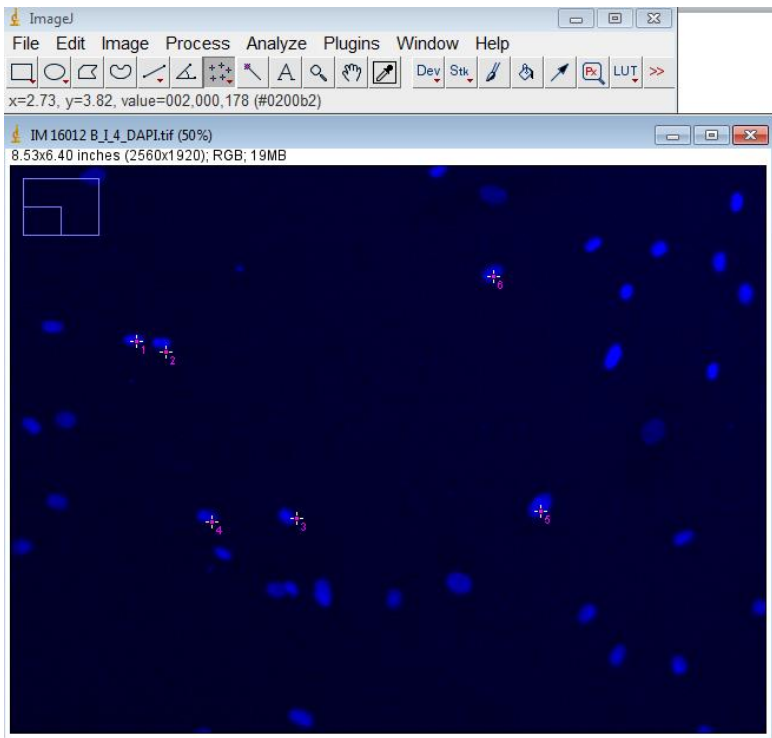
Il est possible de personnaliser les paramètres souhaités en cliquant dans Analyze → set measurements

## Et même compter les éléments de mon image...

### Manuellement



En cliquant sur l'icone , il est possible de cliquer sur chaque élément à dénombrer. A chaque clic, un numéro s'affiche.

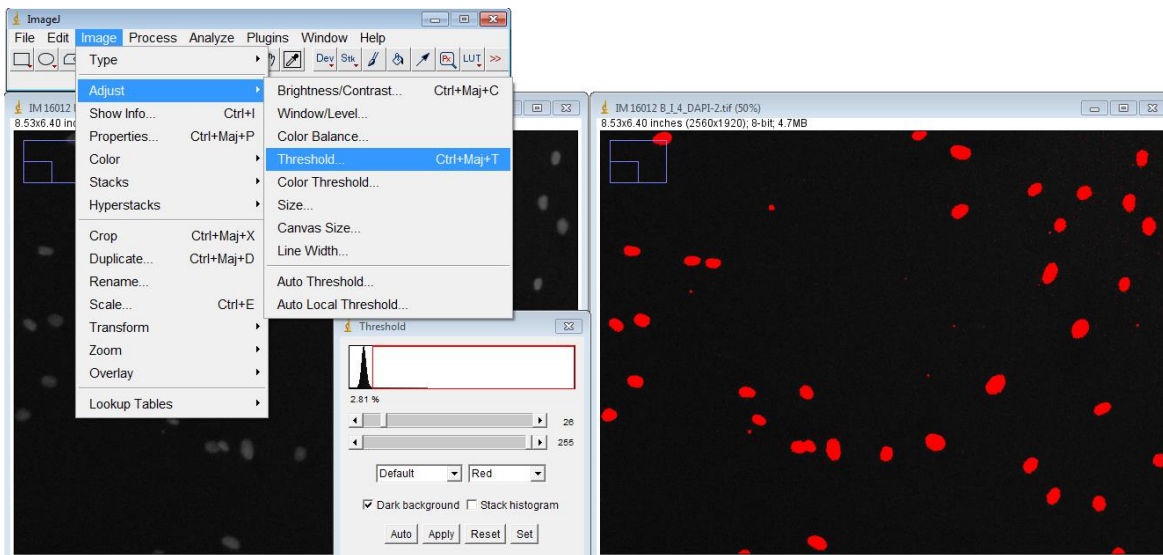


### ImageJ peut le faire !

Glisser/déposer une image dans ImageJ

Afin de « dire » à image J ce qui est un élément, il faut faire un « seuillage » : déterminer un seuil de fluorescence pour lequel on accepte que l'élément est à dénombrer et non du bruit de fond.

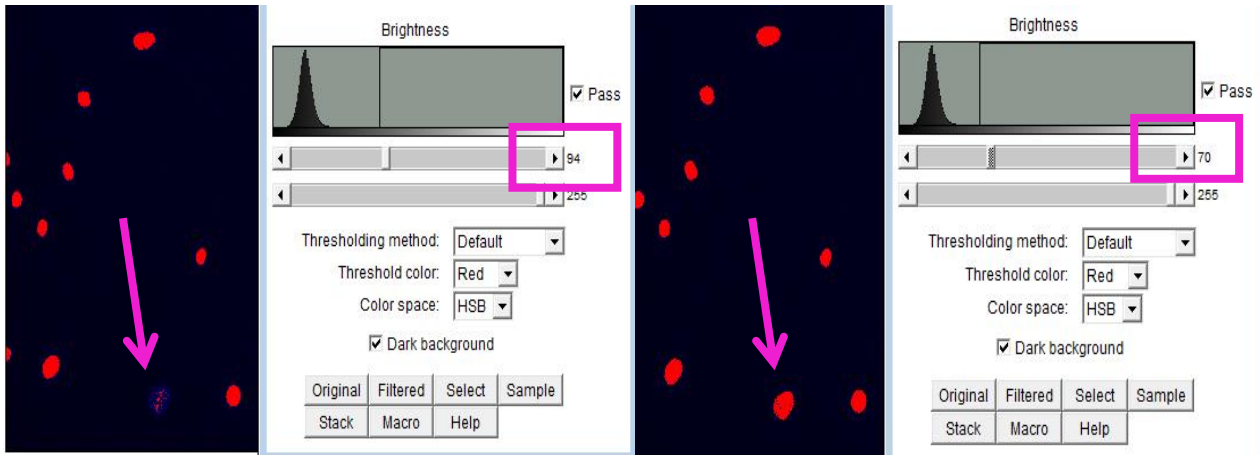
Pour cela aller dans Image → Adjust → Threshold (si l'image est en noir et blanc : 8,16 ou 32 bits) ou Color threshold (si l'image est en couleur : RGB)



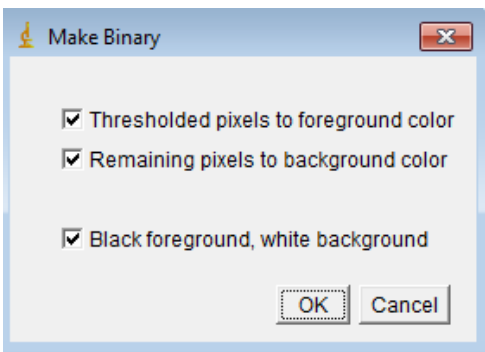
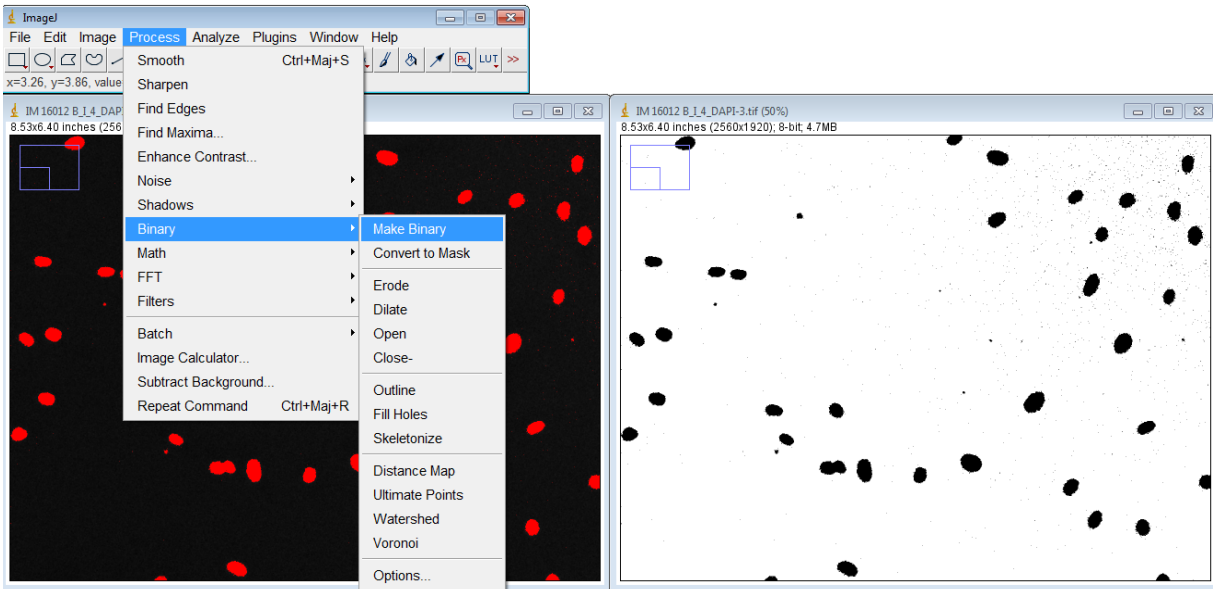
Cliquer sur « Dark background » pour que les éléments à dénombrer apparaissent en rouge (possibilité de changer la couleur dans « Threshold color »)

Pour « accepter » ou non un élément, il faut faire varier les valeurs sous le(s) graphiques qui apparaissent.

**Exemple :**

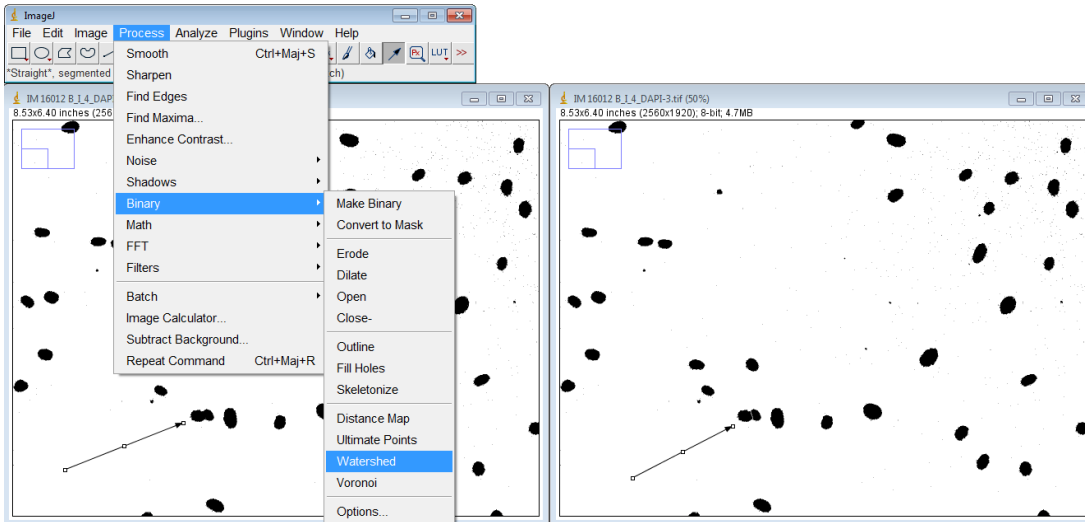


Il faut ensuite transformer cette image en noir et blanc (binaire) : (côté technique : les pixels prennent soit la valeur 0 : blanc ou 1 : noir)

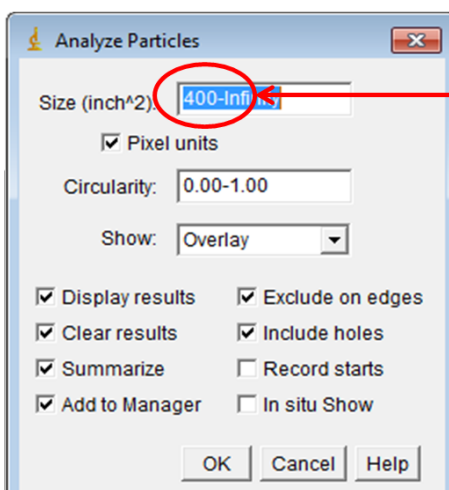
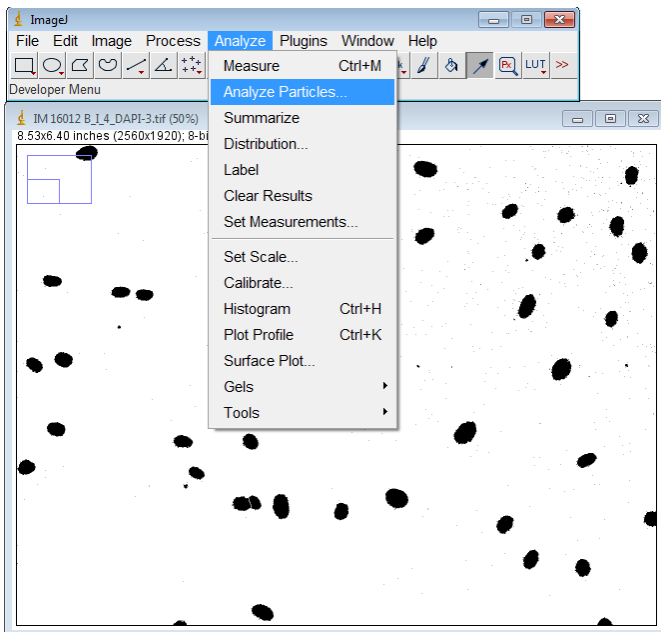




Attention, lorsque deux éléments sont collés, on peut les séparer en faisant comme suit :



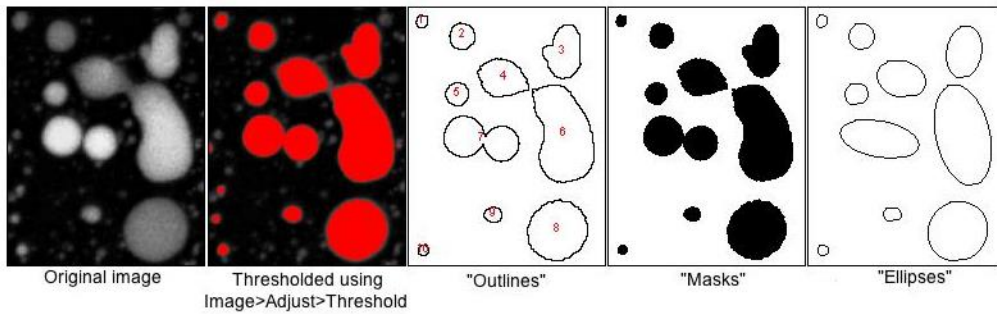
Puis il faut demander à ImageJ de calculer le nombre d'éléments en cliquant sur Analyze → Analyze particules



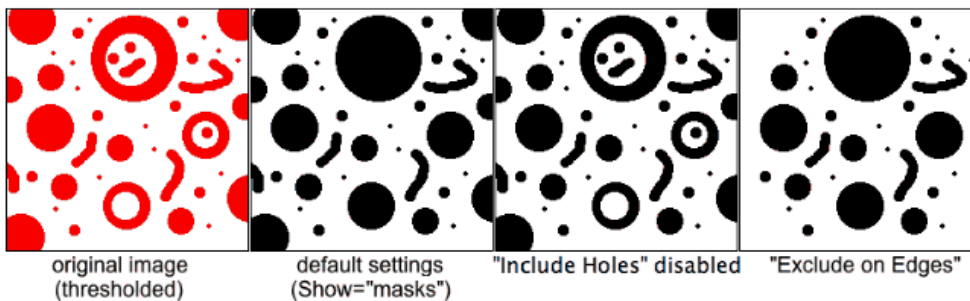
Taille minimum de l'élément à compter

Si l'image est calibrée, entrer la valeur de l'aire (en  $\mu\text{m}^2$  ou autre) des éléments le plus petit et le plus grand (cf paragraphe « Mesurer des éléments ») et décocher « pixel units ». Si l'image n'est pas calibrée entrer la valeur de l'aire en  $\text{inch}^2$  et cocher « pixel units ».

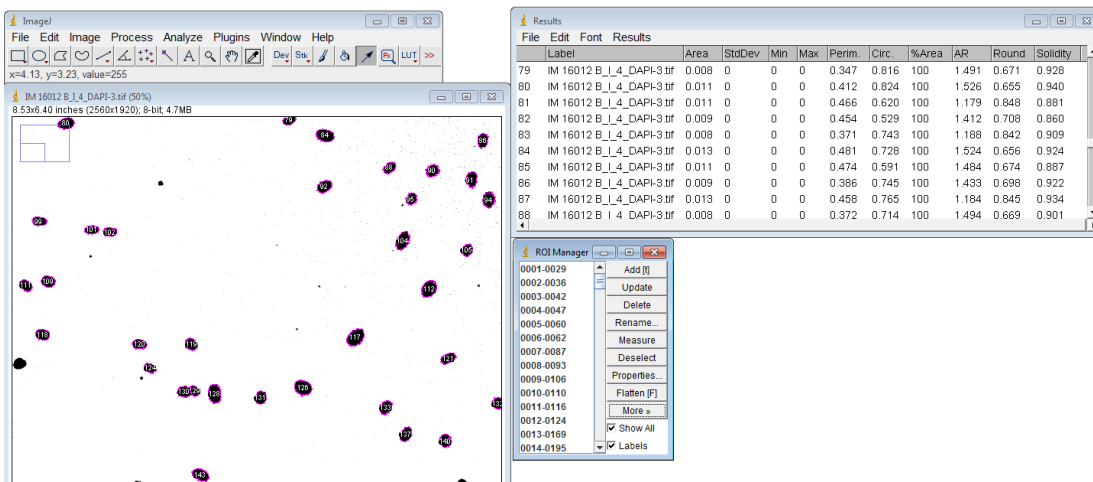
Il est possible de choisir de que l'on veut qu'ImageJ nous montre



- Cliquer sur « display results » pour avoir les mesures (d'aires etc) pour chaque élément dans la fenêtre « result ».
- Cliquer sur « clear results » pour effacer les éventuelles mesures précédentes
- Cliquer sur « summarize » pour obtenir, dans une fenêtre différente, le total des éléments dénombrés, la moyenne des aires etc...
- Cliquer sur « exclude on edges » pour ne pas tenir compte des éléments situés sur le bord de l'image
- Cliquer sur « include holes » pour considérer un élément qui possède un peu de vide à l'intérieur comme un seul élément
- Cliquer sur « Add to manager »



Puis cliquer sur OK

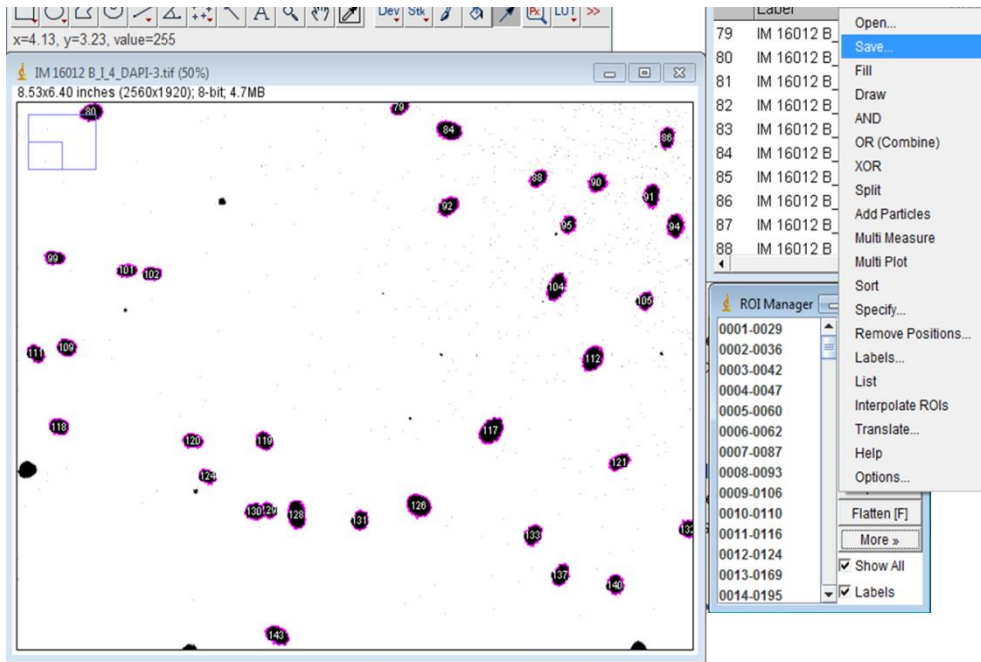


Et voilà, les éléments sont dénombrés automatiquement et sont répertoriés dans le ROI (region of interest) manager.

SUPPLEMENT : IL EST POSSIBLE DE SUPERPOSER LES ELEMENTS DENOMBRES SUR UNE AUTRE PHOTO, PRISE EN LUMIERE TRANSMISE PAR EXEMPLE.

Pour cela, glisser-déposer la photo sur laquelle on désire superposer les éléments dénombrés dans ImageJ et cliquer sur « show all » dans le ROI manager.

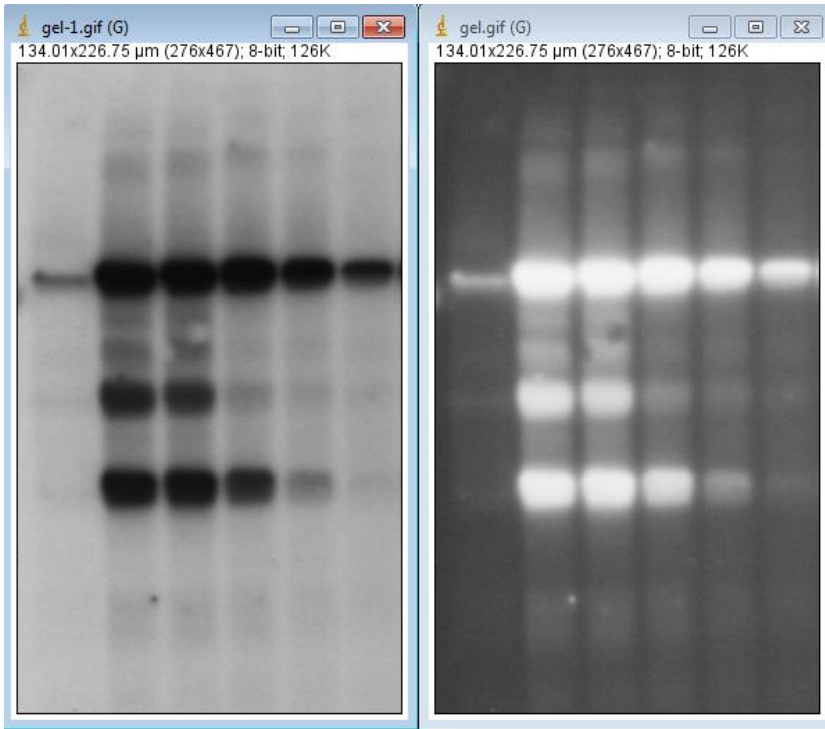
Il est aussi possible d'enregistrer le ROI manager, en cliquant sur « More » → « save » et de superposer les éléments dénombrés plus tard ainsi que de conserver les mesures réalisées pour chacun des éléments.



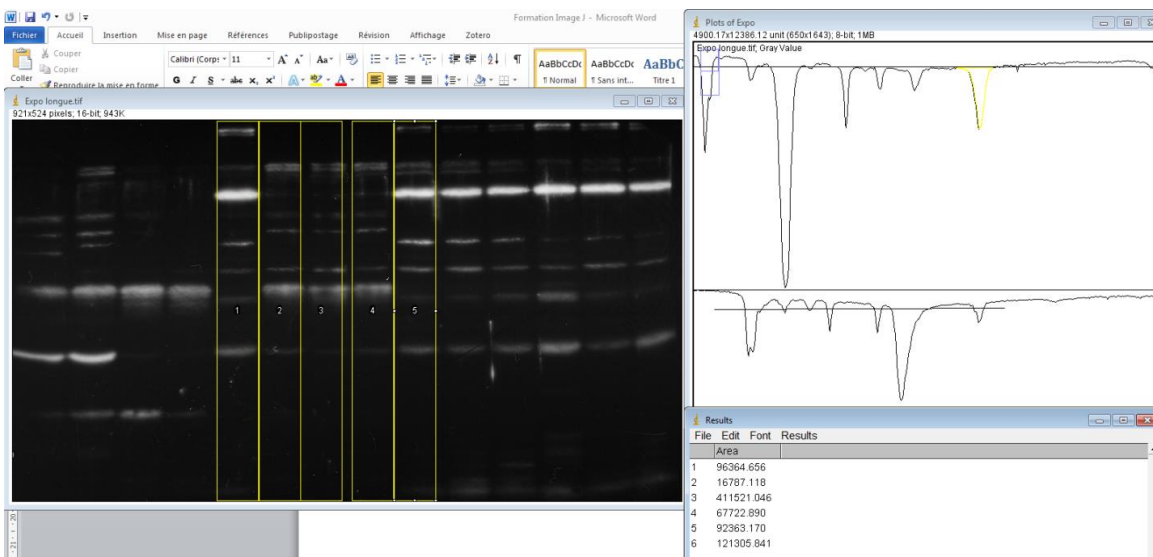
## FINALEMENT IL Y A PLEIN DE CHOSES A FAIRE AVEC IMAGEJ ! JE PEUX MEME QUANTIFIER LES BANDES DE MON GEL !

Ouvrir une image du gel à étudier.

La convertir en 8 bits (Image → type → 8-bits) : l'image est ainsi en nuances de gray et il est possible de faire de la densitométrie.





Afin de définir les colonnes à étudier, sélectionner l'icône carré et tracer un rectangle sur toute la colonne puis cliquer sur analyse → Gels → select first lane. Cliquer dans le rectangle et déplacer le « nouveau rectangle » sur la 2<sup>e</sup> colonne puis analyse → Gels → select next lane et ainsi de suite sur toutes les colonnes d'intérêt.



NB : Il est important que les rectangles ne se chevauchent pas. Au besoin, laisser un puits libre entre chaque dépôt lors de la réalisation des gels.

Puis analyse → Gels → plot

Sélectionner l'outil « trait »  et faire la ligne de base sur le graphique afin d'exclure le bruit de fond. Puis sélectionner outil « baguette magique »  et sélectionner un pic → l'aire du pic est ainsi obtenue dans une nouvelle fenêtre.

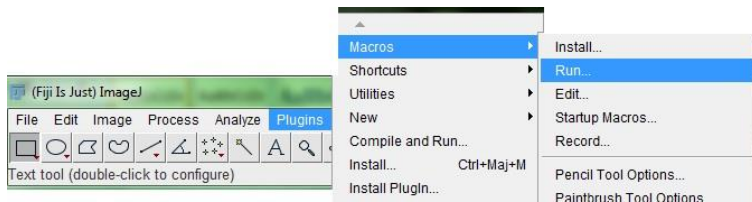
**Remarque :** lors du scan du gel, sélectionner l'extension .tiff

## ET LES MACROS C'EST DU POULET ?

### Les macros sur ImageJ

Les macros sont des fichiers textes dont le code reconnu par le logiciel permet à ce dernier d'automatiser certaines tâches.

Pour utiliser une macro dans ImageJ, allez dans Plugins, Macros, Run.



Il est aussi possible d'installer les macros en cliquant sur Plugins, Macros, Install. Une fois installée, la macro sera visible dans Plugins, Macros et pourra être lancée directement en cliquant dessus. Dans certains cas, la macro peut apparaître sous la forme d'un bouton de la barre d'outils (voir plus loin).

Attention toutefois, l'installation des macros est perdue à chaque fermeture d'ImageJ.

Mais avant d'utiliser une macro, il vaut mieux savoir de quoi elle est composée et comment l'adapter à ses besoins.

Le fichier texte d'une macro commence toujours par son nom suivi de {

Puis la liste des actions que le logiciel doit réaliser doit être indiquée en insérant un point-virgule avant de sauter chaque ligne et en terminant par }.

#### Exemple :

```
macro "Faire une mesure"{
run("Measure");
run("Save");
}
```

Cette macro qui aura pour nom « Faire une mesure » permet d'effectuer une mesure et d'enregistrer.

Pour connaître le code correspondant à une action, un outil très pratique est disponible sur ImageJ. En effet, en allant dans Plugins, Macros, Record, une fenêtre apparaît dans laquelle chacune des actions réalisées par la suite sur ImageJ sera enregistrée sous son code correspondant. Oui c'est super pratique ! Néanmoins cela ne fonctionne pas toujours pour l'utilisation de certains plugins.

Si vous voulez ajouter une récurrence dans la macro (c'est-à-dire traiter plusieurs photos en même temps), voici le code :

```
setBatchMode(true);
for (i = 1; i <= nImages; i++) {
    selectImage(i);
    Liste des actions que vous voulez ajouter
    setBatchMode(false);
}
```

Pour voir des exemples concrets, les macros proposées sont décrites en bonus. Ces macros sont à adapter selon vos besoins.

## BO-BO-BO-BONUS DU MANUEL

## Description des macros proposées

**Quantifluo :**

macro "Quantifluo" {	Nom de la macro
setBatchMode(true);	Mise en place de la récurrence pour traiter plusieurs images en même temps
for (i = 1; i <= nImages; i++) {	
selectImage(i);	
run("Set Scale...", "distance=1024 known=1500 pixel=1 unit=µm");	Mise à l'échelle des images ; distance : longueur en pixels ; known : longueur correspondante en µm
setThreshold(79, 255);	
run("Convert to Mask");	Réglage du seuillage (intensité min, intensité max)
run("Create Selection");	Application du seuillage
run("Measure");	Sélection du signal
setBatchMode(false);	Mesure
}	
}	

**Z-project :**

macro "Z project" {	Nom de la macro
StackTitle = getTitle();	Identification sous le nom « Stack Title » du stack ouvert
selectWindow(StackTitle);	Sélection du stack qui est maintenant reconnu sous le nom « Stack Title »
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");	Projection en Z avec l'option « Maximum Intensity »
selectWindow(StackTitle);	Sélection du stack d'origine
run("Z Project...", "projection=[Average Intensity]");	Projection en Z avec l'option « Average Intensity »
selectWindow(StackTitle);	Sélection du stack d'origine
run("Z Project...", "projection=[Sum Slices]");	Projection en Z avec l'option « Sum Slices »
}	

**Note :** L'identification du stack est nécessaire pour pouvoir faire toutes les projections en Z. Autrement, le logiciel fera la projection sur l'image en cours d'utilisation (par exemple, la projection « Average Intensity » sera faite non pas sur le stack mais sur l'image obtenue après la projection en Z Max Intensity »).

**Scalebar bas droit :**

macro "Scalebar Bas Droit Action Tool - C059T1d20D" {	Nom de la macro suivi de « Action Tool - ... » permettant de créer un bouton dans la barre d'outil
setBatchMode(true);	Mise en place de la récurrence
for (i = 1; i <= nImages; i++) {	
selectImage(i);	
run("Scale Bar...", "width=100 height=8 font=28 color=White background=None location=[Lower Right] bold");	Ajout de l'échelle ; width : longueur de l'échelle ; height : épaisseur de la barre ; font : taille de police ; color : couleur de l'échelle ; background : couleur de fond pour l'échelle ; location : localisation de l'échelle (Lower Right, Lower Left, Upper Right ou Upper Left) ; bold : mise en gras du texte de l'échelle
run("Save");	Sauvegarde automatique
setBatchMode(false);	Fin de la récurrence
}	
run("Close All");	Fermeture de toutes les images ouvertes
}	

**Note :** Le code permettant de personnaliser le bouton ajouté dans la barre d'outil se décompose comme suit :

- Crgb : définit la couleur. Dans l'exemple ci-dessus, les valeurs sont 0 pour le rouge, 5 pour le vert et 9 pour le bleu.
- Txyssc : Dessine une lettre. Les valeurs x et y sont les coordonnées permettant de placer la lettre dans le bouton, ss correspond à la taille de la lettre et c correspond à la lettre qui sera affichée.

Pour que ce bouton soit en place, il faut installer la macro.

**Note 2 :** Veillez ce que l'échelle de vos images soit définie sur ImageJ avant d'utiliser la macro pour ajouter la barre.

**Note 3 :** Si vous mettez « color=White » comme ici, votre échelle prendra la couleur de votre fluorescence (de votre LUT plus exactement). S'il n'y a pas de signal, la barre sera blanche. Pour les images en lumière transmises, mettez « color=Black »

**Note 4 :** Attention à la sauvegarde automatique ! Pensez à faire une copie préalable de vos photos sans échelle ou à supprimer la ligne de sauvegarde et de fermeture. Ces 2 lignes ont été ajoutées afin que l'ajout de l'échelle sur plusieurs photos soit encore plus rapide.

**Note 5 :** 4 versions de cette macro vous sont proposées afin de pouvoir placer une échelle en bas à droite ou en bas à gauche sur des photos prises en fluorescence ou en lumière transmise. Chacune de ces versions a un bouton différent qui s'ajoute dans la barre d'outils.



**Sauvegarder Automatique :**

macro "Sauvegarde Action Tool - C059T1d20S" {	Nom de la macro avec création d'une icône
Dir = getDirectory("Image");	Le nom du dossier où se trouve l'image est récupéré
Newdir = Dir + "\\Mon dossier\\";	Création d'un dossier nommé « Mon dossier » là où se trouvent les images ouvertes
File.makeDirectory(Newdir);	
setBatchMode(true);	Mise en place de la récurrence
for (i = 1; i <= nImages; i++) {	
selectImage(i);	
Title = getTitle();	Le nom de chaque image est récupéré
saveAs("Tiff", Newdir+Title);	Sauvegarde de l'image au format Tiff dans le dossier qui a été créé
setBatchMode(false);	Fin de la récurrence
}	
run("Close All");	Fermeture de toutes les images ouvertes
}	

## Amélioration de l'image par l'application d'un filtre

### Appliquer un filtre

D'après le tutoriel écrit par Maxime Gotte pour le laboratoire en 2014.

Pour améliorer certains aspects de l'image, il est possible d'appliquer un filtre permet d'améliorer certains aspects de l'image. Différents algorithmes sont ainsi utilisés en fonction du filtre choisi.

Le filtre "Unsharp Mask" peut s'avérer très utile par exemple car il permet d'augmenter sensiblement la netteté.

Pour appliquer ce filtre, aller dans Process, Filters, Unsharp Mask...

**Note :** Il est conseillé de signaler l'application d'un filtre sur une image lors de la présentation des résultats.

### Filtrage spatial et fréquentiel

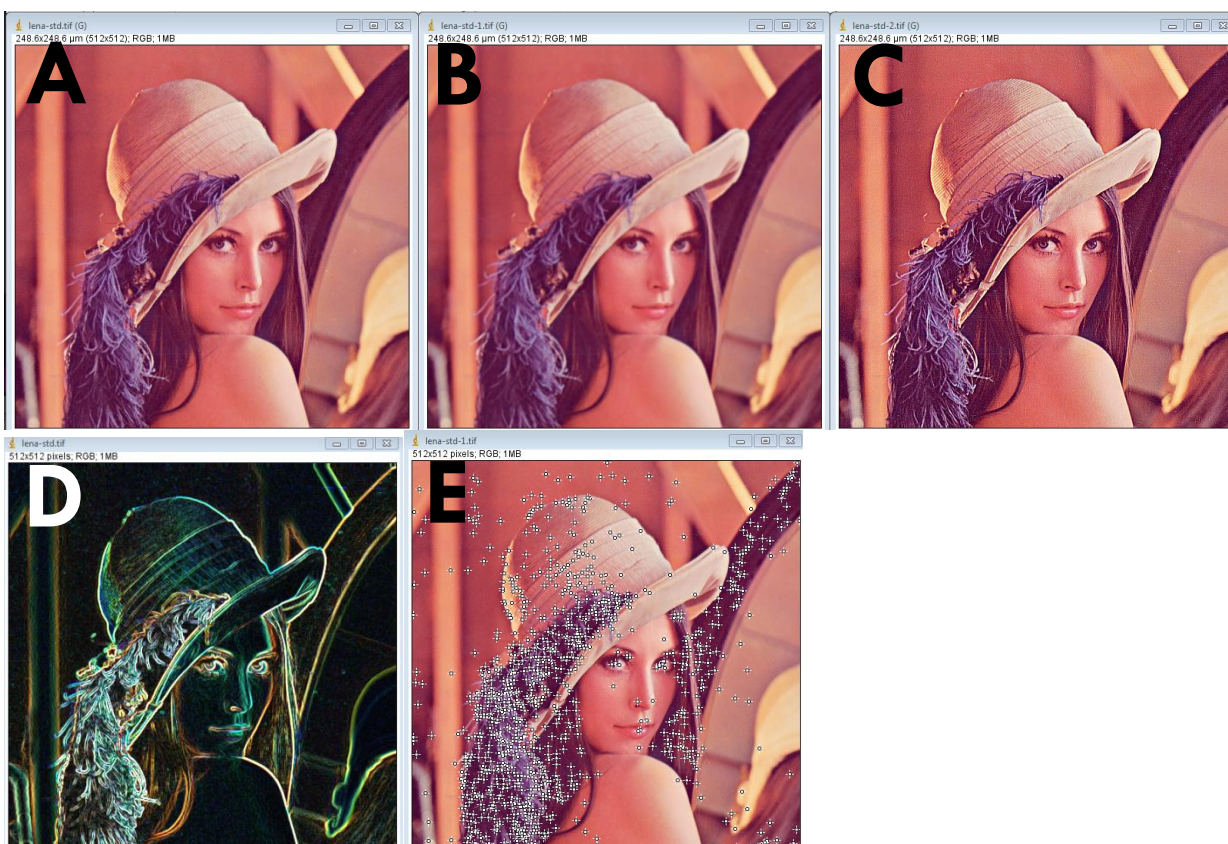
#### Filtrage spatial

Déconvolution : permet de ne pas avoir de flou (+ utile sur 3D)

Un élément qui passe à travers un objectif sera automatiquement « convolué » en x et y, il faut alors « déconvoluer » (application de filtre) pour retrouver l'information initiale.

#### Exemple 1 :

Dans ImageJ , cliquer sur File → open samples → Lena (image A)



Cliquer sur Process

Smooth : lisse l'information (Image B)

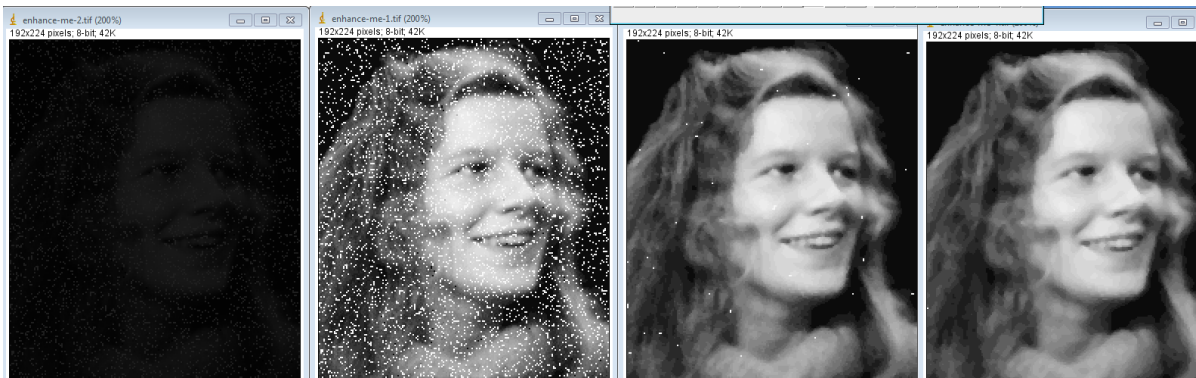
Sharpe : exacerbe l'information (Image C)

Edge : fait ressortir les contours (Image D)

Fast maxima : fait ressortir les points possédant un maximum d'intensité (exemple, pour rechercher les bactéries)

Math → gamma : on peut faire varier le gamma

### Exemple 2 :



A : original → B : enhance contrast → C : despeckle → D : despeckle de nouveau (attention plus le despeckle est réalisé, plus on perd de signal)

### CORRECTION D'UN PIXEL

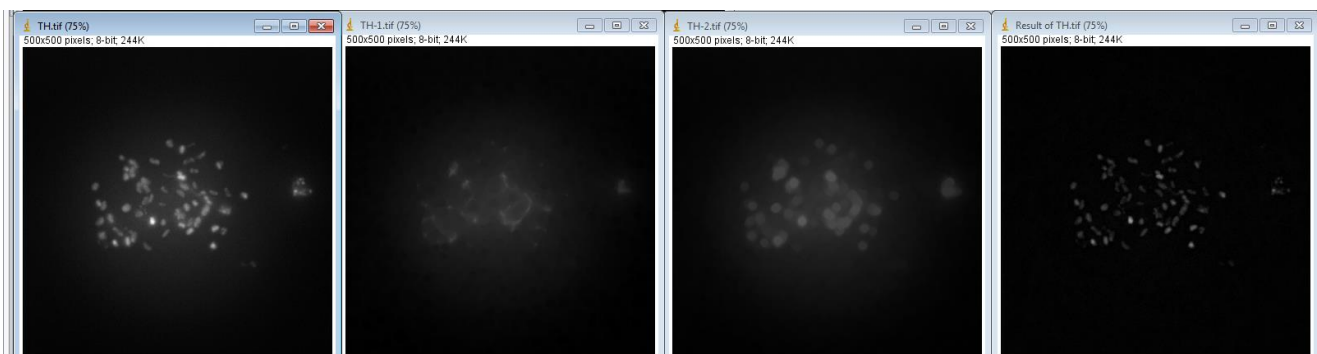
Exemple, si un pixel est blanc et que l'on veut le corriger :

zoomer sur le pixel blanc, avec l'outil « rectangle » sélectionner le pixel + un voisin, détermination de la valeur du pixel voisin (affiché dans rectangle image J), double clic sur « pipette » double clic sur carré coloré, mettre la même valeur du pixel sur rouge/vert/bleu, ok, puis edit → fill

### ELIMINATION DU BRUIT DE FOND

Il faut faire disparaître toutes les particules appartenant au bruit de fond puis on soustraira ce filtre à l'image originale, ce qui nous permettra de ne plus avoir de bruit de fond.

### Exemple :



Un élément fait 15 pixel, calculé en zoomant (soit rayon de 6 à 8 pixels)

Image 1 : originale

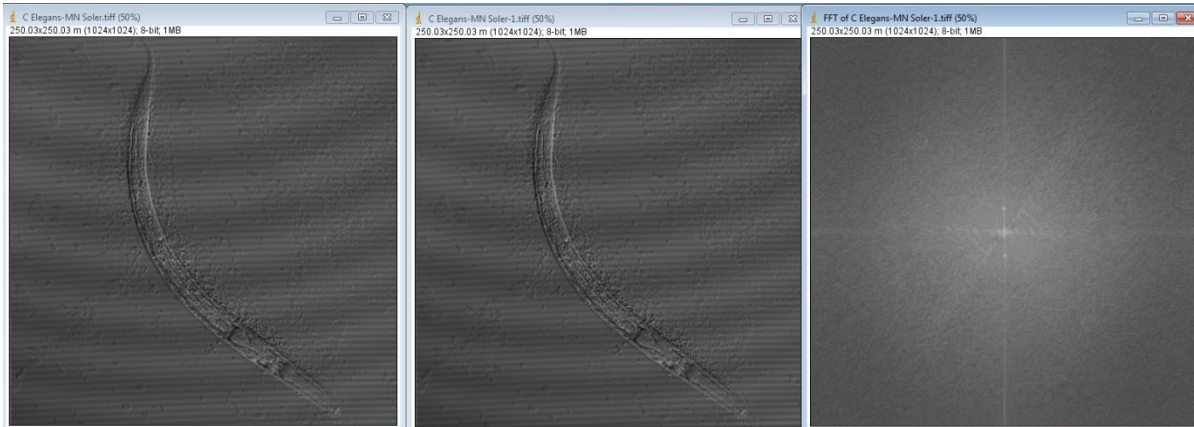
Image 2 : cliquer sur image → duplicate puis process → filter → minimum radius = 6

Image 3 : process → filter → maximum radius = 6

Image 4 : process → image calculator : subtract (TH – TH1)

## Filtrage séquentiel

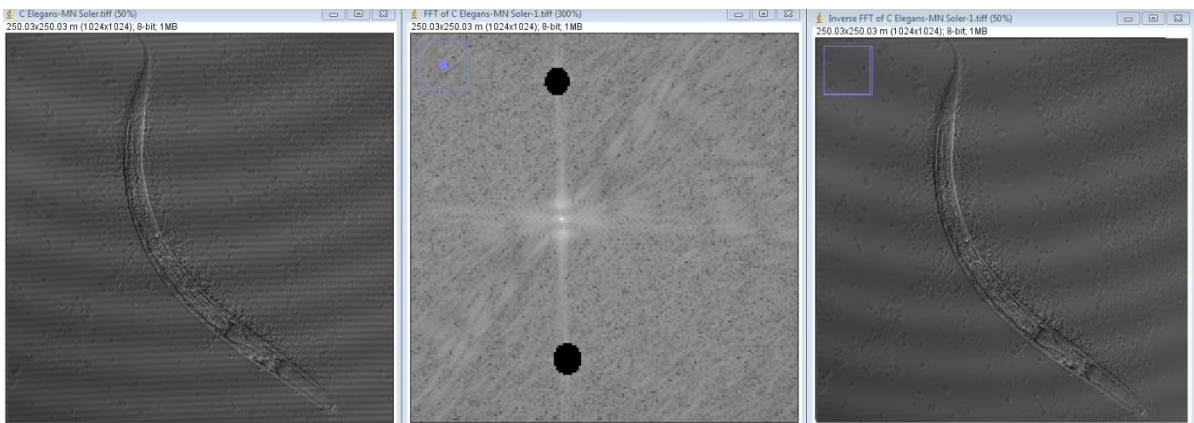
Exemple :



La « trame » correspond aux points de haute fréquence : ce sont les points éloignés du centre après une transformation de Fourier.

Il faut mettre un filtre sur ces points en mettant une région d'intérêt que l'on remplit en noir puis on applique une transformée de Fourier inverse.

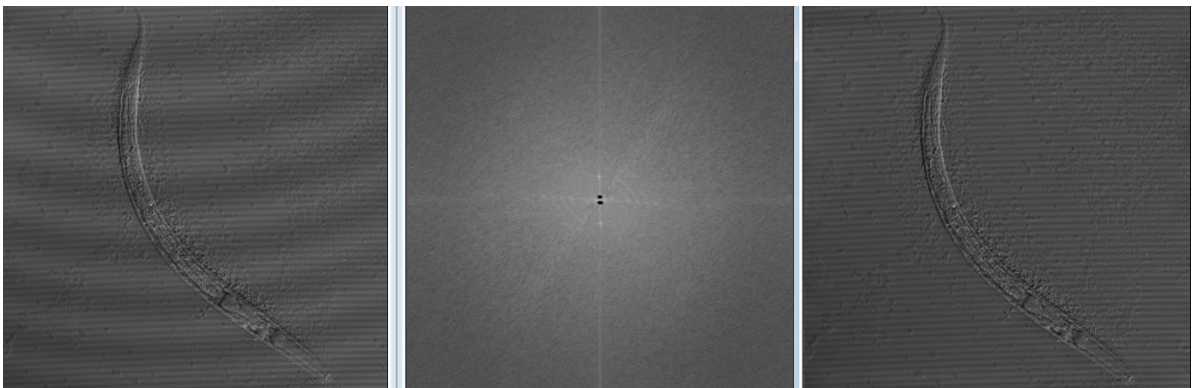
En pratique :



1 : image originale

2 : process → FFT → FFT (les points blancs éloignés représentent les basses fréquences) puis « petit rond » pour délimiter une région d'intérêt. Petite pipette (double clic) puis double clic sur carré de couleur : tout mettre à 0, OK. Edit → fill. Faire ça pour les 2 points éloignés.

3 : process → FFT → FFT inverse



1 : image originale

2 : process → FFT → FFT (les points blancs proches représentent les hautes fréquences) puis « petit rond » pour délimiter une région d'intérêt. Petite pipette (double clic) puis double clic sur carré de couleur : tout mettre à 0, OK. Edit → fill. Faire ça pour les 2 points éloignés.

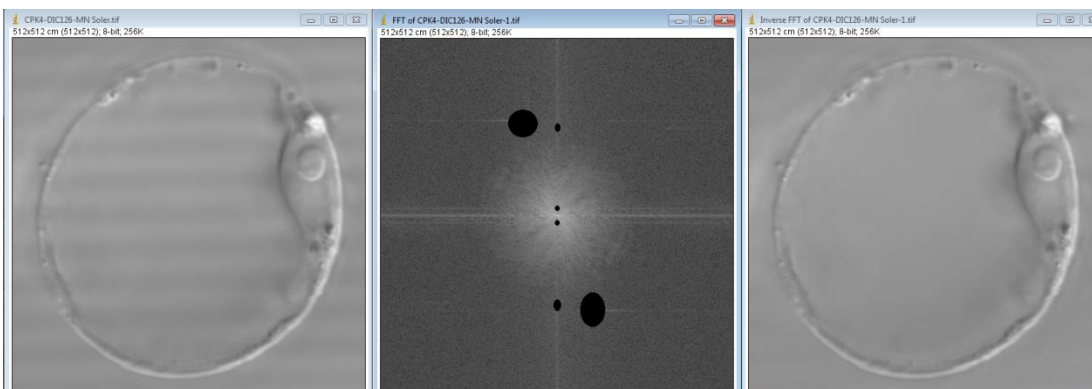
3 : process → FFT → FFT inverse



1 : image originale

2 : process → FFT → FFT régions d'intérêts sur les hautes et basses fréquences

3 : process → FFT → FFT inverse



## L'imagerie en théorie

- \* Une image peut être enregistrée avec un capteur matriciel (exemple : microscopie optique) ou ponctuel (exemple : microscopie confocale : une valeur pour chaque point)

- \* Un pixel est l'atome de l'image (dimension 2D)

Voxel : pixel + dimension z

Le plus petit pixel en microscopie :  $6,45\mu\text{m} \times 6,45\mu\text{m}$

- \* L'image d'un point à travers un système optique est une tache de diffraction/ tache d'Airy

- \* Chaque pixel porte une information et il est donc possible de la quantifier car chaque élément à une intensité.

- \* Dynamique d'image : différents niveaux d'informations

Image A : 256 niveaux = 8 bits

Image B : 64 niveaux = 4 bits

Image C : 4 niveaux = 2 bits

- \* Dans ImageJ, il est préférable de travailler en 8 bits. Les images sont souvent enregistrées en 8 bits (Confocal : PMT, HyD).
- \* Une image 3 couleurs RGB (Rouge, Vert, Bleu) est une image 24 bit contenant 3 images de 8 bits.
- \* Look Up tables ou LUTs sont des tables de fausses couleurs.
- \* Une image Bitmap est une image pixllisée (un pixel avec une taille définie), ce qui n'est pas le cas des images vectorielles).
- \* Compression d'image : il est préférable de garder les images en .tiff car une compression au format JPEG entraîne une perte d'information importante.

EPS est le format demandé pour la publication d'article scientifique.

### **Histogramme d'une image**

C'est la détermination du nombre de pixels avec la valeur x1, du nombre de pixels avec la valeur x2 etc

- moyenne de l'histogramme :  $256/2 = 128$  (exemple, si la moyenne est de 124, il y a autant de sombre que de clair)
- étirement : distribution linéaire des maximum entre les bornes de l'histogramme
- gamma : les pixels proches de 0 sont forcés d'être à 0 ou inverse : peut forcer à être en saturation. Changement irréversible ! donc ne pas changer le gamma lors de l'acquisition d'images!



# Annexe 3 : Poster présenté à la 1<sup>ère</sup> journée de la SFR « Normandie Végétal », Cell Wall extensins: role in root-microbe interaction

### Cell Wall extensins: role in root-microbe interaction

Romain Castilleux<sup>a</sup>, Barbara Plancot<sup>a</sup>, Agnès Attard<sup>b</sup>, Benjamin Lefranc<sup>c</sup>, Jérôme Leprince<sup>c</sup>, Mustapha Arkoun<sup>d</sup>, Eric Nguema-Ona<sup>d</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>d</sup>, Maïté Vitré<sup>e,f,g</sup> and Azeddine Driouch<sup>e,f,g</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Génomique – EA 4336, Université de Rouen Normandie, UNIROUEN Institut Supérieur Agronomique – INRA 2125, CNRS 7254, Université de Rouen Normandie, Normandie Université 10322 21@univrouen.fr  
<sup>b</sup> Communication Neurosciences et Neuroendocrinologie (CCN) – Université de Rouen Normandie, Centre Mondial de l'Innovation, Groupe Rouiller, Structure Fédérative de Recherche « Normandie-Végétal », Université de Rouen Normandie/PRIMACEN (Plateforme de Recherche en IMagerie Cellulaire de Normandie)

#### Introduction

Plants are constantly exposed to pathogen aggressions, including fungi and bacteria. This can lead to severe disease development and massive agricultural losses. To cope with pathogen attacks, plants have developed different defence mechanisms to ensure their protection. Cell wall is one of the first barriers against pathogens and is mostly composed of polysaccharides and glycoproteins such as the hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs). Among these HRGPs, extensins are thought to have a structural role, strengthening the cell wall through intra- and/or inter-molecular cross-linking between tyrosine residues thereby limiting pathogen invasion. The cross-linking is catalysed by specific peroxidases and requires correct O-glycosylation on the Serine-(Hydroxyproline)<sub>n</sub> motifs with respectively galactoside and oligogalactoside residues[1]. In 2019, Plancot et al [2] showed that extensins are involved in root response to elicitor. However, their exact role remains to be established.

In this project, we aim to unravel the function of extensins in root defence using specific monoclonal antibodies and selected mutants affected in extensin glycosylation.

#### 1. Immunolocalization of extensin epitopes in roots upon Flg22 elicitation

Quantification of fluorescence area in roots

Extensin root response to elicitor is epitope-specific

#### 2. Selection of mutants affected in extensin glycosylation

Name	Protein	Gene extensin	Reference
RAA1	Arabinosyltransferase which adds the 2 <sup>nd</sup> arabinose on extensin	AtUGT5120	Epstein et al., 2007 [3]
RAA2	Arabinosyltransferase which adds the 2 <sup>nd</sup> arabinose on extensin	AtUGT5130	Epstein et al., 2007 [3]
RAA13	Arabinosyltransferase which adds the 2 <sup>nd</sup> arabinose on extensin	AtUGT5132	Wu et al., 2009 [4]
RAA22	Protein O4 hydroxylase which hydroxylates the Proline	AtUGH030	Talbot et al., 2005 [5]

Glycan structure of extensins

#### 3. Immunolocalization of extensin epitopes in roots from the selected mutants

Extensin arabinosylation is involved in response to elicitation and probably in root defence

#### 4. Interaction between roots and the soilborne pathogen *Phytophthora parasitica*

Zooepores accumulation occurs specifically between the end of meristematic zone – beginning of elongation zone

#### 5. Interaction *P. parasitica* – roots

Extensin arabinosylation may contribute to limit colonization of the root by the pathogen

#### Conclusion

Extensin correctly arabinosylated → Limited invasion

Extensin defective in arabinose → Amplified invasion

Our model proposes that *P. parasitica* infection induces extensin cross-linking in the cell wall of *A. thaliana*. Arabinosylation of extensins is highly involved in cell wall strengthening, resulting in a reduction of pathogen colonization. The mechanism used by *P. parasitica* for *A. thaliana* root colonization remains to be clearly established. One hypothesis is that electrostatic mechanism could be involved in such interactions. Modification in extensin cross-linking could alter the cell wall charge and then impact root colonization by *P. parasitica*.

#### Acknowledgements

This work is supported by la région de Normandie (via the SFR Normandie-Végétal) and by CMI-Group Rouiller.

#### References

[1] S. Gupta et al. (2016) Annual Review of Phytochemistry, 78, 545-570.  
 [2] M. Plancot et al. (2019) Frontiers in Plant Science, 10, 1141-1146.  
 [3] J. Epstein et al. (2007) Biochemistry Biophysics Research Communications, 358, 114-118.  
 [4] B. Plancot et al. (2009) Plant Physiology, 149, 1334-1341.  
 [5] B. Talbot et al. (2005) The Plant Journal, 45, 190-200.





# Cell Wall extensins: role in root-microbe interaction

Romain Castilleux<sup>a</sup>, Barbara Plancot<sup>a</sup>, Agnès Attard<sup>b</sup>, Benjamin Lefranc<sup>c</sup>, Jérôme Leprince<sup>c</sup>, Mustapha Arkoun<sup>d</sup>, Eric Nguema-Ona<sup>d</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>d</sup>, Maïté Vicré<sup>a,e,f</sup> and Azeddine Driouich<sup>a,e,f</sup>

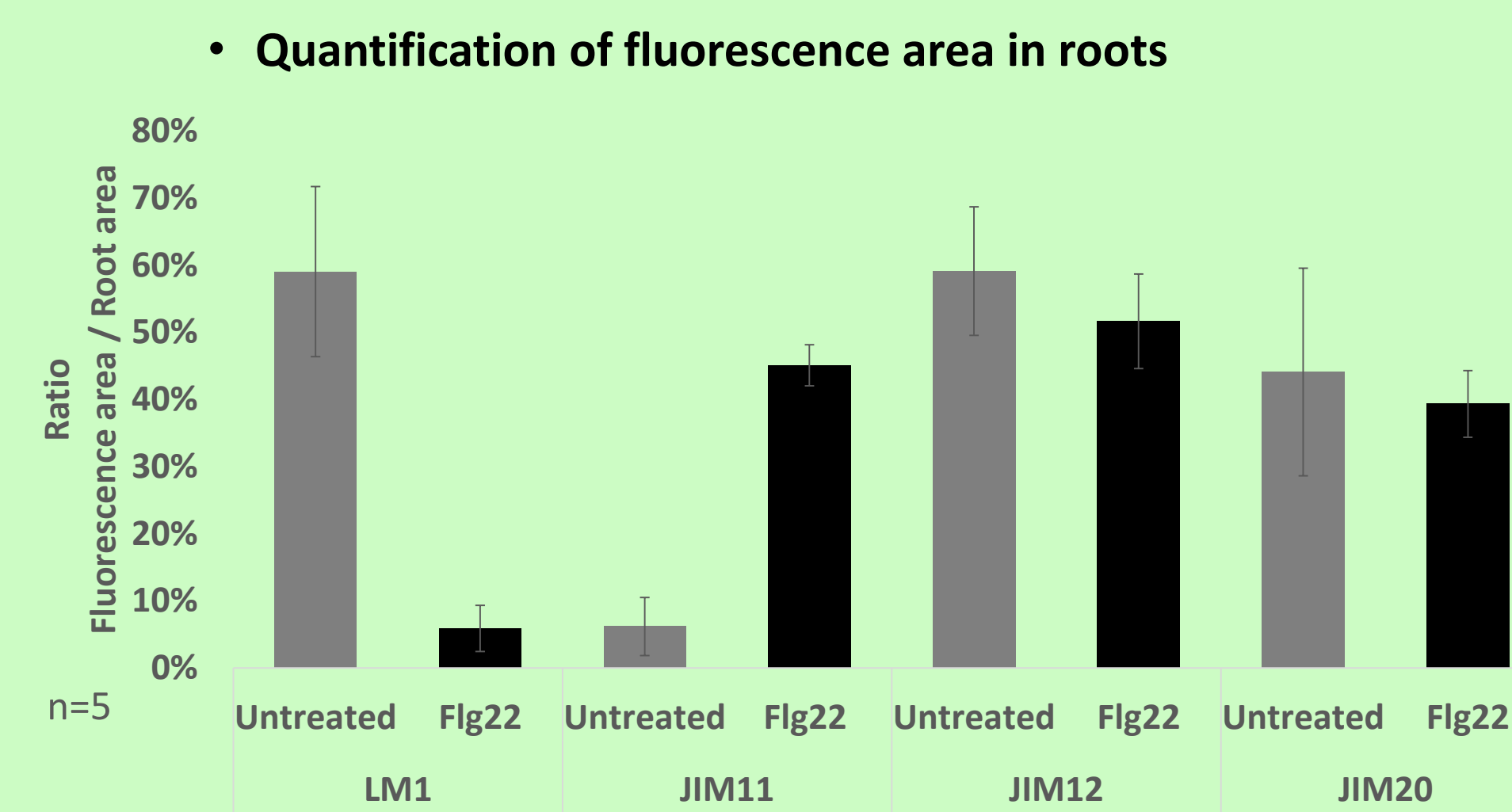
<sup>a</sup>Laboratoire Glyco-MEV – EA 4358, Université de Rouen Normandie <sup>b</sup>UMR Institut Sophia Agrobiotech - INRA 1355 - CNRS 7254, Université de Nice Sophia-Antipolis <sup>c</sup>Inserm U982 Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N) – Université de Rouen Normandie <sup>d</sup>Centre Mondial de l'Innovation, Groupe Roullier <sup>e</sup>Structure Fédérative de Recherche « Normandie-Végétale », Université de Rouen Normandie <sup>f</sup>PRIMACEN (Plateforme de Recherche en IMAGerie CELLulaire de Normandie)

## Introduction

Plants are constantly exposed to pathogen aggressions, including fungi and bacteria. This can lead to severe disease development and massive agricultural losses. To cope with pathogen attacks, plants have developed different defence mechanisms to ensure their protection. Cell wall is one of the first barriers against pathogens and is mostly composed of polysaccharides and glycoproteins such as the hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs)[1]. Among these HRGPs, extensins are thought to have a structural role, strengthening the cell wall through intra- and/or inter-molecular cross-linking between tyrosine residues thereby limiting pathogen invasion. The cross-linking is catalysed by specific peroxidases and requires correct O-glycosylation on the Serine-(Hydroxyproline)<sub>3,4</sub> motifs with respectively galactoside and oligoarabinoside residues[2,3]. In 2013, Plancot et al.[4] showed that extensins are involved in root response to elicitor. However, their exact role remains to be established.

In this project, we aim to unravel the function of extensins in root defence using specific monoclonal antibodies and selected mutants affected in extensin glycosylation.

## 1. Immunolocalization of extensin epitopes in roots upon Flg22 elicitation



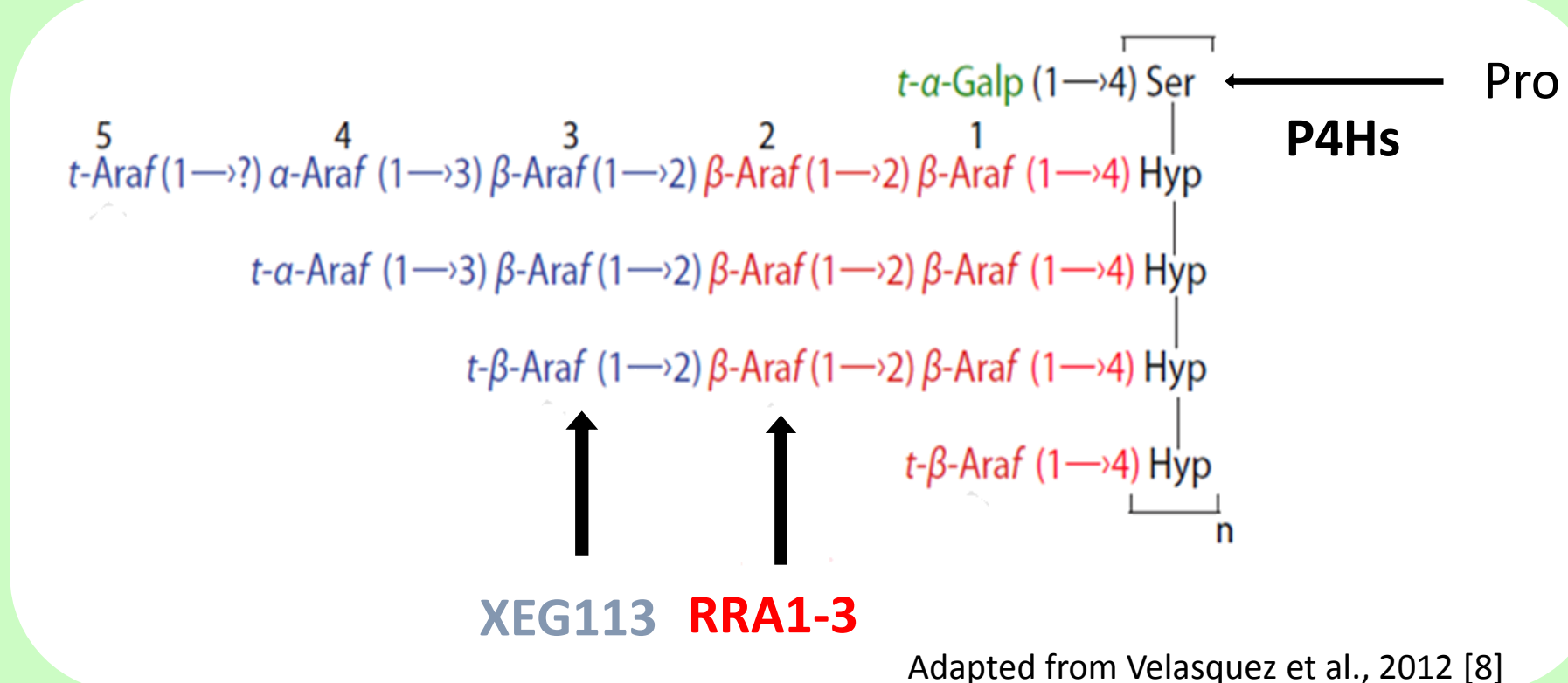
Redistribution of LM1 and JIM11 epitopes upon elicitation

Extensin root response to elicitor is epitope-specific

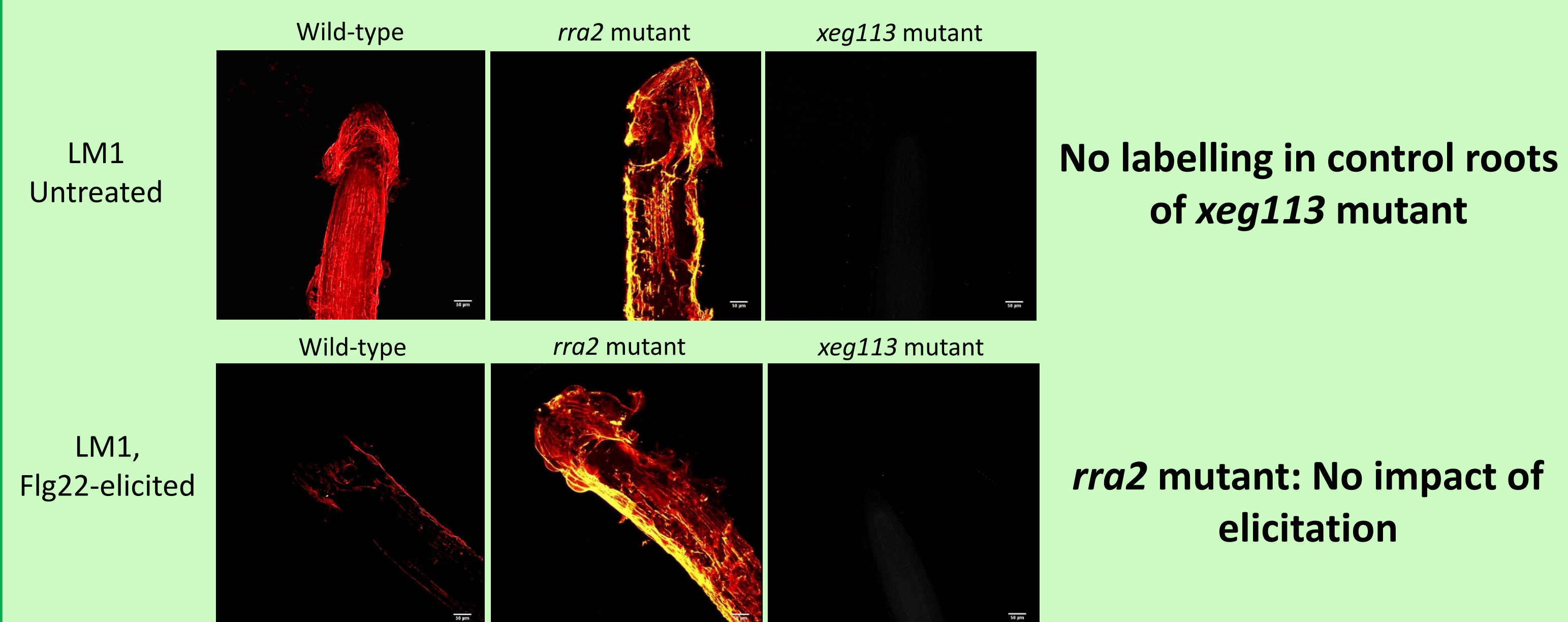
## 2. Selection of mutants affected in extensin glycosylation

Gene	Protein	Gene reference	Reference
RRA1	Arabinosyltransferase which adds the 2 <sup>nd</sup> Arabinose on extensins	At1g75120	Egelund et al., 2007 [5]
RRA2	Arabinosyltransferase which adds the 2 <sup>nd</sup> Arabinose on extensins	At1g75110	Egelund et al., 2007 [5]
XEG113	Arabinosyltransferase which adds the 3 <sup>rd</sup> Arabinose on extensins	At2g35610	Gille et al., 2009 [6]
P4H2	Prolyl-4 hydroxylase which hydroxylates the Prolines	At3g06300	Tiainen et al., 2005 [7]

Glycan structure of extensins

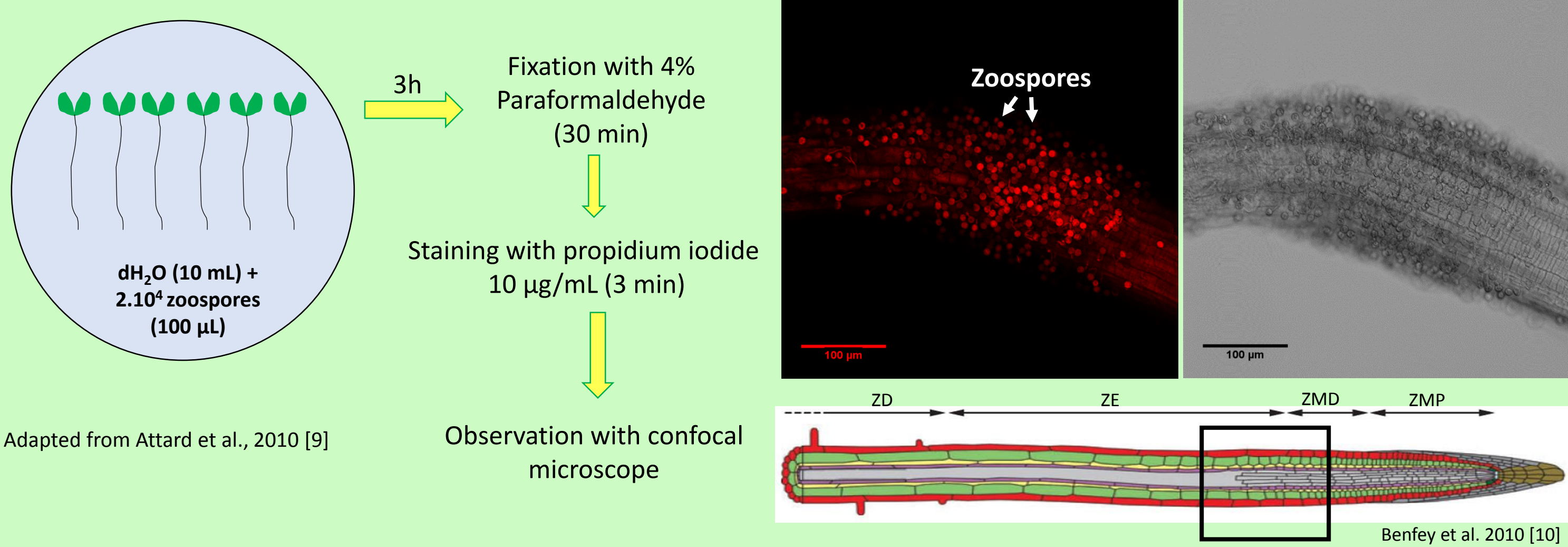


## 3. Immunolocalization of extensin epitopes in roots from the selected mutants



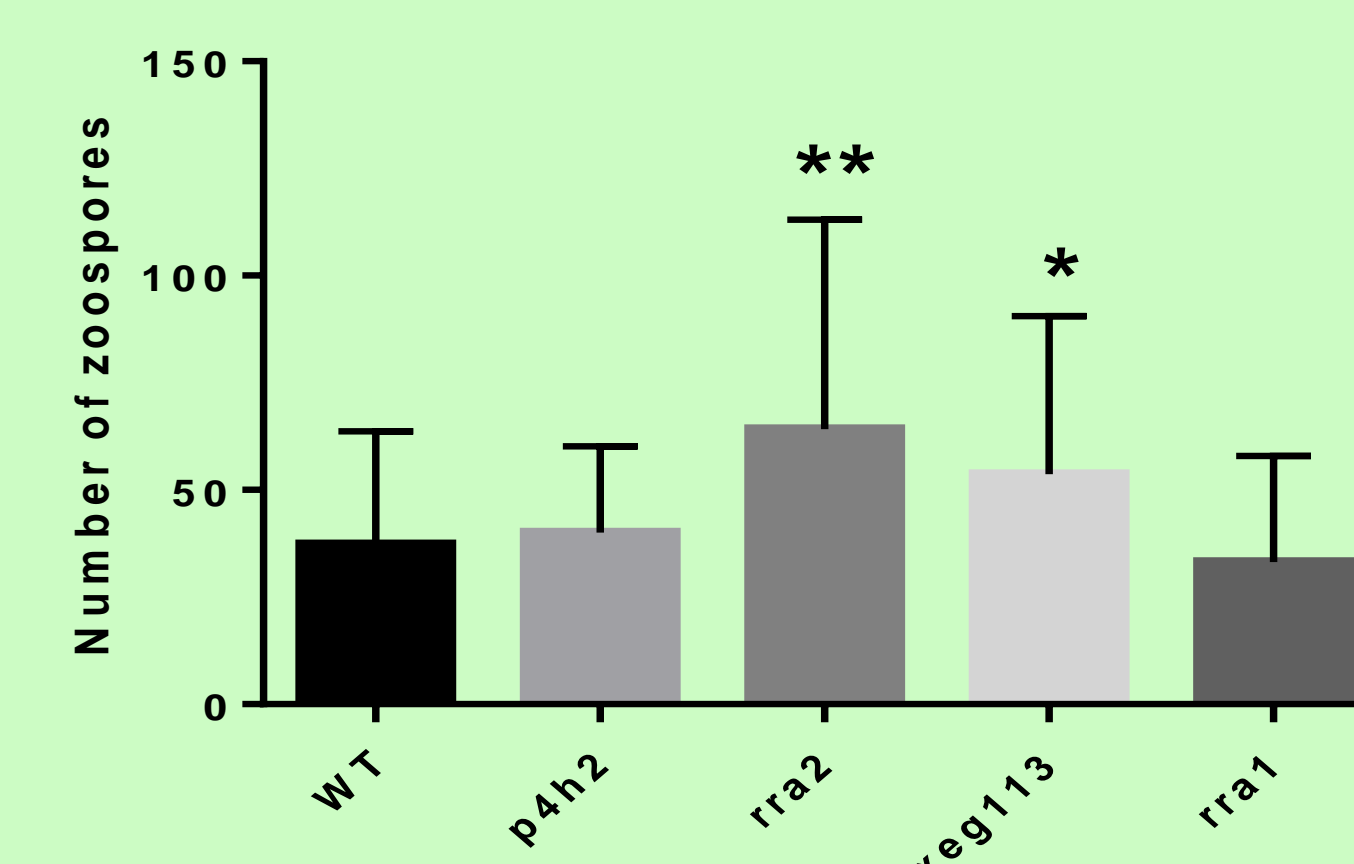
Extensin arabinosylation is involved in response to elicitation and probably in root defence

## 4. Interaction between roots and the soilborne pathogen *Phytophthora parasitica*



Zoospores accumulation occurs specifically between the end of meristematic zone – beginning of elongation zone

## 5. Interaction *P. parasitica* – roots



Number of accumulated zoospores in *Arabidopsis thaliana* root mutants after 3 hours of infection.

Zoospores were counted in a 400 µm long zone between the end of meristematic zone and beginning of elongation zone. Comparison to the WT: t-test with Welch's correction at α=5%.

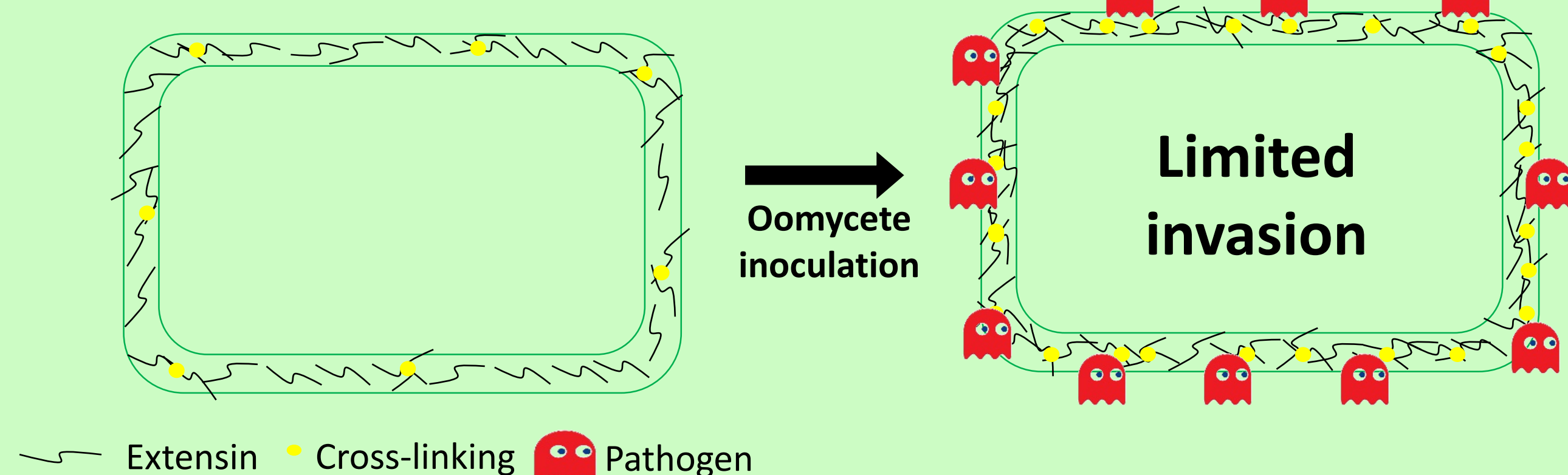
\*: pvalue < 0.05 ; \*\*: pvalue < 0.01

Zoospores accumulation increases in *rra2* and *xeg113* mutants.

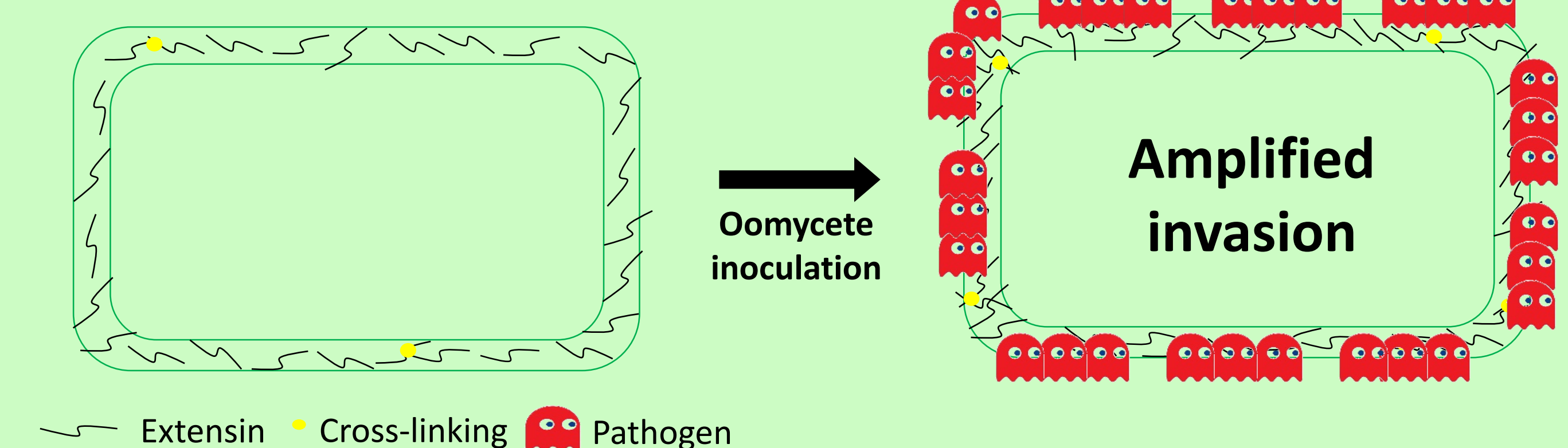
Extensin arabinosylation may contribute to limit colonization of the root by the pathogen

## Conclusion

❖ Extensin correctly arabinosylated



❖ Extensin defective in arabinose



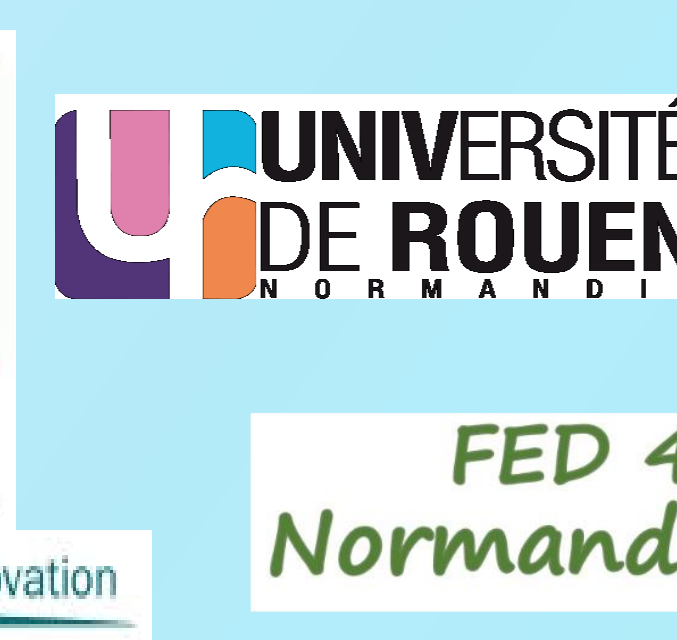
Our model proposes that *P. parasitica* infection induces extensin cross-linking in the cell wall of *A. thaliana*. Arabinosylation of extensins is highly involved in cell wall strengthening, resulting in a reduction of pathogen colonization. The mechanism used by *P. parasitica* for *A. thaliana* root colonization remains to be clearly established. One hypothesis is that electrostatic mechanism could be involved in such interactions. Modification in extensin cross-linking could alter the cell wall charge and then impact root colonization by *P. parasitica*.

## Acknowledgements

This work is supported by la région de Normandie (via the SFR Normandie-Végétal) and by CMI-Groupe Roullier.

## References

- [1] S. Deepak et al. (2010) *Journal of Phytopathology*, **158**, 585-593.
- [2] M. Velasquez et al. (2012) *Frontiers in Plant Science*, **3**, 93.
- [3] Y. Chen et al. (2015) *Biochemistry Insights*, **8**(S2), 1-13.
- [4] B. Plancot et al. (2013) *Plant Physiology*, **163**, 1584-1587.
- [5] J. Egelund et al. (2007) *Plant Molecular Biology*, **64**, 439-451.
- [6] S. Gille et al. (2009) *PNAS*, **106**, 14699-14704.
- [7] P. Tiainen et al. (2005) *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 1142-1148.
- [8] M. Velasquez et al. (2012) *Frontiers in Plant Science*, **3**, 93.
- [9] A. Attard et al. (2010) *New Phytologist*, **187**, 449-460.
- [10] P. Benfey et al. (2010) *The Plant Journal*, **61**, 992-1000.









---

## Résumé

---

Les extensines sont des glycoprotéines pariétales appartenant à la famille des HRGPs (Hydroxy prolin-rich glycoproteins) impliquées dans plusieurs fonctions telles que la croissance, le développement et la défense des plantes contre les pathogènes. Toutefois, leur mode d'action dans la réponse immunitaire végétale n'est pas encore bien connu et reste à élucider. Les extensines interviennent dans le renforcement de la paroi, un des premiers remparts cellulaires contre les pathogènes, en se liant entre elles de manière intra- et intermoléculaire. Ce « cross-linking » est catalysé par des enzymes peroxydases spécifiques et nécessite une correcte conformation des extensines, laquelle est conférée par leur partie glycosylée.

Dans ce projet de thèse, nous avons donc entrepris d'étudier l'impact de la glycosylation des extensines sur la défense racinaire et tenté de caractériser, de manière préliminaire, des peroxydases potentiellement impliquées dans le « cross-linking » chez *Arabidopsis thaliana*. Des techniques d'immunocytochimie réalisées sur une sélection de mutants affectés dans la glycosylation des extensines ont révélé une modulation de la distribution des extensines dans la racine d'*A. thaliana* en réponse à une élicitation avec un peptide bactérien, la flagelline 22. L'un des résultats majeurs de cette étude a été de montrer l'importance de l'arabinosylation des extensines dans la colonisation de la racine par l'oomycète pathogène *Phytophthora parasitica*. Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous a permis d'élaborer un modèle proposant d'illustrer l'importance de l'arabinosylation des extensines dans l'organisation et l'architecture de la paroi, modulant ainsi l'adhésion du pathogène sur les cellules de la racine et influençant *in fine* la colonisation de cette dernière.

**Mots-clés :** extensines, arabinosylation, défense, racine, paroi, glycosylation, éliciteur, *Arabidopsis thaliana*, *Phytophthora parasitica*

---

## Abstract

---

Extensins are cell wall glycoproteins involved in various biological processes including plant protection. However, their mode of action in plant immunity response is not clearly established and remains to be elucidated. Extensins are able to strengthen the cell wall, one of the first cellular barriers against pathogens, through intra- and intermolecular cross-links. This cross-linking is catalysed by specific peroxidase enzymes and requires a correct conformation of extensins conferred by their glycan moiety.

This PhD project aimed to investigate the impact of extensin glycosylation in root defence and to characterize, as a preliminary study, the peroxidases potentially involved in the extensin cross-linking in *Arabidopsis thaliana*. Through immunocytochemistry techniques on mutants impaired with extensin glycosylation, we have revealed that a modulation of extensin distribution occurs in *A. thaliana* root in response to elicitation with the bacterial peptide, flagellin 22. We have also showed that extensin arabinosylation plays a major role, although probably indirect, in the root colonization by the pathogen oomycete *Phytophthora parasitica*. We have therefore elaborated a model proposing to illustrate the importance of extensin arabinosylation in the cell wall organization and architecture, modulating pathogen adhesion on root cells and influencing *in fine* root colonization.

**Keywords:** extensin, arabinosylation, defence, root, cell wall, glycosylation, elicitor, *Arabidopsis thaliana*, *Phytophthora parasitica*