

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

ANALYSE DU PAYSAGE D'ÉPISSAGE ALTERNATIF D'*ARABIDOPSIS THALIANA*

**THÈSE PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE**

**PAR
TEURA BARFF**

Août 2024

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (DOCTORAT)

Direction de recherche :

Hugo Germain Directeur de recherche

David Joly Co-directeur de recherche

Jury d'évaluation

Hugo Germain Directeur de recherche

David Joly Co-directeur de recherche

Tagnon Missihoun Évaluateur interne

Carlos Reyes-Moreno Président du jury

David Morse Évaluateur externe

« Pour assurer cette continuité, il faut que le Polynésien se mette à écrire, c'est la deuxième étape. D'abord il a agi, en construisant son fare, la maison polynésienne. Maintenant il doit écrire et ainsi s'exprimer, peu importe que ce soit en reo mā'ohi, en français ou en anglais.

L'important est qu'il s'exprime. »

Henri Hiro

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais dans un premier temps remercier les membres du jury d'évaluation, Dr Tagnon Missihoun, Dr Carlos Reyes-Moreno et Dr David Morse d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer mes travaux de recherche. J'aimerais ensuite remercier mon co-directeur Dr David Joly pour avoir mis en place les bases sur lesquelles s'est bâti mon projet de recherche ainsi que pour avoir participé à l'élaboration de l'article scientifique qui en a découlé.

Je suis aussi très reconnaissante envers mon directeur de recherche Dr Hugo Germain. Hugo, merci de m'avoir accueilli dans ton laboratoire, de m'avoir soutenu et guidé tout au long de mon doctorat. Au cours de ces 6 dernières années, j'ai eu l'opportunité d'échanger avec des personnes incroyables, le tout dans un environnement stimulant et j'en suis très redevable. Merci pour les échanges formels et informels sur la science et la vie. Enfin, merci d'avoir su persévérer à mes côtés face aux nombreux obstacles que nous avons rencontrés tout au long de ce projet.

Merci à tous les membres passés et présents du laboratoire de Hugo ainsi que d'Isabel. J'ai de la chance d'avoir côtoyé d'aussi bons scientifiques et d'aussi bonnes personnes. Claire, Narimane, Mélodie, Ingrid, Valeria, Snehi, et tout le monde, merci pour votre soutien, pour les fous rires, les larmes et les discussions.

Un remerciement tout particulier à mes parents, Germain et Jasmine Barff qui ont vu leur plus jeune enfant partir à des milliers de kilomètres de son île à l'âge de 17 ans. Merci d'avoir toujours cru en moi. Merci d'avoir fait de moi la femme indépendante que je suis. Tous mes accomplissements ne sont que le reflet de l'enseignement et de l'amour que j'ai reçu en grandissant. Vous avez tant sacrifié pour me donner les clés de la réussite et pour ça, je vous en serai éternellement reconnaissante. J'ai tellement de chance de vous avoir. Je vous aime.

Mateata, ma meilleure amie, ma seule et unique sœur. Merci d'être la personne que tu es. Merci de m'avoir tenu compagnie pendant ces longues heures de trajets vers le laboratoire. Merci de m'écouter et de me soutenir. Enfin, merci d'être la meilleure sœur que j'aurais pu avoir. Je ne serais pas où j'en suis aujourd'hui sans toi. Je t'aime.

Finalement, j'aimerais exprimer mon éternelle gratitude à mon conjoint et ma fille. Romain, tu es le meilleur partenaire de vie que j'aurais pu avoir. Merci pour ton aide au quotidien, avec toi la vie de tous les jours est remplie de bonheur. Merci pour les délicieux repas, les randonnées, les

cafés, discussions scientifiques, les aventures, *etc.* Merci d'avoir été là dans les moments les plus difficiles. Tu es mon rocher, j'ai tellement de chance de t'avoir. Manea, tu as illuminé ma vie et fait de moi une mère. Merci pour ta joie de vivre, tes sourires et tes câlins. Ton arrivée a changé mon regard sur la vie et je t'en remercie. Ce doctorat t'est dédié. Je vous aime plus que tout.

RÉSUMÉ

Les végétaux sont des organismes sessiles qui doivent s'adapter à divers changements environnementaux pour survivre. Pour ce faire, ils disposent de nombreux mécanismes biologiques sophistiqués qui leur permettent de répondre à de nombreux stimuli externes. Parmi les réponses les plus connues on retrouve le processus universel de contrôle d'expression génique. Ce processus permet d'influencer plusieurs voies moléculaires nécessaires à l'adaptation de la plante à divers stress. L'expression génique varie aussi tout au long de la croissance végétale. Elle permet aux plantes d'effectuer les changements requis à chaque étape du développement. Un autre mécanisme important qui est propre aux eucaryotes est l'épissage alternatif. L'épissage alternatif est le processus par lequel un seul gène peut générer de multiples ARN messager (ARNm). La rétention ou l'excision de différents exons et introns participe à la diversification transcriptomique et protéique chez les plantes, les animaux, les champignons, etc. Tout comme l'expression génique, l'épissage alternatif d'ARN va varier en fonction du stade de croissance, mais aussi des conditions environnementales. Il participe grandement à la plasticité développementale des eucaryotes. Il existe donc un lien indéniable entre l'épissage alternatif et la différenciation cellulaire qui est à la base du développement. En effet, de nombreuses études soulignent l'importance du réarrangement du paysage d'épissage alternatif à travers différents types cellulaires, et ce, chez de nombreux organismes. Ainsi, l'épissage alternatif est donc étroitement lié à l'identité cellulaire. Parmi les stress externes auxquels l'épissage alternatif a été lié, on compte notamment le stress biotique. Les plantes disposent d'un système de défense complexe et robuste. Ce système énergivore est strictement régulé à différents niveaux afin d'assurer un équilibre entre la croissance et la défense. L'épissage alternatif intervient à plusieurs étapes de l'immunité végétale. Une autre observation intéressante est que les réponses de défenses à l'infection par un microorganisme sont aussi connectées à l'identité cellulaire. Plusieurs équipes ont répertorié des différences au niveau de la réponse immunitaire en fonction du tissu, mais aussi du type cellulaire. Ces observations suggèrent que chacun de ces processus est interconnecté et qu'ils interagissent ensemble pour maintenir l'équilibre biologique nécessaire à la croissance et à l'adaptation aux stress environnementaux des plantes.

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de ce doctorat visent à connecter trois processus majeurs; l'épissage alternatif, l'identité cellulaire et l'immunité végétale. Pour ce faire, nous avons mis au point une technique d'extraction de protoplastes et de triage de cellules en fonction de leur identité. Les protoplastes de différents plants transgéniques d'*Arabidopsis thaliana*

exprimant une protéine fluorescente sous le contrôle de promoteurs spécifiques au type cellulaire ont été extraits. Ces protoplastes ont ensuite été triés par cytométrie en flux et utilisés afin d'en extraire l'ARN. Le séquençage à haut débit de ces ARN a permis de dresser le profil d'expression génique et d'épissage alternatif dans 11 types cellulaires différents venant d'organes aériens et racinaires.

L'analyse d'expression génique et d'épissage alternatif spécifique au type cellulaire a identifié 2984 gènes différentiellement transcrits et 718 gènes différentiellement épissés. La comparaison de ces deux processus indique qu'ils sont tous deux régulés de manière indépendante. Cette analyse a permis de confirmer que l'épissage alternatif participe grandement à moduler l'identité cellulaire. Enfin, nous avons souligné l'impact de l'épissage alternatif sur l'immunité de manière spécifique au type cellulaire. Cette étude a identifié plusieurs gènes liés à l'immunité étant différentiellement épissés et transcrits en fonction du type cellulaire. Cette observation nous a permis d'établir l'importance de l'épissage alternatif dans le maintien de l'équilibre entre la croissance et l'immunité. Nous avons aussi pu observer l'impact jusque-là insoupçonné de l'épissage alternatif dans les cellules de la columelle.

En général, à travers nos travaux de recherche nous avons établi un procédé expérimental qui permet l'extraction de différents types cellulaires, et ce, sans affecter leur identité. Cette étude a aussi permis de construire une base de données d'épissage alternatif et de transcriptomique de qualité. Cette base de données est une des premières qui regroupe 11 types cellulaires aussi bien d'organes racinaires que aériens, ayant été extraits suivant le même processus expérimental. De plus, cette étude ouvre de nombreuses perspectives intéressantes quant à la caractérisation de nouveaux isoformes candidats.

Mots-clés : Épissage alternatif, transcriptomique, identité cellulaire, immunité végétale, *Arabidopsis thaliana*

TABLES DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	v
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xi
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1.1. L’immunité végétale	1
1.1.1 Les plantes et la maladie.....	1
1.1.2 La réponse de défense	2
1.1.2.1 L’immunité induite par les PAMPs.....	2
1.1.2.2 L’immunité induite par les effecteurs.....	6
1.2 L’expression génique	8
1.2.1 L’initiation de la transcription	8
1.2.3 La terminaison.....	10
1.2.4 La régulation de la transcription.....	11
1.3 L’épissage alternatif	12
1.3.1 Le mécanisme d’épissage	16
1.3.2 Régulation de l’épissage alternatif	18
1.3.2.1 Les facteurs d’épissage.....	19
1.3.2.2 L’épigénétique.....	22
1.3.3 L’épissage alternatif et le développement végétal.....	22
1.3.3.1 Les méristèmes	24
1.3.4 L’épissage alternatif et les stimuli externes.....	28
1.3.4.1 Stress abiotique.....	29
1.4 L’identité cellulaire, l’épissage alternatif et l’immunité; trois pans majeurs	31
1.4.1 L’épissage alternatif et l’identité cellulaire.....	31
1.4.2 L’immunité et l’identité cellulaire.....	33
1.4.3 L’épissage alternatif et l’immunité végétale	35
1.5 Hypothèse et objectifs	40
CHAPITRE II: Comprehensive mapping of Arabidopsis alternative splicing landscape reveals key insights into plant development and immunity	41
2.1 Contributions des auteurs	41
2.2 Résumé de l’article	41
2.3 Article	43

Abstract	44
Introduction	45
Methods	47
Plant material and growth conditions	47
Protoplast extraction.....	48
Confocal microscopy.....	48
Fluorescence Activated Cell Sorting	48
RNA isolation and sequencing	49
RNA-seq Data Analysis	49
Alternative splicing analysis.....	49
Differential gene expression assessment	50
GO term analysis	50
Results	50
Cell type identity is conserved upon cell sorting.....	50
Gene expression is uncoupled from alternative splicing	53
Cell identity shapes the need for transcription or alternative splicing regulation	54
Direction of gene expression and AS regulation is dependent on cell identity and function.	56
Differential splicing of immunity-related genes is cell type-specific.....	57
Discussion	61
Alternative splicing regulation is independent from transcription	62
Alternative splicing shapes cell identity.....	62
Alternative splicing, cell identity, and immunity associated genes are interconnected	64
Columella cells defense system is regulated through alternative splicing.....	64
Acknowledgements	66
References	67
CHAPITRE III : DISCUSSION.....	89
3.1 L'épissage alternatif et la transcription, deux processus indépendants.	90
3.2 L'identité cellulaire et l'épissage alternatif.....	93
3.3 L'épissage alternatif: un pont entre l'immunité et le développement végétal	96
CHAPITRE IV : PERSPECTIVES, LIMITATIONS ET CONCLUSION	102
RÉFÉRENCES	104
ANNEXE A : EXPRESSION DE MTURQUOISE2 DANS LES RACINES.....	125
ANNEXE B: TRIAGE DE PROTOPLASTES.....	126
ANNEXE C : L'IDENTITÉ CELLULIARE EST CONSERVÉE.....	127

ANNEXE D : ANALYSE FONCTIONNELLE SUPPLÉMENTAIRE.....	128
ANNEXE E : IMPACT SUR LES PROTÉINES	129
ANNEXE F: VARIANTS D'ÉPISSAGE LIÉS À L'IMMUNITÉ.....	130

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 L'immunité végétale.	5
1.2 L'initiation de la transcription.	9
1.3 L'étendue de l'impact de l'épissage alternatif.	12
1.4 Les différents types d'évènements d'épissage.	14
1.5 La dégradation d'ARNm via la voie de NMD.	16
1.6 : Le processus d'épissage.	17
1.7 Le méristème apical de la tige.	26
1.8 Le méristème apical racinaire.	27

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ABA: Acide abscissique
ABI3: Abscisic Acid Insensitive 3
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADR1: Activated Disease Resistance 1
ALTA : Site d'accepteur alternatif
ALTD : Site donneur alternatif
ARC : Apaf-1, R protéine et CED4
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : ARN messenger
AtRTD3: *Arabidopsisthaliana* Reference Transcript Dataset 3
BAK1: Brassinosteroid Insensitive Associated Kinase 1
BC:Border-likeCells
BIK1: Botrytis-Induced Kinase 1
CBP60g: CAM-BINDING PROTEIN 60-LIKE G
CC: Coiled-coil
CDPK: Calcium-dependentProtein Kinases
CERK1: Chitin Elicitor Receptor Kinase1
CLV3 :Clavata 3
CNGC: Cyclic Nucleotide-gated Channels
CPK28: Calciumdependent Protein Kinase 28
DAMP : Motifs moléculaire associé au dommage cellulaire
DREB2A: Drought Response Element Binding protein 2A
EDS1: ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1
EFR: EF-Tu Receptor
ETI : Immunité induite par les effecteurs
FLC:*Flowering Locus C*
FLS2: Flagellin Sensing 2
GRP7: Glycine-richProtein 7
GSL5: Glucan Synthase-Like 5

HAB1: Hypersensitive To Aba1
hnRNP: ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires
HR: Réponse d'hypersensibilité
HSF: Heat Shock transcription Factors
LPS: lipopolysaccharides bactériens
LRR: Leucine Rich Repeat
LYK5: Lysin motif receptor kinase 5
LysM: PRR avec un domaine extracellulaire avec un motif en lysine
MAPK: Mitogen-activated Protein Kinases
MDF: Meristem Defective
ML1: Meristem Layer 1
uORF : micro ORF
MXE : les exons mutuellement exclusifs
NB : Domaine central de liaison aux nucléotides des NB-LRR
NB-LRR: Nucleotide binding, Leucine-Rich repeat
NMD: *nonsense-mediated mRNA decay*
NRG1: N requirement gene 1
PAD4: Phytoalexin Deficient 4
PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PastDB : *Plant alternative splicing and transcription Data Base*
PLT: Apetala2 Plethora
Pol II : l'ARN polymérase II
pré-ARNm: ARNm prématures
PRMT5: Protein Arginine Methyltransferase 5
PRR: Pattern Recognition Receptor
PTC : codon STOP prématuré
PTI: Immunité induite par les PAMPs
RAM: Méristème apical racinaire
RBOHD: NADPH/respiratory burst oxidase protein D
RDM16: Rna-directed DNA METHYLATION 16
RI : La rétention d'intron
RIN4: RPM1 interacting protein 4

RLK: Receptor-like kinases
RLP: Receptor-like proteins
ROS: Espèces réactives de l'oxygène
RPM1: Resistance To *P. Syringae* Pv *Maculicola* 1
RPS2: Resistance to *P. syringae* 2
RPS4: Resistance to *P. syringae* 4
RPW8: Resistance to Powdery Mildew 8
RS : domaine enrichi en Sérines et Arginines de protéines SR
SAM: Méristème apical tige
SARD1: SAR DEFICIENT1
SART: Squamous Cell Carcinoma Antigen Recognized By T Cells 1
SCR: Scarecrow
SE : Le saut d'exon
SHR: Short-root
SKIP: Ski-interacting Protein
snRNP: Petites ribonucléoprotéines
STA1: Stabilized1
STM: Shoot Meristemless
TIR: Toll and Interleukin-1 receptors
U1-70K: U1 snRNP-specific protein 70K
U2AF : Facteur auxiliaire de U2
UFO: Unusual Floral Organs
Vast-tools: Vertebrate Alternative Splicing and Transcription Tools
VvPMAs: *Vitis vinifera* PM H⁺-ATPase
WOX5: Wuschel Related Homeobox 5
WUS : Wuschel
ZIFL1: Zinc-Induced Facilitator-Like 1

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Les plantes sont des organismes eucaryotes pluricellulaires capables de photosynthèse. Leur culture constitue la première source d'aliments au niveau mondial et représente jusqu'à 700 milliards de dollars de revenus par an au Canada (Statistique Canada, 2023). Leur étude est donc primordiale afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans leur croissance et la façon dont elles s'adaptent aux stress environnementaux. Les travaux de recherches présentés ici connectent trois pans majeurs de la biologie végétale; l'immunité des plantes, l'épissage alternatif ainsi que l'identité cellulaire. Ces trois processus sont donc décrits séparément, puis ensemble dans les prochains paragraphes.

1.1. L'immunité végétale

1.1.1 Les plantes et la maladie

Les végétaux sont des organismes complexes qui doivent s'adapter à une gamme de changements environnementaux très variés afin de subsister. Les stress végétaux se classifient en deux catégories. Le stress abiotique regroupe les changements de températures brusques, le vent, la grêle, les variations de pH, les concentrations toxiques de minéraux et autres composés des sols, etc. Le stress biotique représente toutes les interactions néfastes avec un être vivant. Il a été estimé que chaque espèce cultivée possède entre 200 à 500 espèces nuisibles (North American Plant Protection Organization, 2020). On évalue que 40 % des pertes de récoltes mondiales sont associées à ces organismes nuisibles (FAO, 2024). L'étude de l'immunité végétale est donc importante pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'interaction entre un plant et un agent phytopathogène. Les agents phytopathogènes représentent un très large spectre d'organismes tels que les bactéries, virus, oomycètes, nématodes, champignons ou encore les parasites. Parmi les agents phytopathogènes importants, on compte notamment, les champignons du genre *Fusarium* qui causent différents types de fusariose et provoquent généralement des symptômes de moisissure et décomposition. Les champignons de ce genre sont responsables de jusqu'à 10% des pertes de blé et de maïs à travers le monde. Un autre exemple important d'agent phytopathogène est *Rhizoctonia solani* qui est l'agent causal de la brûlure du riz et qui lui aussi, engendre jusqu'à 10% des pertes de riz au niveau mondial (Savary *et al.*, 2019).

Afin de résister à l'infection par un organisme pathogène, les plantes ont donc développé un système de défense sophistiqué et efficace. Ce système repose sur de multiples mécanismes moléculaires et voies de signalisations mis en place afin de maintenir la résistance. Dans les prochains paragraphes, nous allons discuter de ces différents processus plus en détails.

1.1.2 La réponse de défense

Le système immunitaire végétal représente plusieurs mécanismes différents qui convergent tous vers un but commun; la résistance. Au-delà des barrières physiques que les microorganismes doivent contourner ou abattre, ceux-ci font ensuite face à des mécanismes qui peuvent être regroupés en deux grandes étapes; l'immunité induite par les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs) et l'immunité induite par les effecteurs (ETI). Ces deux voies de défense se différencient en majeure partie par la nature de la molécule qui élicite leur déclenchement. L'immunité induite par les PAMPs (PAMPs-Triggered Immunity, PTI) repose sur la détection des PAMPs par des récepteurs transmembranaires, les PRR (Pattern Recognition Receptor). Les PAMPs sont essentiellement détectés dans l'apoplaste et représentent des motifs couramment retrouvés chez les microorganismes tels que des composantes de la paroi des champignons (chitine) ou des bactéries (flagelline, lipopolysaccharide). La ETI, comme son nom l'indique est déclenchée par la détection d'effecteurs. Les effecteurs sont des protéines sécrétées dans le cytosol ou dans l'apoplaste végétal par les agents pathogènes durant l'infection. Leurs fonctions peuvent être très variées, mais ont pour but commun d'augmenter la virulence du pathogène et de favoriser sa propagation et sa pérennité dans la plante hôte. Ces deux mécanismes comportent beaucoup de différences, mais aussi de similarités que nous allons aborder ci-dessous.

1.1.2.1 L'immunité induite par les PAMPs

Une des premières étapes de la réponse de défense moléculaire repose sur la détection du micro-organisme. Cette détection repose principalement sur les PRR. Ces récepteurs membranaires vont donc spécifiquement cibler une variété de PAMP. Les PRR peuvent être divisés en deux classes principales, les receptor-like kinases (RLK) et les receptor-like proteins (RLP). La différence majeure entre ces deux types de récepteurs est la présence ou l'absence d'un domaine kinase

intracellulaire (Noman *et al.*, 2019). Une des interactions de PRR et PAMP les plus étudiée est celle du peptide dérivé de la flagelline flg22 par la Flagellin Sensing 2 (FLS2). FLS2 fait partie de la classe des PRR qui possède un domaine extracellulaire LRR (Leucine Rich Repeat) qui va interagir avec flg22. FLS2 interagit notamment avec la kinase transmembranaire Brassinosteroid Insensitive Associated Kinase 1 (BAK1). Une fois flg22 détecté par FLS2, BAK1 est activée par phosphorylation et va à son tour phosphoryler des récepteurs kinases cytosoliques tel que Botrytis-Induced Kinase 1 (BIK1) ce qui induit par la suite une cascade de signalisation et l'activation de la PTI (Schulze *et al.*, 2010; Bonardi *et al.*, 2012). BAK1 agit aussi en tant que co-récepteur pour d'autres PRRs, tel que le récepteur EF-Tu Receptor (EFR) qui est responsable de la détection d'un fragment du facteur d'élongation bactérienne EF-Tu (Zipfel *et al.*, 2006). D'autres PRRs possèdent un domaine extracellulaire avec un motif en lysine (LysM), comme AtLYM1/3 qui détecte les lipopolysaccharides bactériens (LPS). AtLYM1/3 fonctionne notamment avec le co-récepteur Chitin Elicitor Receptor Kinase1 (CERK1) (Willmann *et al.*, 2011). CERK1 agit aussi avec LYK5 afin de repérer la présence de chitine (Ayako *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2014) (Fig 1.1).

Une fois la présence d'agents pathogènes détectée, une pléthore de voies métaboliques est enclenchée. L'activation de récepteurs kinases cytosoliques tels que BIK1 permet notamment l'activation de ces différents processus. Un des mécanismes de défense engendré est la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'apoplaste. Cette production est médiée par la NADPH oxydase RBOHD (Respiratory Burst Oxidase Protein D). Il a été montré que BIK1 phosphoryle directement RBOHD suite à sa propre activation, menant ainsi à l'explosion oxydative qui ralentit la propagation d'agents pathogènes dans la plante (Kadota *et al.*, 2015). En plus du stress oxydatif, la détection de PAMPs induit aussi un influx de calcium dans le cytosol de la cellule hôte. Cet influx active notamment les kinases dépendantes au calcium (Calcium-dependent Protein Kinases, CDPKs) qui peuvent entre autres contrôler l'expression de gènes reliés à la défense (Bhar *et al.*, 2023). Là encore, BIK1 est capable de phosphoryler les canaux Cyclic Nucleotide-gated Channels (CNGC), CNGC2 et CNGC4 qui sont tous les deux nécessaires à l'influx calcique (Tian *et al.*, 2019a) (Fig. 1.1).

La synthèse de callose est aussi régulée en réponse à la détection de PAMPs et de DAMPs (Wang *et al.*, 2021). Ce polysaccharide de β -(1,3)-D-glucane est synthétisé par la callose synthase Glucan Synthase-Like 5 (GSL5) durant la réponse de défense (Jacobs *et al.*, 2003). Son accumulation entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire au site d'infection agit en tant que barrière physique (Voigt, 2014). De plus, l'accumulation de callose au niveau du

plasmodesme régule son ouverture. Les plasmodesmes sont des jonctions symplastiques entre les cellules, qui permettent le transport de diverses molécules (Amsbury *et al.*, 2018). Ces jonctions sont aussi détournées par les virus à des fins de propagation (Lee and Lu, 2011). L'accumulation de callose au niveau des plasmodesmes permet ainsi de diminuer cet effet, ce qui en fait une cible d'intérêt pour les agents phytopathogènes. Ainsi, certains effecteurs ciblent les plasmodesmes dans le but de les maintenir ouverts, comme c'est le cas de Mlp37347 ; un effecteur fongique de *Melampsoralarici-populina* (Rahman *et al.*, 2021).

Une autre voie qui permet l'expression de gènes reliés à la défense est la cascade des Mitogen-activated Protein Kinases (MAPK). On retrouve deux types de cascades de MAPK impliquées dans la réponse de défense. La première est composée de la MAP kinase kinase kinase, MEKK1, des MAP kinase kinases MKK1 et MKK2, et enfin de la MAP kinase MPK4. La seconde serait composée de MAPKKK3/5, de MKK4 et MKK5, puis de MPK3 et MPK6 (Meng and Zhang, 2013; Bi *et al.*, 2018). L'activation de ces deux cascades mène à la phosphorylation de facteurs de transcription tels que ceux de la famille des WRKY. WKRY33 par exemple est phosphorylé par MPK3/6 en réponse à l'infection par *Botrytis cinerea* et déclenche la biosynthèse de camalexine ou encore d'éthylène (Liu and Zhang, 2004; Mao *et al.*, 2011).

Ensemble, tous ces mécanismes représentent la première réponse de défense dite basale. Elle est généralement suffisante pour arrêter la propagation d'un microorganisme non spécialisé.

Cependant, chaque étape de la PTI peut être ciblée et compromise lors d'une infection par un agent pathogène spécialisé. Les agents pathogènes dis spécialisés sont capables de sécréter des protéines dans le cytosol qui vont donc viser différents processus dans la cellule hôte. Comme mentionné ci-dessus, ces protéines ont été baptisées effecteurs. Les effecteurs peuvent cibler une gamme de processus très variés en fonction de l'agent pathogène d'origine. Ils sont sécrétés dans l'apoplaste ou dans le cytosol des cellules végétales via le système de sécrétion de type 3 pour les bactéries, par l'haustorium pour les champignons ou encore par le stylet pour les nématodes et certains arthropodes tels que les pucerons. AvrPto de *Pseudomonas syringae* est un exemple d'effecteur qui interagit avec FLS2 et EFR pour inhiber le déclenchement de la PTI (Xiang *et al.*, 2008). XopAC est un effecteur de *Xanthomonas campestris* qui inhibe l'activité kinase de BIK1 par uridylylation (Feng *et al.*, 2012). Ainsi, les agents phytopathogènes ont évolué pour échapper à la PTI. Pourtant, beaucoup de plantes sont encore capables de résister à la présence d'effecteurs. Dans le prochain paragraphe, nous allons détailler le processus par lequel les plantes hôtes sont capables d'y survivre.

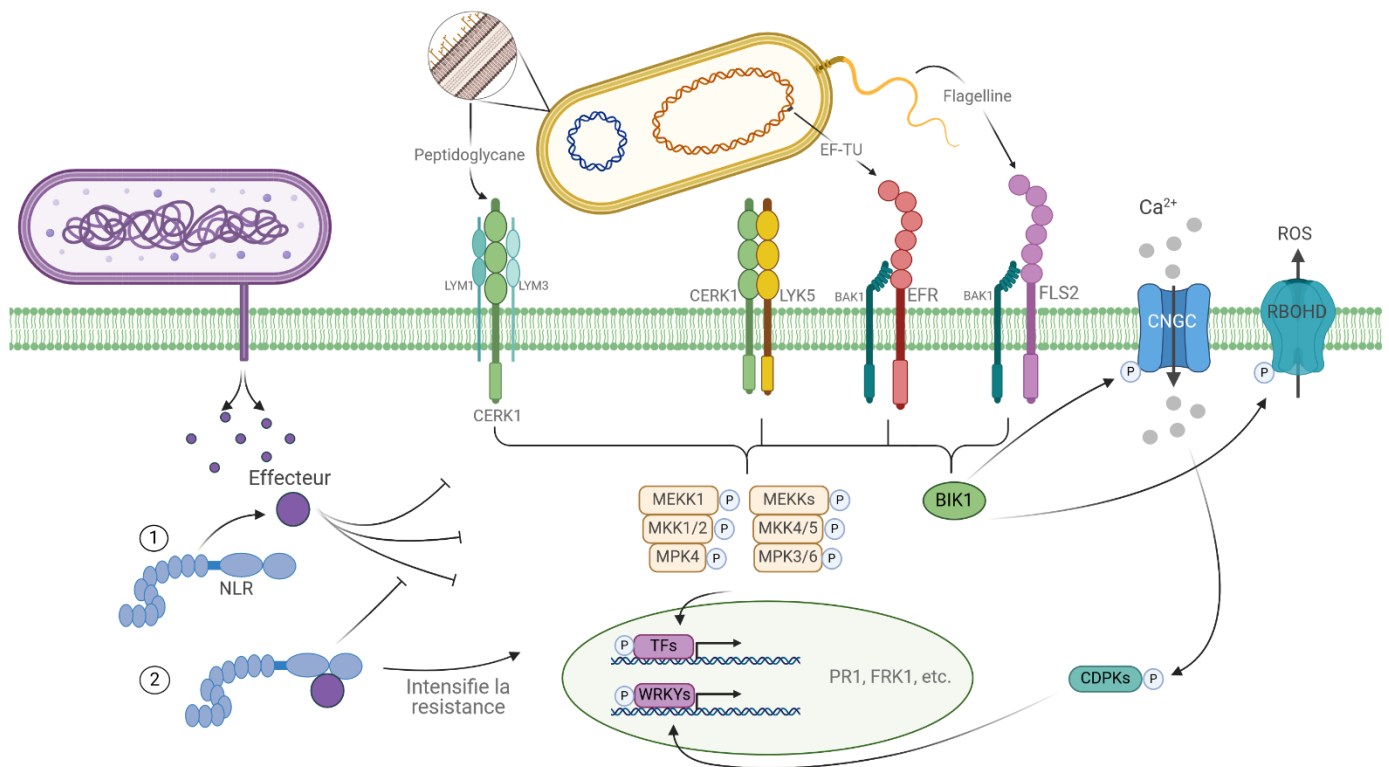


Figure 1.1: L'immunité végétale.

Représentation des étapes majeures de la PTI et de la ETI. Les PRR, FLS2 et EFR sont responsables de la détection du peptide de flagelline flg22 et du facteur d'élongation Tu (EF-TU), respectivement. Ces deux PRRs sont couplés au co-récepteur BAK1 qui phosphoryle les récepteurs cytosoliques en aval. CERK1 couplé à LYK5 interagissent avec la chitine, tandis que CERK1 couplé à LYM1 et LYM3 perçoivent le peptidoglycane bactérien. Une fois la présence de microorganismes détectés, les cascades de signalisation des MAP kinases sont enclenchées, menant ensuite à l'expression de gènes liés à la défense. L'activation de BAK1 phosphoryle aussi le récepteur cytosolique BIK1 qui phosphoryle à son tour RBOHD ainsi que des canaux calciques CNGC. Leur phosphorylation permet l'explosion oxydative et l'influx de calcium. La présence de calcium dans la cellule active entre autres des kinases dépendantes au calcium (CDPK) qui médient eux aussi l'expression de gènes de défense. Les micro-organismes spécialisés sont capables de sécréter des effecteurs dans le cytosol de la cellule hôte. Ces effecteurs peuvent notamment inhiber plusieurs étapes de la PTI. Les protéines NLR ont pour rôle de détecter la présence d'effecteurs (1) et d'inhiber leur action (2).

1.1.2.2 L'immunité induite par les effecteurs

Dans une course à l'armement évolutive, les plantes ont, elles aussi développé la capacité d'exprimer des protéines de résistance (protéines R). Ces récepteurs internes ont pour rôle de détecter les effecteurs. Dû à leurs domaines hautement conservés, elles sont nommées protéines NB-LRR (Nucleotide binding, Leucine-Rich repeat) ou NLR. Les gènes codant pour les NB-LRR forment une des familles les plus abondantes du royaume végétal (Collier and Moffett, 2009). Elles sont composées d'un domaine central de liaison aux nucléotides (NB), d'un domaine ARC (Apaf-1, R protéine et CED4), les deux forment la partie conservée des NB-LRR. Enfin le domaine riche en répétitions de leucines (LRR) représente la partie plus variable de ces protéines (Collier and Moffett, 2009). Ces protéines peuvent être séparées en plusieurs classes en fonction de leur domaine en N-terminal. C'est ainsi que l'on distingue les NB-LRR avec en N-terminal un domaine prédit d'adopter une forme en Coiled-coil (CC), ou d'être un homologue de Toll and Interleukin-1 receptors (TIR) (Meyers *et al.*, 1999). Mis à part la forme prédite en CC de leur domaine en N-terminale, les CC-NB-LRR possèdent peu de similarités de séquences entre elles. Le motif « EDVID » est le seul trait apparent que les CC-NB-LRR ont en commun. Cependant, il existe aussi une sous-classe de CC-NB-LRR pour lesquels ce motif est absent : les non-EDVID CC-NB-LRR. Un bon exemple de non-EDVID CC-NB-LRR est NRG1 (N requirement gene 1) qui fait partie d'une sous classe de CC-NB-LRR, les CC_R-NB-LRR. Les CC_R-NB-LRR (qui doivent leurs noms à leur ressemblance avec RPW8) forment une classe atypique de NB-LRR auxiliaires (Meyers *et al.*, 2003). Leur fonction semble être nécessaire à la voie de signalisation menant au déclenchement de la ETI, plutôt qu'à la détection d'effecteur en tant que tel (Peart *et al.*, 2005; Bonardi *et al.*, 2011; Collier *et al.*, 2011).

Comme mentionné précédemment, les protéines NB-LRR ont pour rôle la détection de protéines sécrétées par les agents pathogènes (Fig 1.1). Pour ce faire, les NB-LRR peuvent interagir directement avec l'effecteur. C'est le cas de l'Avr-Pita1 de *Magnaporthe grisea*, un champignon infectant le riz et la protéine NB-LRR lui correspondant : Pi-ta. Après sa translocation dans le cytosol de la cellule hôte, Avr-Pita1 se lie directement au domaine LRD de Pi-ta, ce qui initie la ETI (Jia *et al.*, 2000; Orbach *et al.*, 2000). Il existe aussi une méthode de détection d'effecteur indirecte, faisant alors intervenir un cofacteur. L'interaction indirecte de AvrRpt2 de

Pseudomonas et RPS2 (Resistance to *P. syringae*) d'*Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) est un des exemples les plus étudiés. Dans ce cas, la protéine RIN4 (RPM1 interacting protein 4) joue le rôle de cofacteur. Grâce à son activité cystéine protéase, AvrRpt2 va cliver RIN4. C'est la forme clivée de RIN4 qui permet l'activation de RPS2 (Day *et al.*, 2005). Enfin, un certain nombre d'effecteurs s'avèrent être reconnus non pas par une protéine R, mais plutôt par une paire de NB-LRR. Ainsi les protéines Avr-Pia et Avr-CO39 de *Magnaporthe oryzae* sont toutes les deux reconnues par la paire RGA4 et RGA5, deux CC-NB-LRR du riz. Dans ce modèle, RGA4 et RGA5 assurent deux fonctions différentes. RGA4 permet d'enclencher une réponse de défense tel que la mort cellulaire localisée, et ce de manière constitutive. RGA5 a pour rôle de réprimer l'induction constitutive de RGA4 en absence d'agent pathogène (Césari *et al.*, 2014).

L'activation de protéines NB-LRR par un effecteur reconnu enclenche ensuite une réponse de défense robuste et efficace nommée la ETI. Malgré de grandes divergences au niveau de la durée ainsi que de la magnitude des réponses qui sont enclenchées durant la PTI et la ETI, les deux voies de défenses induisent des phénomènes similaires (Tao *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2004). Par exemple, l'activation de RPM1 (Resistance To *P. syringae* pv *maculicola* 1) mène aussi à un influx calcique (Peng *et al.*, 2018). Les deux mécanismes ont en commun des kinases dépendantes au calcium (CDPK). CDPK4, CDPK5, CDPK6 et CDPK11 sont impliquées dans la production de ROS induite par la présence de flg22 (Boudsocq *et al.*, 2010). Similairement, CDPK5 et CDPK6 sont nécessaires à la mise en place de la ETI, puisque la délétion de ces deux kinases réduit drastiquement la résistance médiée par RPS2 et RPM1 (Gao *et al.*, 2013). De plus, SARD1 (Sar Deficient1) et CBP60g (Cam-Binding Protein 60-Like G) sont deux facteurs de transcription affectant aussi bien la PTI que l'ETI. Ces deux protéines régulent directement l'expression de nombreux acteurs clés de l'immunité tel que BAK1, BIK1, MEKK1, MKK4, MPK3, et CDPK4 pour la PTI et EDS1 (Enhanced Disease Susceptibility 1), PAD4 (Phytoalexin Deficient 4), ADR1 (Activated Disease Resistance 1) pour la ETI (Sun *et al.*, 2015). Une des différences majeures entre les deux réponses est la mort cellulaire localisée ou réponse d'hypersensibilité (HR) qui est spécifique à la ETI. La HR permet ainsi de restreindre la propagation d'agent pathogène dans la plante hôte. Malgré certains points divergents, il est juste d'affirmer que la ETI et PTI convergent en plusieurs points, le tout menant à la résistance.

En plus de ces deux systèmes, les plantes disposent aussi de plusieurs autres méthodes de défense que nous n'allons pas aborder, mais qui sont documentées ailleurs (Aerts *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2022). Parmi ces mécanismes, on compte le système d'ARN interférant et le recours à l'utilisation d'hormones afin de médier cette réponse à travers la plante.

1.2 L'expression génique

L'expression génique représente le phénomène de sélection d'un gène et de sa transcription en ARNm. La transcription est assurée par les ARN polymérases. Les plantes possèdent jusqu'à 5 ARN polymérases, mais la transcription d'ADN en ARNm est principalement assurée par l'ARN polymérase II (Pol II) (Guilfoyle and Dietrich, 1987). La transcription peut être divisée en trois grandes étapes; l'initiation, l'élongation et la terminaison.

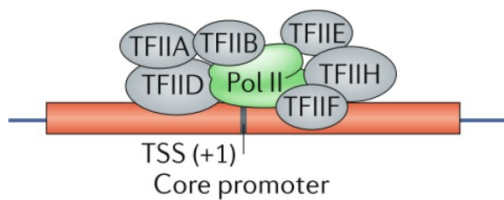
1.2.1 L'initiation de la transcription

L'initiation de la transcription est une des étapes les plus régulées de la transcription car c'est là que la sélection de gènes à transcrire se produit. Cette sélection façonne le profil d'expression génique de la cellule au complet. L'initiation est médiée par l'intervention de facteurs de transcription qui aident notamment à la détection et la sélection du promoteur, à la séparation des deux brins d'ADN et au début de l'élongation. Les eucaryotes possèdent un ensemble de facteurs de transcription généraux qui sont impliqués dans l'initiation de la transcription par la Pol II nommés TFII.

L'initiation commence par la formation du complexe de pré-initiation. Ce complexe est initié par la détection du promoteur cœur qui est composé de motifs conservés à travers le génome. Chez les plantes, le promoteur cœur est composé de la boîte TATA positionnée à environ 30 nucléotides en amont du site de début de la transcription, mais aussi de l'initiateur; un motif chevauchant ce même site (Molina and Grotewold, 2005; Yamamoto *et al.*, 2007). La détection du promoteur cœur est faite par TFIID et est assistée de TFIIA. L'interaction avec TFIID provoque aussi la distorsion de l'ADN qui permet le recrutement d'autres facteurs pour former le complexe de pré-initiation (Kim *et al.*, 1993; Burley and Roeder, 1996; Cianfrocco *et al.*, 2013). S'ensuit le recrutement de TFIIB, TFIIF, de la Pol II et de TFIIIE au promoteur qui ensemble forment le complexe intermédiaire de pré-initiation. Enfin, TFIIH est le dernier des TFII à se joindre et forme alors le holocomplexe de pré-initiation. TFIIH sépare les deux brins d'ADN et phosphoryle le domaine C-terminal de la Pol II qui cause sa dissociation du holocomplexe de pré-

initiation et initie l'élongation (Haberle and Stark, 2018; Chen *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2023). Bien que ce modèle n'ait pas encore été démontré chez les plantes, plusieurs homologues de ces facteurs ont été identifiés chez *Arabidopsis*, ce qui suggère qu'il s'agit d'un mécanisme conservé (Lawit *et al.*, 2007; Viola and Gonzalez, 2016) (Fig. 1.2).

a Assemblage du complexe de pré-initiation et recrutement de la Pol II



b Initiation par la Pol II et la dissociation du complexe de pré-initiation

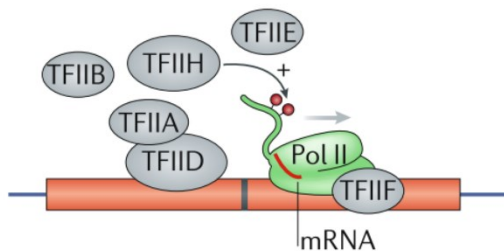


Figure 1.2 : L'initiation de la transcription.

Le complexe de pré-initiation est composé de l'ARN Pol II, et des facteurs généraux : TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH. TFIIH phosphoryle le domaine C-terminal de l'ARN Pol II, causant la dissociation du complexe de pré-initiation et le début de l'élongation. Figure adaptée de Haberle and Stark, 2018

1.2.2 L'élongation

Une fois la transcription débutée, l'hybride ADN-ARN situé à l'intérieur du site actif de la Pol II, est composé d'en moyenne 9 à 10 nucléotides et forme la bulle de transcription. C'est dans cette bulle que prend place l'ajout de nucléoside triphosphate complémentaire au brin d'ADN (Gnatt *et*

al., 2001). La Pol II oscille par mouvement brownien, c'est-à-dire qu'elle alterne entre un état de pré-translocation et de post-translocation. En état de pré-translocation, le site catalytique de la Pol II est occupé par une base d'ADN et la base d'ARN qui lui correspond. En état de post-translocation, le site catalytique présente une base d'ADN seule dans l'attente d'un nouveau nucléoside triphosphate. Son ajout provoque une pause ubiquitaire de la Pol II qui favorise son mouvement vers le prochain nucléotide à compléter (Adelman *et al.*, 2002; Brueckner *et al.*, 2009).

Le processus d'élongation est médié ainsi que régulé par l'intermédiaire de facteurs d'élongation. Chez *Arabidopsis*, la Pol II interagit avec les facteurs d'élongation PAF1C, TFIIS, SPT4-SPT5, SPT6L et FACT. Ces facteurs sont positionnés sur la surface de la Pol II et sont mutuellement exclusifs aux facteurs de transcription associés à l'initiation. Ils contrôlent non seulement la vitesse d'élongation, mais aussi la capacité à surmonter les nucléosomes. FACT est entre autres responsable du relâchement d'histone de l'ADN permettant ainsi sa translocation en amont du complexe d'élongation (Kujirai and Kurumizaka, 2020). PAF1C participe à la stabilité du complexe (Jaehning, 2010). Le dimère SPT4-SPT5 régule la pause de l'élongation et le traitement d'ARNm en cours de transcription (Hartzog and Fu, 2013; Song and Chen, 2022). Enfin SPTL6 est une chaperonne d'histone qui permet entre autres de maintenir la structure de la chromatine pendant la transcription (Kato *et al.*, 2013). Il est important de noter que la structure détaillée du complexe d'élongation n'a toujours pas été observée chez *Arabidopsis*. Cependant, puisqu'il s'agit d'un phénomène conservé et que les homologues de ces facteurs d'élongation ont été identifiés, beaucoup supposent que la structure du complexe est aussi similaire.

1.2.3 La terminaison

Une fois l'élongation complète, la terminaison repose sur la détection de plusieurs motifs menant à la polyadénylation, au clivage d'ARN naissant et au détachement de la Pol II. Plusieurs protéines interagissent afin d'assurer cette étape. Elles ont notamment été caractérisées chez les animaux, toutefois, plusieurs homologues ont été aussi identifiés chez les plantes (de Felippes and Waterhouse, 2023). Le facteur de clivage et de polyadénylation est le complexe principal responsable de la terminaison. Il est subdivisé en 2 sous-complexes; le facteur spécifique de polyadénylation composé de CPSF160, CPSF30, WDR33 et Fip1, et le facteur de clivage composé de CPSF73 et CPSF100 (Sun *et al.*, 2020). CPSF30 et WDR33 sont responsables de la détection du signal de polyadénylation tandis que CPSF73 catalyse le clivage de l'ARN naissant

au site de clivage (Hill *et al.*, 2019). La synthèse de la queue poly-A est ensuite prise en charge par la poly(A)-polymérase dont le recrutement est médié par Fip1 (Kaufmann *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2020). La queue poly-A a plusieurs fonctions : elle permet la stabilisation de l'ARN naissant et influence le traitement subséquent de l'ARN tel que l'épissage, l'exportation à l'extérieur du noyau et la traduction (Passmore and Coller, 2022). Une des grandes différences entre les animaux et les végétaux repose sur le nombre de gènes qui encodent ces différentes sous-unités. Plusieurs de ces sous-unités sont codées par des familles multigéniques, et certaines d'entre elles produisent même des isoformes en fonction des conditions développementales (Hunt *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2020).

1.2.4 La régulation de la transcription

Les trois grandes étapes décrites précédemment sont toutes régulées à différents niveaux. L'initiation de la transcription est régulée en partie par la liaison de facteurs de transcription. Ces facteurs se lient à des séquences spécifiques de promoteurs et y guident la Pol II afin d'initier la transcription (Cramer, 2019). La plupart de ces facteurs se lient à des séquences libres, mais certains sont capables d'interagir avec de l'ADN nucléosomal (Zhu *et al.*, 2018a). Les facteurs de transcription sont aussi capables de se lier à des amplificateurs qui peuvent être localisés jusqu'à plusieurs millions de paires de bases de leur gène cible (Banerji *et al.*, 1981; Furlong and Levine, 2018). L'activité de ces amplificateurs sur le gène ciblé va varier aussi en fonction du repliement de la chromatine (Core *et al.*, 2014). Le complexe médiateur est aussi un important régulateur de l'initiation par la Pol II car il permet de lier les amplificateurs aux promoteurs de gènes auxquels ils correspondent (Soutourina, 2018).

L'élongation et la terminaison sont notamment influencées par la pause de la Pol II. Juste après le début de l'élongation, à 25-35 nucléotides du site d'initiation de la transcription, la Pol II fait une pause. Cette pause est maintenue ou réfrénée par l'intervention de plusieurs facteurs comme SPT4-SPT5 par exemple. Le facteur d'élongation négatif NELF joue aussi un rôle important dans le contrôle de la pause proximale au promoteur. Cependant, aucun homologue de NELF n'a été identifié chez les plantes (Wu *et al.*, 2003). Pour l'instant, la présence de pause proximale au promoteur n'a pas été identifiée chez les végétaux, toutefois plusieurs modèles proposés impliquent la présence de nucléosome. Leur présence peut donc induire des pauses de l'élongation, et ce en réponse à diverses conditions (Kindgren *et al.*, 2020; Obermeyer *et al.*, 2023). La durée de cette pause impacte directement l'expression génique car elle peut entraîner le retour en arrière de la transcription ou encore son arrêt prématuré (Noe Gonzalez *et al.*, 2021).

Une seconde pause de la Pol II peut être observée proche du signal de polyadénylation et est associée à la coordination des différentes étapes de la terminaison (Mayer *et al.*, 2017).

La transcription étant un mécanisme indispensable, son fonctionnement est hautement régulé. En plus des quelques mécanismes généraux de régulation que nous venons d'aborder, la transcription est sujette à plusieurs autres types de régulation qui ont été extensivement décrits précédemment (Cramer, 2019; Noe Gonzalez *et al.*, 2021; Obermeyer *et al.*, 2023a; Yang *et al.*, 2023).

1.3 L'épissage alternatif

En tant qu'organisme supérieur, en plus de garantir leur développement, les plantes doivent faire face à une multitude de stress environnementaux. Afin d'assurer une réponse adéquate et rapide à tous ces stimulus externes et internes, les eucaryotes ont recouru à l'épissage alternatif. Ce processus conservé à travers les espèces permet à un gène de produire de multiples ARNm et donc protéines. Ainsi, il contribue grandement à la diversification transcriptomique et protéique chez les plantes et les animaux (Chaudhary *et al.*, 2019a,b). L'épissage alternatif permet donc d'augmenter la plasticité d'un organisme et de réorganiser ses différents processus développementaux (Muhammad *et al.*, 2023) (Fig. 1.3).

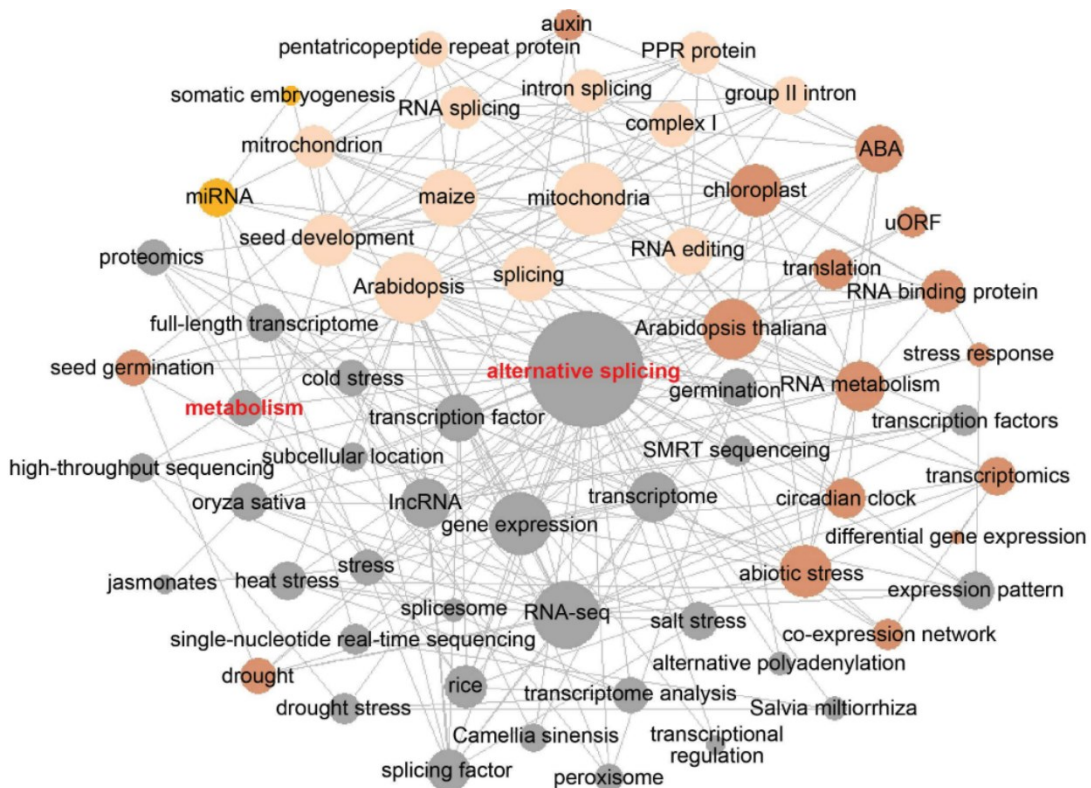


Figure 1.3 : L'étendue de l'impact de l'épissage alternatif.

Analyse de mots clés du Web of Science Core Collection data base de janvier 2012 à mai 2022. Le réseau d'occurrence des mots clés est analysé par BibExcel et Pajek. La taille des nœuds représente la fréquence d'apparition des mots clés. Figure tirée de Lam et al., 2022.

Le dogme de la biologie moléculaire indiquant qu'un gène mène à un ARNm et par la suite à une protéine, fut bouleversé lors de l'étude du processus d'infection par l'adénovirus 2. Ces recherches montrent que plusieurs ARNm d'adénovirus semblaient provenir de séquences génomiques non-continues, suggérant la présence de séquences d'ADN génomique non codantes (Berget *et al.*, 1977; Chow *et al.*, 1977). Plus tard, la possibilité qu'un gène puisse produire de multiples ARNm est mise en avant (Early *et al.*, 1980; Rosenfeld *et al.*, 1982), le tout menant éventuellement à la théorie de l'épissage alternatif (Gilbert, 1987).

Bien que l'épissage alternatif soit un processus conservé à travers les espèces, il existe des différences notables entre les plantes et les animaux. Par exemple, jusqu'à 94 % des gènes du

génomique humaine subissent de l'épissage alternatif (Wang *et al.*, 2008), tandis que chez les plantes on estime qu'environ 62 % des gènes à exons multiples sont épissés (Martín *et al.*, 2021). Il existe différents types d'événements d'épissage alternatif : la rétention d'intron (RI), le saut d'exon (SE), le site donneur alternatif (ALTD), le site accepteur alternatif (ALTA), les exons mutuellement exclusifs (MXE) ainsi que les exons (Fig. 1.4). La prévalence des différents types varie en fonction des organismes. La rétention d'intron est le type d'événement d'épissage le plus répandu chez les plantes. Il représente jusqu'à 65% des gènes épissés alternativement chez les végétaux (Marquez *et al.*, 2012) et 5% chez les humains (Wang *et al.*, 2008). De plus, les introns de plantes sont plus courts que ceux des humains. Ils mesurent en moyenne 160 paires de bases (Marquez *et al.*, 2012) comparé à 5 kilobases pour les humains (Sakharkar *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2021). Ces différences indiquent que les plantes et les animaux utilisent des mécanismes d'épissages alternatifs qui divergent dans une certaine mesure.

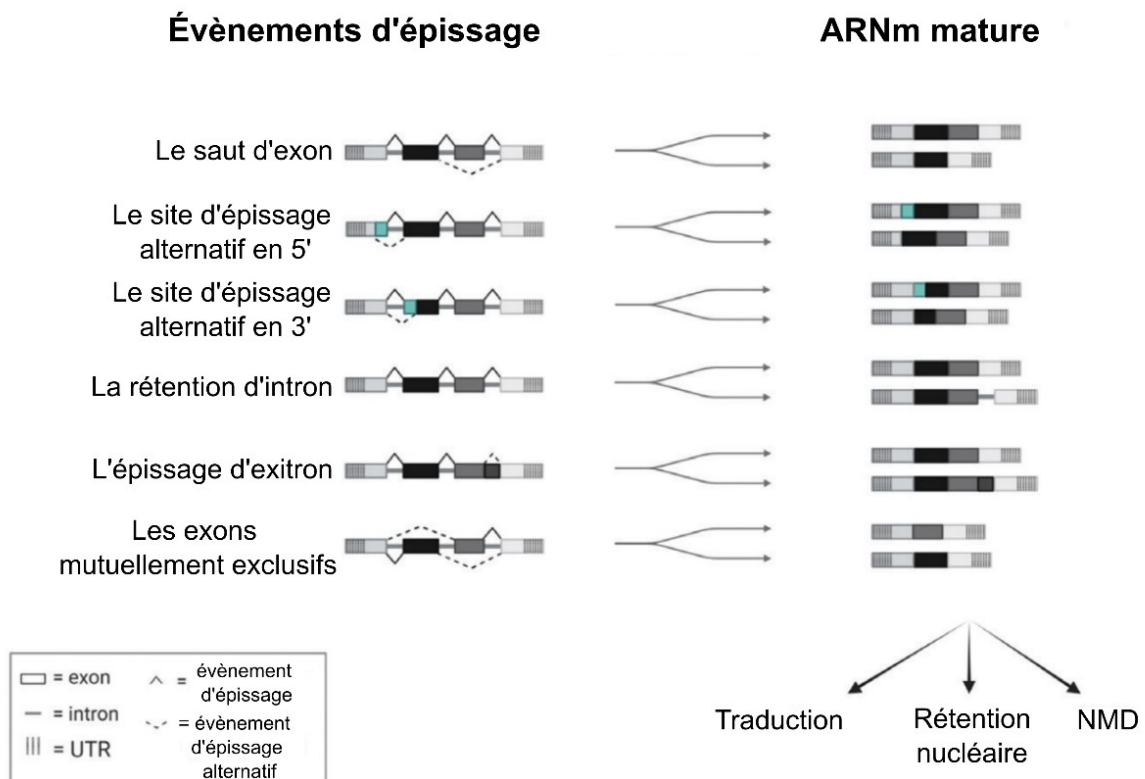


Figure 1.4 : Les différents types d'évènements d'épissage.

On retrouve différents types d'évènements d'épissage alternatif. Le saut d'exon engendre souvent des ARNm matures plus courts. L'épissosome peut reconnaître un site d'épissage donneur alternatif en 5' ainsi qu'un site d'épissage accepteur alternatif en 3'. Tous deux peuvent engendrer un ARNm plus court. La rétention d'intron est la forme la plus prévalente d'évènements d'épissage chez les plantes. Ce type d'évènement s'accompagne souvent par l'insertion d'un codon stop prématuré, qui peut mener à la dégradation par la NMD ou à la rétention nucléaire. La rétention d'intron constitue souvent une couche supplémentaire de régulation de l'expression génique. Il existe cependant des cas où la rétention d'un intron mène tout de même à la traduction en protéine. Les exitrons quant à eux représentent l'épissage de séquences internes aux exons codant pour une protéine. Les exitrons sont nécessaires à la traduction de domaines essentiels de protéines et sont spécifiques à différents stress ainsi qu'au type cellulaire (Marquez et al., 2015). Enfin, l'épissage d'exons mutuellement exclusifs signifie que les deux exons concernés sont épissés ou retenus de manière mutuelle. Ainsi, les deux exons ne sont jamais présents en même temps dans l'ARNm. Figure adaptée de Tognacca et al., (2023)

En fonction du type d'évènement d'épissage, l'épissage alternatif peut mener à différentes issues. L'une d'elle est la production de protéines isoformes fonctionnelles ou tronquées qui permet d'augmenter la complexité protéique d'un organisme. Ces protéines isoformes permettent d'agir directement sur les voies métaboliques ou génétiques dans lesquelles elles sont impliquées. L'ajout ou le retrait de domaine spécifique d'une protéine peut impacter sa localisation cellulaire (Samach *et al.*, 2011), son activité enzymatique (Wang *et al.*, 2015a) ou encore son interaction avec d'autres protéines (Chung and Howe, 2009). L'épissage alternatif peut aussi mener à la dégradation d'ARNm via la voie de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) (Kalyna *et al.*, 2012; Drechsel *et al.*, 2013; Ohtani and Wachter, 2019). En effet, l'introduction prématurée de codon STOP (PTC) peut induire la NMD. En plus de l'introduction de codon STOP, la NMD cible aussi d'autres caractéristiques retrouvées chez les ARNm issus d'épissage. C'est le cas de la rétention d'introns positionnés à moins de 50 nucléotides en aval d'un codon STOP ainsi que des micros ORF (uORF) et enfin des long 3'UTR (Ohtani and Wachter, 2019) (Fig. 1.5). Ce mécanisme de dégradation a longtemps été considéré comme un processus de maintenance. Ainsi, il permettait d'éviter la traduction inutile d'ARNm aberrant. Cependant, on sait maintenant que le rôle de la NMD s'étend plus loin que celui du contrôle qualité des ARNm. Ce processus fait partie intégrante des multiples couches de régulation de l'expression génique et permet de l'affiner tout en évitant une étape de traduction inutile. L'introduction de codon STOP ne signifie pas nécessairement le déclenchement de la NMD. Certains ARNm contenant ce type de motifs

sont séquestrés dans le noyau. Ils constituent alors une réserve d'ARNm partiellement épissés, disponibles pour épissage post-transcriptionnel dès que le besoin se présente (Göhring *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017a; Hartmann *et al.*, 2018). Tout comme la NMD, la rétention d'ARNm dans le noyau représente une étape de régulation post-transcriptionnelle supplémentaire. Elle permet la traduction d'ARNm sur demande, le tout ne nécessitant pas d'étape de transcription supplémentaire (Jia *et al.*, 2020).

Le processus d'épissage est un mécanisme dynamique qui a fait l'objet de nombreuses études. Bien que certains ARNm prématures (pré-ARNm) soient épissés de manières post-transcriptionnelle, la majeure partie des pré-ARNm est épissée en concordance avec la transcription.



Figure 1.5 : La dégradation d'ARNm via la voie de NMD.

La voie de dégradation NMD reconnaît différents motifs sur les ARNm tels que; (1) les longs UTR en 3', (2) la rétention d'introns positionnés à moins de 50 nucléotides en aval d'un codon stop, (3) les PTC en amont d'un site d'épissage, (4) les micros ORF (uORF). Le signe jaune représente les PTC. Les exons sont représentés en vert foncé et les introns en vert pale. Figure adaptée de Reddy *et al.*, (2013).

1.3.1 Le mécanisme d'épissage

L'épissage est assuré par un complexe multiprotéique nommé l'épissosome. La composition de l'épissosome est dynamique et varie en fonction des différentes étapes d'épissage. Les composantes majeures de l'épissosome sont de petites ribonucléoprotéines (*small nuclear RNPs*, snRNP) enrichies en uridine, les U, plus particulièrement U1, U2, U4/U6 et U5 (Wahl *et al.*, 2009). La détection du site d'épissage repose sur quatre éléments agissant en cis du pré-ARNm;

(1) le site d'épissage en 5' et (2) celui en 3', (3) le point de branchement et enfin (4) le tractus polypyrimidique situé entre le point de branchement et le site d'épissage en 3' (Fig. 1.6A).

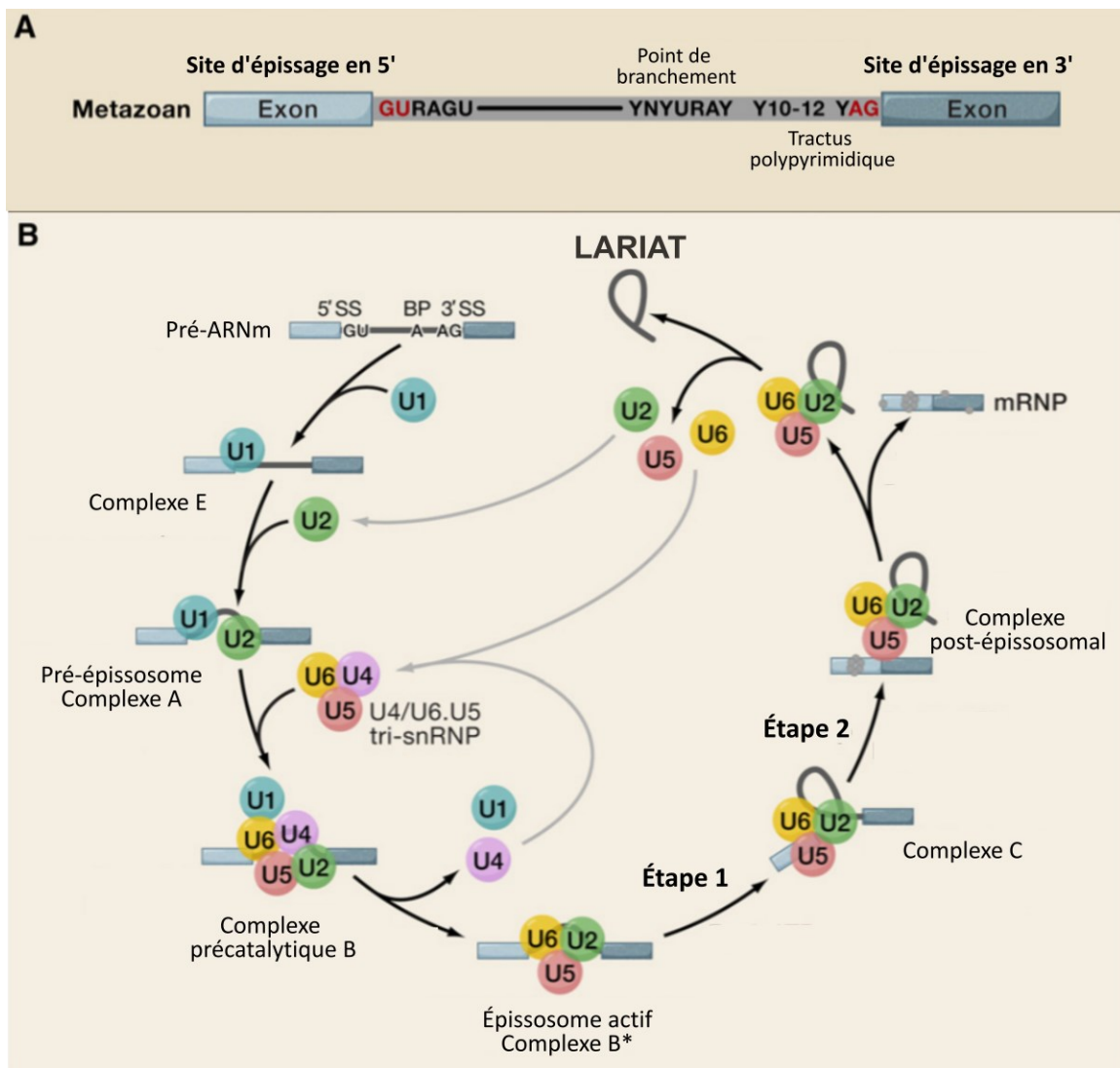


Figure 1.6 : Le processus d'épissage.

(A) Représentation des éléments agissant en cis du pré-ARNm et nécessaires à la sélection du site par l'épissosome chez les métazoaires. Deux exons (bleus) sont séparés par un intron (gris). Les séquences consensus du site d'épissage en 5' et 3', du point de branchement et du tractus polypyrimidique chez les métazoaires sont indiquées. Les R indiquent une purine, les Y une pyrimidine et les N n'importe quel nucléotide. (B) Les différentes étapes du processus d'épissage. Tel que décrit précédemment (section 1.3.1) la formation de l'épissosome commence par l'interaction entre le pré-ARNm, le snRNP U1, les deux sous unités de U2AF et la formation du complexe E. U2 est recruté pour former le complexe A et le tri-snRNP U4/U6.U5 s'ajoute. On parle alors de complexe précatalytique B. À cette étape, U2AF est retiré. S'en suit l'activation de l'épissosome qui nécessite notamment la perte de U1 et U4. Le complexe actif B* est en charge des deux étapes catalytiques menant dans un premier temps à la liaison des deux exons et la

formation du complexe C, puis au clivage de l'intron dans le complexe post-épissosomal. Enfin, l'intron clivé nommé le lariat est dégradé, et les différentes snRNP sont recyclées et prêtes à compléter un nouveau cycle d'épissage. Figure adaptée de Wahl et al., (2009).

La première étape d'assemblage de l'épissosome repose sur la liaison de U1 à un site d'épissage en 5'. Chez plusieurs organismes, cette interaction est stabilisée par des protéines SR (section 1.3.2.1.1). Puis, les deux sous-unités du facteur auxiliaire de U2 (U2AF) interagissent avec l'extrémité 3' de l'intron. U2AF65 se lie au tract polypyrimidique tandis que U2AF35 se lie au 3'SS. C'est ainsi que le complexe E est formé. U2 est ensuite recruté au niveau du point de branchement pour former le complexe A. Enfin, le tri-snRNP U4/U6. U5 vient s'ajouter via U2 et forment alors le complexe précatalytique B. Tel que son nom l'indique à cette étape, l'épissosome n'est pas encore actif. Pour permettre son activation catalytique, le complexe B subit plusieurs réarrangements structuraux, engendrant notamment le retrait de U1 et U4. On parle alors du complexe B*. Puis, l'épissosome rapproche les deux extrémités d'exons, U6 interagi avec le site d'épissage en 5' et U2. Le site d'épissage en 5' est clivé puis lié au point de branchement. Le site d'épissage en 3' est clivé à son tour et les deux extrémités d'exons sont liés. La boucle d'intron clivé nommée le lariat, est dégradée dans le noyau, tandis que l'épissosome est désassemblé. U2, U5 et U6 sont recyclés et lié à un autre épissosome en formation (Wahl *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020) (Fig. 1.6B).

Bien que le mécanisme d'épissage alternatif chez les plantes soit l'objet de nombreuses études, certains aspects de ce processus ont encore besoin d'une caractérisation plus approfondie. Dans les prochains paragraphes, nous allons passer en revue les différentes étapes de ce mécanisme, ses méthodes de régulation ainsi que les différents processus dans lequel il est impliqué.

1.3.2 Régulation de l'épissage alternatif

Comme tout processus biologique complexe, l'épissage alternatif est sujet à plusieurs couches de régulation permettant ainsi de répondre de la manière la plus rapide et efficace à tout stimulus interne ou externe (Fig. 1.3). Ainsi, plusieurs étapes clés de ce mécanisme sont soumises à un système de régulation. C'est le cas pour la phase d'initiation de l'épissage, de la détection de site d'épissage, de la vitesse de l'épissosome et de la terminaison. Dans les prochains paragraphes nous allons aborder l'impact des principaux acteurs de l'épissage alternatif chez les plantes.

1.3.2.1 Les facteurs d'épissage

1.3.2.1.1 Les protéines SR

Parmi les différentes protéines influençant l'épissage, on compte notamment la famille des protéines SR. Cette famille conservée à travers les espèces représente des protéines qui comprennent une paire de domaines communs. Elles possèdent toutes un domaine enrichi en Sérines et Arginines (RS) ainsi que au moins un site de liaison à l'ARN (Fu, 1995; Barta *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2023). Les protéines SR sont divisées en plusieurs classes en fonction du nombre de sites de liaison à l'ARN qu'elles arborent, mais aussi des domaines supplémentaires qu'elles peuvent détenir. Les plantes quant à elles, possèdent des sous-familles qui leur sont propres, dû au fait que les végétaux encodent un plus grand nombre de protéines SR que les animaux. On peut retrouver entre 18 et 30 protéines SR chez *Arabidopsis* et *Populus trichocarpa* (Barta *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2019) respectivement, réparties en 6 groupes (Barta *et al.*, 2010). Chez l'humain, 12 protéines SR ont été identifiées et elles sont regroupées en 3 sous-familles (Manley and Krainer, 2010).

Les protéines SR impactent l'épissage à différentes étapes. Une de leurs fonctions les plus connues repose sur leur capacité à se lier à un site activateur d'épissage exonique retrouvé chez les pré-ARNm (Zhou and Fu, 2013). Cette interaction permet d'influencer la sélection de site d'épissage, ainsi que le recrutement de l'épissosome. Bien que le processus exact de recrutement de l'épissosome par les protéines SR ne soit pas encore entièrement élucidé, le mécanisme proposé ressemble à celui-ci: une fois lié au site activateur d'épissage exonique via son domaine de liaison à l'ARN, la protéine SR recrute le petit complexe snRNP, U1-70K (*U1 snRNP-specific protein 70K*) à l'extrémité 5' et le complexe U2AF en 3'. Les protéines SR interviennent aussi par la suite dans l'incorporation de U2 (Graveley *et al.*, 2001; Lorković *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2017). Leur domaine RS quant à lui permet l'interaction avec une variété de protéines. Certaines protéines SR possèdent même des propriétés de phosphorylation/déphosphorylation au niveau du domaine RS qui interviennent dans la formation complète de l'épissosome (Barta *et al.*, 2008). C'est d'ailleurs le domaine RS qui permet le

recrutement du complexe tri-snRNP U4/U6.U5 menant éventuellement à la formation de l'épissosome mature (Long and Caceres, 2008).

L'impact de la liaison d'une protéine SR va dépendre du contexte génomique dans lequel le site de liaison se trouve sur le pré-ARNm. Lorsque lié à un exon interne, la protéine SR promeut son inclusion, tandis que la liaison à deux exons adjacents risque d'engendrer son exclusion (Zhou and Fu, 2013). Le rôle d'une protéine SR donnée dépend donc du type de site qu'elle va cibler. C'est pourquoi de nombreuses études se penchent sur l'identification de site de liaison de ces protéines sur les pré-ARNm. L'utilisation de méthodes telles que la réticulation protéique suivie d'immunoprécipitation (*cross linking immunoprecipitation assays*) chez les animaux, a montré que les protéines SR interagissent avec une grande variété de sites de liaison sur les pré-ARNm (Änkö *et al.*, 2012; Pandit *et al.*, 2013). Plusieurs analyses ont permis de confirmer que chaque protéine SR analysée possède des sites de liaison au pré-ARNm non redondants (Xing *et al.*, 2015; Brugiolo *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017b). Cette observation suggère que chaque protéine SR assume une fonction spécifique dans la régulation de l'épissage constitutif et alternatif. Il est important de noter que les protéines SR ont aussi un impact important dans d'autres processus biologiques tels que la transcription, la traduction, le transport d'ARNm mature à l'extérieur du noyau ou encore la NMD (Jia *et al.*, 2023a).

En plus d'être très impliqués dans différentes étapes de l'épissage, les ARNm codants les protéines SR sont eux aussi sujets à de l'épissage. Leur niveau d'expression et d'épissage constitue une forme d'auto-régulation. Cette auto-régulation intervient aussi bien en réponse aux différentes étapes développementales, qu'en réponse aux stimuli externes. Par exemple, SR45a nécessite la production de ses deux isoformes SR45a-1a et SR45a-1b pour assurer la tolérance au stress salin (Li *et al.*, 2021). *AtSRp30* quant à lui génère plusieurs isoformes qui ont une spécificité tissulaire, agissant ainsi sur le développement de la plante (Lopato *et al.*, 1999b; Ali *et al.*, 2007). *AtSR30p* s'auto-régule aussi en agissant sur l'épissage de son propre pré-ARNm. De plus, *AtSRp30* semble avoir un impact sur l'épissage alternatif de plusieurs autres protéines SR dont, *AtRSp31*, *AtU1-70K*, et *AtSRp34/SR1* (Lopato *et al.*, 1999a,b). L'augmentation de la température a aussi un effet sur l'épissage de nombreuses protéines SR tels que; *RS40*, *SR34a*, *RSZ22*, *RSZ22a*, *SR30*, *SR34*, *RSZ33*, et *SR45a* (Ling *et al.*, 2021). De plus, le niveau d'expression de certaines de ces protéines varie grandement en réponse au stress. C'est le cas de *SR34b* dont l'expression augmente en présence de cadmium et qui est responsable de la résistance de la plante (Zhang *et al.*, 2014a).

Les protéines SR peuvent aussi interagir avec des hnRNP (ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires). Les hnRNP agissent en tant que répresseurs d'épissage. Elles possèdent aussi un domaine de liaison à l'ARN et se lient à des sites inhibiteurs d'épissage exonique. De par leur rôle antagoniste, les protéines SR liées à un site activateur d'épissage exonique inhibent l'effet répresseur des hnRNP eux mêmes liés à un site inhibiteur (Howard and Sanford, 2015).

Les protéines SR jouent un rôle complexe et varié dans l'adaptation et la réponse aux stimuli. Elles interagissent avec un large nombre de protéines et interviennent dans de multiples processus biologiques. Bien que certaines étapes mécanistiques de leur méthode d'action ou encore le processus exact par lequel elles perçoivent les stimuli externes reste à être élucidé, leur importance à la survie des eucaryotes est indéniable.

1.3.2.1.2 Autres types de facteurs d'épissage

En plus des protéines SR, il existe plusieurs autres types de facteurs d'épissage qui peuvent influencer celui-ci. Ici encore, le rôle de certains de ces facteurs va être dicté par les changements environnementaux, mais aussi par les différentes étapes du développement des plantes. STA1 (Stabilized1) par exemple, est une snRNP qui en interagissant avec U5, induit l'épissage de plusieurs transcrits reliés à la résistance aux changements de températures (Lee *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2017, 2018). Les deux sous unités facteurs auxiliaires de U2, U2AF65 et U2AF35 agissent dans l'apex de la tige, sur l'expression ainsi que sur la maturation de pré-ARNm d'un large ensemble de gènes impliqués dans la floraison. Plus précisément, U2AF65 et U2AF35 ont un impact sur le locus *FLC* (*Flowering Locus C*) répresseur de floraison (Lee *et al.*, 2023b). MDF (Meristem Defective) est l'homologue chez *Arabidopsis* de la protéine humaine SART1 (Squamous Cell Carcinoma Antigen Recognized By T Cells 1). SART1 interagit avec l'homologue humain du tri-snRNP U4/U6.U5 et est essentielle à l'association du tri-snRNP au pré-épissosome (Makarova *et al.*, 2001). Récemment, de Luxán-Hernández *et al.*, (2023) ont identifié MDF comme étant un facteur d'épissage important. Celui-ci interagit aussi avec U4/U6.U5 et est essentiel pour l'épissage de près de 2 000 transcrits. De plus, il semble jouer un rôle important dans la mitose chez les plantes (Thompson *et al.*, 2023). Ces quelques exemples démontrent que les facteurs d'épissage peuvent avoir un effet à des étapes cruciales et variées de l'épissage.

1.3.2.2 L'épigénétique

De plus en plus d'études mettent en lumière l'importance de l'épigénétique sur la régulation de l'épissage aussi bien constitutif qu'alternatif. Les marqueurs classiques d'épigénétiques tels que la structure de la chromatine, des histones, ou encore la méthylation de l'ADN ont un impact sur plusieurs aspects de l'épissage. La vitesse d'élongation de la Pol II par exemple influence l'épissage de pré-ARNm, mais aussi l'épissage alternatif. Il a été suggéré que le ralentissement de la Pol II donnerait le temps à un exon possédant un site d'épissage faible de recruter l'épissosome. Son accélération coïncide avec le saut de site d'épissage (De La Mata *et al.*, 2003; Ullah *et al.*, 2018). Ullah *et al.*, (2018) ont établi un lien entre l'accessibilité de la chromatine et la rétention d'intron. Les introns retenus possèdent une structure de chromatine ouverte qui est aussi liée à une augmentation de l'efficacité d'élongation de la Pol II.

La méthylation des nucléotides GC de l'ADN a aussi un effet sur l'épissage alternatif. Chez les animaux et les plantes, la perte de méthylation cause un grand réarrangement du paysage d'épissage alternatif (Li-Byarlay *et al.*, 2013; Yearim *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). Il est intéressant de noter que la méthylation GC est plus présente dans les introns reliés à l'épissage alternatif que constitutif. Cela suggère que la méthylation joue un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif (Wang *et al.*, 2018).

Ces découvertes illustrent bien l'importance de l'épigénétique sur l'épissage constitutif et alternatif chez les animaux et les plantes. Ainsi, le processus d'épissage est donc strictement régulé et permet l'adaptation aussi bien aux stimuli environnementaux qu'aux changements nécessaires au développement normal de la plante.

1.3.3 L'épissage alternatif et le développement végétal

Les plantes passent à travers plusieurs étapes de développement avant d'atteindre la maturité et éventuellement la sénescence. L'embryogénèse, la germination, le développement de pousses, la maturation et la production de fleurs, représentent des phases importantes du cycle de vie des végétaux. Afin de traverser toutes ces étapes, les plantes doivent répondre à de nombreux stimuli. En plus de la transcription et de la traduction, l'épissage alternatif apporte une couche de régulation supplémentaire qui est nécessaire à la transition d'un stade de développement à un

autre. L'épissage alternatif intervient donc à chaque étape de la croissance végétale. Dans les prochains paragraphes, nous allons passer en revue quelques cas qui illustrent l'influence de ce processus sur le développement avec un accent sur les méristèmes.

La germination est un processus très régulé puisqu'il nécessite les bonnes conditions environnementales. L'acide abscissique (ABA) est une phytohormone très impliquée dans la transition de la phase de dormance à la germination des graines. L'ABA inhibe la germination et son activité doit donc être réprimée pour permettre l'arrêt de la dormance. ABI3 (Abscisic Acid Insensitive 3) est un des régulateurs de l'ABA (To *et al.*, 2006). L'épissage alternatif d'*ABI3* produit deux variants d'épissages, *ABI3- α* et *ABI3- β* . *ABI3- α* entraîne la traduction d'une protéine entière tandis que *ABI3- β* produit une version qui ne contient que deux des quatre domaines d'ABI3. L'accumulation d'*ABI3- β* est requise pour l'initiation de la germination. La forme tronquée et donc moins fonctionnelle de ABI3, permet alors de réprimer l'activité de l'ABA et de déclencher la germination. L'épissage alternatif de *ABI3* est contrôlé par le facteur d'épissage SUA ce qui illustre bien la versatilité de certains facteurs d'épissages. SUA agit en réprimant l'épissage de l'intron nécessaire à la forme fonctionnelle de ABI3, ce qui là aussi représente un bon exemple d'intron cryptique (Sugliani *et al.*, 2010). Il est intéressant de noter que l'accumulation de la forme tronquée d'ABI3 n'est pas le seul mécanisme mis en place pour inhiber son activité. L'expression de *ABI3* est aussi diminuée par un facteur de remodelage de la chromatine et la protéine correspondante est dégradée lorsque nécessaire (Zhang *et al.*, 2005; Perruc *et al.*, 2007). Cette observation indique que l'épissage alternatif est une couche de régulation qui fonctionne souvent en coopération avec d'autres mécanismes. Un autre composant de la signalisation induite par l'ABA qui médie la germination est HAB1 (Hypersensitive To ABA1). HAB1 est une phosphatase qui réfère l'effet de l'ABA. *HAB1* produit deux protéines isoformes: HAB1.1 qui est la forme active et HAB1.2 qui possède un intron supplémentaire et qui a perdu son activité phosphatase. Ces deux isoformes ont un rôle antagoniste sur l'ABA. Durant la phase de dormance, HAB1.2 est plus présente tandis que HAB1.1 est nécessaire pour la transition vers la germination. HAB1.1 a donc pour fonction de diminuer l'activité de l'ABA dans son rôle de maintien de la dormance (Wang *et al.*, 2015b; Xue *et al.*, 2018). Beaucoup d'autres régulateurs de l'embryogénèse et de la germination subissent de l'épissage alternatif. Szakonyi et Duque (2018) et Tognacca *et al.*, (2023) ont réalisé le travail énorme de les répertorier.

1.3.3.1 Les méristèmes

L'apparition du méristème apical racinaire (RAM) et de la tige (SAM) se fait durant l'embryogénèse et forme ce que deviendront par la suite les parties aériennes et racinaires de la plante. Une fois l'embryogénèse terminée et la germination enclenchée, ces deux méristèmes se localisent à l'apex de la tige et de la racine pour le SAM et RAM respectivement. Leur développement et maintien chez la plante sont primordiaux à leur croissance. Les méristèmes sont entre autre, source de cellules pluripotentes et permettent la formation des différents organes végétaux.

1.3.3.1.1 Le méristème apical de la tige

Le méristème apical de la tige assure la croissance des feuilles, tiges et parties florales. Il est divisé en trois zones; la zone centrale, la zone en périphérie et la zone costale. La zone centrale correspond à la niche de cellule pluripotentes. La zone périphérique quant à elle est composée de cellules en division très rapide qui vont mener à la formation des primordias de feuilles. Les zones centrale et costale sont séparées par le centre d'organisation qui est en charge de maintenir la population de cellules souches de la zone centrale. En plus de ces trois zones, le SAM peut aussi être divisé en trois couches clonales distinctes. La première couche, L1 se trouve à la surface du SAM et forme l'épiderme. S'ensuivent ensuite la seconde couche sub-épidermale L2 et dernière couche L3 (Fig 1.7). Le maintien de la zone centrale repose notamment sur l'effet antagoniste de *CLV3* (Clavata 3) et *WUS* (Wuschel). *CLV3* est un petit peptide sécrété par les cellules souches qui favorise la différenciation. Bien que l'expression de *WUS* soit restreinte au niveau du centre d'organisation, une fois traduite *WUS* migre vers la zone centrale où il y enclenche l'expression de *CLV3*. *CLV3* à son tour vient réprimer l'expression de *WUS* dans le centre d'organisation dans le but de maintenir la taille de la zone centrale adéquate et de ralentir la différenciation cellulaire. Cette boucle de rétroaction négative permet de maintenir l'équilibre entre la production de cellules souches et la différenciation cellulaire (Xue *et al.*, 2020a).

En plus de *CLV3* et *WUS*, le facteur de transcription *STM* (Shoot Meristemless) participe aussi au fonctionnement du SAM de par sa capacité à contrôler l'expression de gènes nécessaires à sa formation et son maintien (Balkunde *et al.*, 2017). *STM* interagit avec plusieurs autres protéines pour réguler son activité, parmi celles-ci on compte notamment *SKIP* (Ski-interacting Protein). *SKIP* est un composant de l'épissosome et intervient dans de nombreux mécanismes. Il s'agit

d'un facteur avec deux activités; facteur d'épissage ainsi que facteur de transcription. SKIP interagit avec STM pour réguler la transcription de gènes reliés au fonctionnement du SAM. L'hétérodimère agit notamment sur le promoteur de *CLV3* pour contrôler son expression (Li *et al.*, 2022). Bien que ce soit l'activité de facteur de transcription de SKIP qui influence le SAM, plusieurs suggèrent qu'il existe un lien indirect entre l'épissage alternatif et la maintenance de SAM (Lee *et al.*, 2023a).

Malgré l'absence de caractérisation des fonctions biologiques des variants d'épissage présents chez les cellules du SAM, plusieurs études confirment que l'épissage alternatif y est tout de même très actif. Lors de l'analyse du transcriptome du SAM d'*Arabidopsis*, 4261 gènes présentant un variant d'épissage ont été identifiés. Dans cette étude, le profil d'épissage alternatif a été observé dans les différentes zones de SAM, et ce grâce à l'utilisation de promoteur de gènes spécifique à chaque domaine. Parmi les zones du SAM observées, la zone centrale, le centre d'organisation, la zone périphérique et L1 sont représentées par les promoteurs des gènes *CLV3*, *WUS*, *UFO (Unusual Floral Organs)* et *ML1 (Meristem Layer 1)* respectivement. Parmi les 4261 gènes différenciellement épissés, 751 varient en fonction du domaine. La zone centrale et le centre d'organisation présentent un enrichissement particulier d'évènements d'épissage alternatif, ce qui suggère que ces deux zones soient régulées à travers l'épissage alternatif (Tian *et al.*, 2019b). Une analyse similaire a aussi été réalisée chez le soja où 1834 évènements d'épissage alternatif ont été identifiés au cours du développement du SAM (Wang *et al.*, 2014). L'impact de l'épissage alternatif dans la formation et le maintien du SAM semble donc important, pourtant sa fonction précise reste encore à être déterminée.

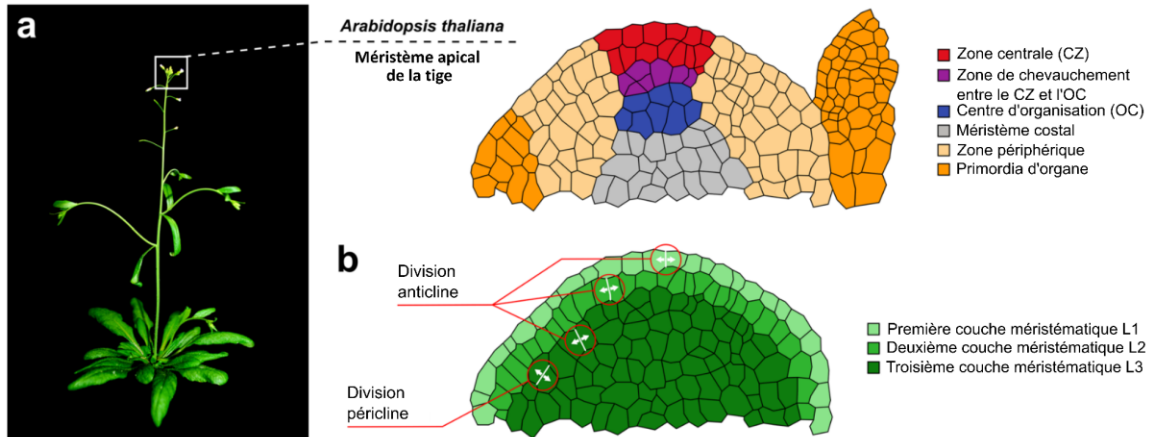


Figure 1.7 : Le méristème apical de la tige.

Représentation schématique du méristème apical de la tige. Les différentes zones du SAM y sont représentées en différentes couleurs (A). Représentation schématique des trois couches clonales distinctes du SAM. Les cellules de la couche d'épiderme L1 se divisent de manière anticline, tandis que les cellules des couches L2 et L3 se divisent de manière anticline et péricline (B). Figure adaptée de Fuchs and Lohmann (2020).

1.3.3.1.2 Le méristème apical racinaire

Au niveau des organes souterrains, c'est le méristème apical racinaire qui est responsable de la différenciation des cellules et de l'expansion de la plante. Comme le SAM, la formation du RAM débute dès la phase embryonnaire. Durant la phase post-embryonnaire, le RAM se divise en trois zones. La niche de cellules souches est la zone dans laquelle se trouvent les cellules du centre quiescent. Du côté proximal, le centre quiescent est entouré de cellules en division qui forment le méristème proximal. Les cellules commencent ensuite leur processus de différenciation dans la zone de transition et finalement mûrissent dans la zone d'élongation/de maturation. Du côté distal de la niche de cellules souches, on retrouve aussi la population de cellules souches de la columelle qui formera plus tard la columelle puis les cellules de bordure de la racine (Fig. 1.8).

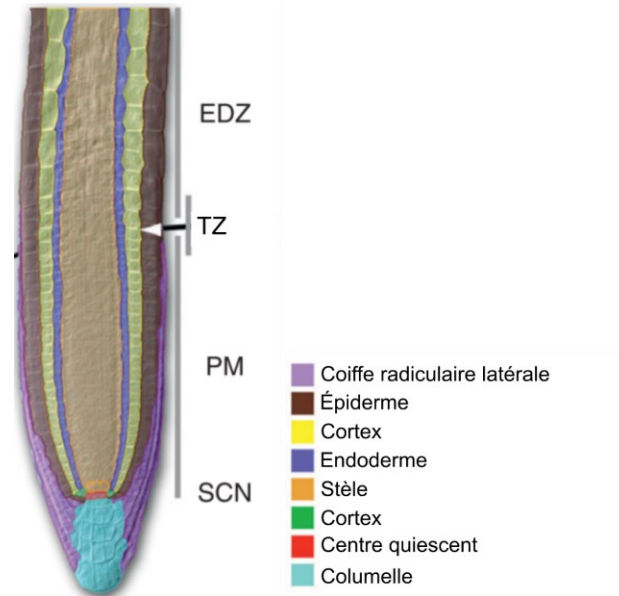


Figure 1.8: Le méristème apical racinaire.

Représentation des différents types cellulaires retrouvés dans le méristème apical racinaire. SCN : Niche de cellules souches, PM : méristème proximal, EDZ : zone de différenciation, TZ : zone de transition. Figure adaptée de Perilli et al., (2012).

Tout comme le SAM, le RAM nécessite le maintien de l'équilibre entre la population de cellules souches, de cellules en division et de cellules en différenciation. Pour ce faire, le RAM repose sur plusieurs facteurs de transcription tels que : WOX5 (Wuschel Related Homeobox 5), PLT (Apetala2 Plethora), SHR (Short-root) et SCR (Scarecrow). Ces facteurs de transcription interagissent tous de manière dynamique afin de maintenir le RAM (Pardal and Heidstra, 2021).

Là aussi l'épissage alternatif intervient dans la formation du RAM et dans son maintien. Le composant de l'épissosome RDM16 (Rna-directed DNA METHYLATION 16) fait partie du complexe U4/U6. Le mutant *rdm16-4* exhibe un phénotype de racines courtes et un nombre réduit de cellules dans le RAM. Ce facteur d'épissage est requis pour l'épissage alternatif de *PLT1* et *PLT2* des facteurs de transcriptions de la famille des PLT mentionnés ci-dessus (Lv et al., 2021). Récemment, un important régulateur du maintien du RAM en réponse au stress osmotique et au froid a été identifié. MDF encode une protéine de la famille des SR (section 1.3.2.1.1) et est exprimé dans les tissus méristématiques. Son interaction avec le facteur d'épissage STA1 (section 1.3.2.1.2) ainsi que d'autres composants de l'épissosome corrobore sa fonction en tant que facteur d'épissage. MDF médie l'épissage alternatif de RSZ33, un facteur d'épissage putatif, et ACC1, impliqué dans la biosynthèse des acides gras. La perte d'épissages de ces deux cibles engendre le même phénotype que le mutant *mdf*, c'est à dire des racines courtes et un RAM atrophié. De plus,

le pré-ARNm de *MDF* est lui aussi sujet à de l'épissage alternatif en conditions de froid et de choc osmotique. Toutes ces observations suggèrent que *MDF* permet de réprimer la différenciation et la mort cellulaire programmée en condition de stress (Thompson *et al.*, 2023).

Les facteurs de transcription de la famille des Ethylene Response Factor interviennent dans beaucoup de voies de signalisation, parmi lesquelles on compte la tolérance aux stress biotiques et abiotiques. *AtERF73/HRE1* fait partie de cette famille de facteurs de transcription. *AtHRE1* encode deux isoformes *At-HRE1 α* et *At-HRE1 β* , le premier est impliqué dans la résistance au stress hypoxique, mais aussi dans le développement du méristème racinaire. En effet, non seulement l'expression d'*At-HRE1 α* est plus élevée au niveau des racines, mais sa surexpression cause un nombre anormalement grand de cellules du RAM tels que les cellules du centre quiescent. Cependant, une étude ultérieure montre que, bien que la surexpression d'*At-HRE1 β* a le même impact que celle d'*At-HRE1 α* , l'expression d'*At-HRE1 β* est bien moins élevée dans les racines que celle d'*At-HRE1 α* . Cette disparité peut être attribuée aux différences structurales de ces deux isoformes. *At-HRE1 β* génère une protéine plus longue de 51 acides aminés due à la rétention d'un intron et possède donc un domaine N-terminal plus long avec un motif cible de la voie de dégradation des protéines *N-degron*. L'hypothèse émise sur le fonctionnement de ces deux isoformes repose cependant sur leur fonction de facteurs de transcription et leur capacité de liaison avec le motif GCC-box (5'-AGCCGCC-3'). De par leur interaction avec ce motif, les deux isoformes contrôlent l'expression d'une gamme de gènes différents. Toutefois, leurs mécanismes de fonctionnement exacts restent encore à être démontrés (Seok *et al.*, 2020).

L'épissage alternatif intervient donc de manière significative sur la formation du SAM et du RAM ainsi que sur leur maintien au travers du cycle de vie des plantes. Malgré tout, la fonction exacte, de même que l'étendue de l'impact de l'épissage alternatif dans les méristèmes sont encore flous. Beaucoup reste à faire et l'étude de l'épissage alternatif sur les méristèmes en est toujours à ses débuts.

1.3.4 L'épissage alternatif et les stimuli externes

Tel que mentionné précédemment, le mécanisme d'épissage alternatif est très régulé et permet aux organismes de s'adapter rapidement et efficacement aux signaux environnementaux. En effet, l'épissage alternatif permet donc un meilleur contrôle de l'équilibre entre les conditions normales de développement et les conditions de réponses aux stress externes qui sont souvent énergivores.

Nous avons déjà discuté de l'influence que les différents stress peuvent avoir sur la régulation de l'épissage. On sait maintenant que de nombreux facteurs d'épissage réagissent aux changements environnementaux. Les stress environnementaux auxquels les végétaux sont confrontés peuvent être séparés en deux catégories : les stress abiotiques et biotiques. Dans les paragraphes suivants nous allons aborder l'impact de l'épissage alternatif en tant que tel sur l'adaptation aux stimuli externes. Nous allons pour l'instant, nous attarder plus particulièrement au stress abiotique puisque l'influence de l'épissage alternatif sur l'immunité végétale sera discutée plus bas (section 1.4.3).

1.3.4.1 Stress abiotique

Les changements drastiques de température, les concentrations accrues en sels, métaux, ou autres résidus des sols, la sécheresse, constituent tous des exemples de stress abiotiques auxquels les plantes doivent faire face.

Plusieurs études rapportent que sous différents stress abiotiques, le paysage d'épissage alternatif subit des changements drastiques. C'est le cas du stress salin qui cause un réarrangement majeur des variants d'épissage chez *Arabidopsis* (Ding *et al.*, 2014), chez le coton (Zhu *et al.*, 2018b) ou encore le saule (Wang *et al.*, 2024). La vigne quant à elle encode plusieurs ATPases transmembranaires les VvPMAs (*Vitis vinifera* PM H⁺-ATPase). Ces VvPMAs sont impliqués dans la résistance aux changements osmotiques et subissent eux aussi de l'épissage alternatif. VvPMA1 par exemple encode deux variants d'épissage VvPMA1 α et VvPMA1 β . Chacun de ces variants présentent un profil d'expression opposé en présence de grandes quantités de sel. VvPMA1 β semble être la forme fonctionnelle de VvPMA1. La présence de ces deux variants suggère donc que l'épissage alternatif de VvPMA1 est une étape de régulation nécessaire pour une réponse adéquate au stress osmotique (Han *et al.*, 2017).

La résistance à la chaleur repose particulièrement sur la régulation par épissage alternatif. La tolérance aux fortes chaleurs est notamment assurée par la famille des facteurs de transcription HSF (Heat Shock transcription Factors). Les HSF sont eux mêmes sujets à de l'épissage alternatif (Ling *et al.*, 2021), c'est le cas de HsfA2. Le stress induit par la chaleur génère la production d'un isoforme de HsfA2, sous forme de petite protéine tronquée; S-HsfA2. Cette petite protéine ferait partie intégrante d'une boucle d'autorégulation positive. S-HsfA2 en se liant au gène HsfA2 induit son expression, menant ainsi à l'accumulation de HsfA2 sous forme entière (Liu *et al.*, 2013a).

DREB2A (Drought Response Element Binding protein 2A) est un facteur de transcription qui contrôle l'expression de plusieurs HSF qui lui aussi, subit de l'épissage alternatif. En condition normale, DREB2A interagit avec le régulateur négatif Radical-induced Cell Death 1. Lors d'un stress thermique, une forme tronquée de DREB2A est produite et celle-ci perd alors son site de liaison à Radical-induced Cell Death 1 (Vainonen *et al.*, 2012; Theisen *et al.*, 2024).

Le transporteur ZIFL1 (Zinc-Induced Facilitator-Like 1) constitue un cas intéressant où l'épissage alternatif est nécessaire à la tolérance à la sécheresse, mais aussi où l'épissage a un impact sur la localisation cellulaire des isoformes générés. La forme entière de la protéine ZIFL1.1 est localisée au tonoplaste des cellules racinaires, tandis que la forme tronquée ZIFL1.3, elle se localise à la membrane des cellules de garde. Dans les cellules de garde, ZIFL1.3 médie la fermeture stomatale nécessaire face à la sécheresse. ZIFL1.1 quant à elle est impliquée dans la circulation d'auxine dans la plante (Remy *et al.*, 2013).

Comme mentionné plus tôt, en plus de l'effet de l'épissage alternatif en tant que tel sur la tolérance aux différents stress abiotiques, la régulation de l'épissage alternatif est aussi affectée par ces stimuli. Nous avons notamment discuté de plusieurs facteurs d'épissage impliqués dans différentes réponses tels que STAT1 et le choc thermique, SR34B et l'accumulation de cadmium, SR45a et le stress salin. Cette courte liste ne répertorie qu'un très petit nombre de facteurs d'épissage jouant un rôle dans la tolérance au stress abiotique. Les nombreux efforts de caractérisations de ces facteurs ont permis d'en identifier une grande quantité aussi bien chez *Arabidopsis* que chez plusieurs autres espèces végétales. Nombreux sont ceux qui ont participé à les répertorier. Liu *et al.*, (2022) par exemple ont monté des listes non exhaustives des facteurs d'épissage végétaux et de leurs fonctions.

Le processus d'épissage alternatif joue donc un rôle majeur dans la tolérance aux stress abiotiques. En plus d'exemplifier l'impact de l'épissage lors d'un stimulus abiotique, cette section illustre bien l'étendue des processus dans lequel il est impliqué ainsi que la versatilité de ce mécanisme.

1.4 L'identité cellulaire, l'épissage alternatif et l'immunité; trois pans majeurs

À travers les paragraphes précédents, nous avons établi l'importance de la réponse immunitaire et de l'épissage alternatif. Bien que ces deux processus puissent paraître indépendants, ils coïncident en plusieurs points. Un autre des pans majeurs de la biologie végétale que nous allons aborder ici repose sur l'identité cellulaire. Les végétaux sont des organismes pluricellulaires et sont donc composé d'une pléthore de types cellulaires différents, chacun assurant une fonction différente. Au cours des dernières années, de plus en plus d'études ont souligné l'influence majeure de l'identité cellulaire sur l'épissage alternatif ainsi que sur l'immunité végétale. Dans les prochaines sections, nous allons discuter des liens identifiés entre l'identité cellulaire, l'épissage alternatif et l'immunité végétale.

1.4.1 L'épissage alternatif et l'identité cellulaire

L'épissage alternatif permet l'adaptation non seulement aux différents stimuli externes, mais aussi internes qui apparaissent au cours du processus développemental normal de la plante. Les plantes sont composées de cellules réparties en de multiples types cellulaires. Leur identité est étroitement liée à leur positionnement dans la plante. La différenciation cellulaire fait partie intégrante de ce processus et est aussi grandement influencée par l'épissage alternatif. Nous avons déjà abordé quelques exemples spécifiques où l'épissage intervient à différents niveaux du développement et donc de la différenciation cellulaire. L'avènement du séquençage à haut débit a popularisé les analyses transcriptomiques à grande échelle. Ainsi, de plus en plus d'équipes de recherche explorent le paysage transcriptomique de différents types cellulaires à l'échelle de l'organe et parfois même de l'organisme au complet. Bien sûr, le paysage d'évènements d'épissage alternatif n'a pas échappé à l'engouement. Par conséquent, il est maintenant possible d'établir des liens entre l'épissage alternatif et l'identité cellulaire à différentes étapes du développement ou en réponse à différents stress, et ce chez différents organismes. Nous allons discuter d'analyses d'intérêt particulier qui ont beaucoup participé à la cartographie du paysage d'épissage alternatif en fonction du type cellulaire.

Arabidopsis thaliana Reference Transcript Dataset 3 (AtRTD3) est une base de données qui a été montée à partir de 19 échantillons provenant de différents organes, ou ayant subi différents stress. AtRTD3 découle de deux précédentes versions AtRTD2 et AtRTD (Zhang *et al.*, 2015, 2017a) et

se base sur du séquençage de lectures longues qui a généré jusqu'à 170,000 transcrits (Zhang *et al.*, 2022). Bien qu'elle contienne des données de développement à l'échelle de l'organe, elle n'en contient cependant pas à l'échelle du type cellulaire. Une autre base de données d'intérêt est *Plant alternative splicing and transcription Data Base* (PastDB). PastDB a été montée sur des données publiques du *Sequence Read Archive* et recense plus de 516 échantillons d'*Arabidopsis* provenant de 63 études différentes. Parmi ces échantillons, on en retrouve notamment 42 à l'échelle du tissu ainsi que du type cellulaire, offrant ainsi une toute nouvelle résolution au profil d'épissage d'*Arabidopsis*. L'analyse d'expression différentielle et d'épissage alternatif y a été réalisée avec l'outil de bioinformatique *Vertebrate Alternative Splicing and Transcription Tools* (Vast-tools). Cet outil a notamment été utilisé pour monter l'équivalent de cette base de données chez les vertébrés; *Vertebrate Alternative Splicing and Transcription Database* (VastDB) (Tapial *et al.*, 2017). L'uniformisation des annotations d'évènements d'épissage dans PastDB et VastDB permet notamment des comparaisons évolutives entre les animaux et végétaux. De plus, la plateforme PastDB comporte d'autres outils intéressants tels que la prédiction d'impact protéique, les amorces de validation ou encore la force des sites d'épissage de chaque évènement d'épissage.

Très récemment, deux nouvelles plateformes hébergeant des données d'épissage alternatif de plantes ont été mis en place; PlaASDB et PlantExp. PlaASDB est une base de données d'épissage alternatif et de transcriptomique d'*Arabidopsis* et du riz (*Oryzasativa*) en réponse aux stress biotiques et abiotiques. Tandis que PlantExp, est axée sur la compilation de différentes espèces de plantes. PlantExp recense donc jusqu'à 85 espèces végétales différentes. Les deux plateformes ont aussi été construites à partir de données publiques du *Sequence Read Archive*. Tout comme pour PlantExp, plusieurs efforts ont été mis dans la production de bases de données d'espèces végétales ayant un intérêt agricole.

Le profil d'épissage alternatif d'*Arabidopsis* a donc été analysé à plusieurs reprises. Une des études notables est celle de Li *et al.*, (2016). Les auteurs ont rassemblé les données de séquençage d'ARN de 15 types cellulaires racinaires et de 3 zones développementales de racine (la zone méristématique, la zone d'élongation et la zone de maturation). Les différents types cellulaires y ont été collectés via l'utilisation de plants transgéniques exprimant une protéine fluorescente (GFP) sous un promoteur spécifique au type cellulaire. Une fois les protoplastes de ces plants extraits, ils sont triés par cytométrie en flux afin de séparer les cellules du bon type. Dans le but de comparer le niveau d'expression et d'épissage alternatif entre types cellulaires, les auteurs performant une analyse par paire en regroupant les types cellulaires adjacents. En comparant les isoformes différenciellement exprimés entre les types cellulaires adjacents et entre les trois zones

développementales de la racine, les auteurs suggèrent que l'épissage alternatif est plus significatif entre les zones développementales. Ils concluent donc que l'épissage alternatif intervient de manière plus importante dans le processus de maturation de la racine, indépendamment du type cellulaire. Cette hypothèse est renforcée lors de l'analyse d'expression de peptides par la spectrométrie de masse quantitative. On observe une corrélation positive plus importante entre le *fold change* relatif du niveau de transcrits et de protéines entre les zones développementales. Cette observation suggère que l'expression différentielle d'isoformes a un impact sur le protéome de la racine et que celui-ci est important à son processus développemental. Les résultats discutés ici ne représentent qu'une partie de ceux obtenus lors de cette étude. En général, Li *et al.*, (2016) présentent une des premières compilations de données d'épissage alternatif à l'échelle du type cellulaire chez *Arabidopsis*. Les auteurs ont monté un atlas d'évènements d'épissage alternatif de haute résolution à partir d'échantillons obtenus avec le même processus expérimental. De plus, cette étude a permis d'effectuer des observations importantes sur le développement de la racine.

Une autre étude d'intérêt est celle menée par Martín *et al.*, (2021) qui documente ici aussi le paysage d'épissage alternatif à l'échelle du type cellulaire. Les auteurs utilisent l'outil d'identification d'évènement d'épissage *vast-tools* mentionné plus tôt, sur des données de séquençage d'ARN collectées de différentes études. Cette analyse a mené à l'identification de 330 évènements d'épissage alternatif, épissés différemment en fonction du type cellulaire chez *Arabidopsis*. L'impact de ces deux études ainsi que leurs résultats détaillés sont discutés plus bas (section 3.2). Combinées, elles illustrent bien l'importance de la régulation par l'épissage alternatif sur l'identité cellulaire.

1.4.2 L'immunité et l'identité cellulaire

Tel que nous l'avons abordé précédemment, le système immunitaire végétal est complexe. Mis à part la propagation d'hormone ainsi qu'à d'autres exceptions près, les plantes ne disposent pas de système circulatoire de défense à proprement dit. Ainsi, chaque cellule doit assurer sa propre réponse de défense de manière autonome. Les plantes étant des organismes pluricellulaires, elles sont donc composées de différents types cellulaires dont l'identité va varier en fonction de leurs rôles, mais aussi de leur position dans la plante. Dépendamment de l'organe dans lequel ils se trouvent, les différents types cellulaires vont être confrontés à une gamme divergente de microorganismes. De plus, suivant sa position dans la plante, un type cellulaire donné ferait face à une dynamique d'infection différente. Il est donc tentant de penser que l'identité cellulaire

influencerait la réponse de défense.

On recense de plus en plus de cas qui valide cette hypothèse. Un des premiers cas rapportant une réponse de défense disparate entre organe est celui de *Hyaloperonospora arabidopsidis*. Lors de l'interaction entre *H. arabidopsidis* et *Arabidopsis*, des symptômes de susceptibilité sont visibles sur les racines et non sur les feuilles. Pourtant, chacun de ces organes expriment les gènes de résistance supposément suffisant à la résistance (Hermanns *et al.*, 2003). Depuis, de nombreux agents phytopathogènes ont été identifiés comme préférant un certain organe à un autre (Balmer and Mauch-Mani, 2013). *Fusarium oxysporum* par exemple favorise généralement la colonisation de racines. L'analyse transcriptomique de tissus de feuilles et racinaires lors de son infection a identifié une grande différence aux niveaux des gènes différenciellement exprimés. Ce résultat implique que différents tissus vont subir une reprogrammation spécifique durant la réponse de défense enclenchée par *Fusarium oxysporum* (Lyons *et al.*, 2015). On sait aussi que la perception de flg22 et Pep1 dans les cellules du cortex, de l'épiderme et du péricycle racinaires vont enclencher un changement transcriptomique spécifique qui va varier notamment en termes d'intensité. Cette reprogrammation est en partie due à l'action de facteurs de transcriptions combinés. Elle met en lumière l'existence d'une immunité spécifique à l'identité cellulaire (Wyrsh *et al.*, 2015; Rich-Griffin *et al.*, 2020a). Un autre exemple intéressant est celui des *AtPEPR*, qui sont des PRRs responsables de la détection de motifs moléculaires associés au dommage cellulaire (DAMP). Ces PRRs exhibent eux aussi un niveau d'expression différentiel à travers de multiples tissus végétaux lorsque élicité avec Pep et flg22 (Safaeizadeh and Boller, 2019). Plus récemment, l'analyse du traductome de différentes couches cellulaires de racines a été réalisée suite à l'infection par *Verticillium longisporum*, *Phytophthora parasitica*, et *Serendipita indica*. Chacun de ces trois microorganismes possède une méthode d'infection différente; vasculaire, pathogénique et mutualiste. Dans cette étude les auteurs ont isolé les cellules racinaires de l'épiderme, du cortex, de l'endoderme, du péricycle et de la stèle en utilisant des promoteurs spécifiques à ces types cellulaires. L'analyse du traductome permet d'identifier les ARNm en cours de traduction. Cette étude a souligné des différences notables du traductome entre les différentes couches de cellules. Les auteurs attribuent cette divergence aux différents modes d'invasion des microorganismes utilisés ici. En effet, les zones d'intense régulation de la traduction corrént avec la localisation de microorganisme dans la plante (Fröschel *et al.*, 2021). Ce phénomène est aussi observable entre les différents types cellulaires de feuilles. L'étude de la reprogrammation transcriptomique déclenchée lors de l'infection à *Pseudomonas syringae*, par séquençage de cellule unique sur des cellules de feuilles a permis d'étudier la dynamique d'infection bactérienne de plus près. Cette analyse a notamment identifié une divergence au

niveau de l'expression génique non seulement en fonction des types de cellules infectés, mais aussi plus particulièrement en fonction de la localisation de la bactérie et de la progression d'infection (Zhu *et al.*, 2023).

Un des types cellulaires le plus étudié en termes d'immunité est bien sûr les cellules de gardes. Ces cellules forment les stomates qui sont souvent le premier point d'entrée des agents pathogènes dans la plante. De ce fait, de nombreux mécanismes de défense y sont régulés différemment. Par exemple, l'expression du facteur de transcription *bZIP59* qui médie notamment la production de ROS et la fermeture stomatale en présence de *Pseudomonas syringae*, est constitutive seulement dans les cellules de garde (Song *et al.*, 2022). Il a aussi été démontré que l'expression des deux NLR, SNC1 et BON1, dans les cellules de gardes et dans le reste de la plante n'a pas le même effet. Ces NLRs sont impliqués dans la réponse de défense et lorsque sur-exprimés dans la plupart des tissus de la plante améliorent sa résistance à *Pseudomonas syringae*. Cependant, leur sur-expression dans les cellules de garde les rendent plus susceptibles en empêchant la fermeture stomatale (Yan *et al.*, 2019).

La réponse de défense va donc varier à différentes étapes, en fonction du tissu et du type cellulaire. Bien que le nombre d'études sur le sujet augmente de plus en plus, il reste encore beaucoup de chemin à parcourir afin d'obtenir une image plus complète de l'impact de l'identité cellulaire sur la réponse de défense. Le fait que la plupart des expériences réalisées en laboratoire en lien avec l'immunité aient été réalisées sur des feuilles, pour des raisons pratiques, limite grandement les données disponibles. Pourtant comme nous l'avons vu plus tôt, l'infection est un processus dynamique et mobile. Son étude en fonction du type cellulaire est donc plus proche des conditions naturelles d'infection.

1.4.3 L'épissage alternatif et l'immunité végétale

Les végétaux doivent affronter une pléthore d'agents phytopathogènes afin d'assurer leur propre survie. La mise en place des nombreux mécanismes de défense dont disposent les plantes est un processus énergivore et nécessite donc une régulation rigoureuse. Bien que l'étendue du rôle de l'épissage alternatif sur l'immunité végétale reste à être évaluée, plusieurs études pointent vers son implication comme étant nécessaire à une réponse de défense adéquate.

On recense de plus en plus d'exemples de réarrangements majeurs du paysage d'épissage alternatif chez les plantes lors d'une infection, notamment par des bactéries tels que *Pseudomonas*

syringae pv *tomato* (Howard *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014a). Le séquençage d'ARNm après colonisation par un agent pathogène viral a contribué à identifier l'importance de l'épissage alternatif dans la réponse antivirale (Mandadi and Scholthof, 2015; Du *et al.*, 2020; Qin *et al.*, 2020; Glushkevich *et al.*, 2022). En plus des agents pathogènes bactériens et viraux, l'infection par des champignons déclenche aussi de nombreux changements au niveau de l'épissage alternatif (Huang *et al.*, 2020).

Comme décrit plus tôt, l'épissage alternatif intervient à chacune des étapes du système de défense mentionnées précédemment. La détection d'agents pathogènes passant par la perception de PAMPs par les PRRs représente souvent l'initiation d'une réponse de défense. Suite à l'interaction entre un PAMP et un PRR, la protéine transmembranaire BAK1 elle-même activée par phosphorylation, phosphoryle à son tour BIK1. BIK1 est impliqué dans différentes cascades de signalisation menant éventuellement à la résistance. En conditions normales, BIK1 est maintenu dans un état inactif par CPK28 (Calcium-dependent Protein Kinase 28). CPK28 agit donc à titre de régulateur négatif de la défense. En présence d'agents microbiens, *CPK28* est épissé alternativement et un intron retenu y ajoute un codon STOP prématuré, le tout produisant une protéine tronquée moins fonctionnelle (Dressano *et al.*, 2020). La protéine transmembranaire Sd-RLK de *Nicotiana benthamiana* est chargée de la détection de bactérie via la perception de LPS. *Nt-Sd-RLK* génère lui aussi deux isoformes menant à la traduction d'une forme tronquée ainsi que d'une forme complète de la protéine. Le modèle d'action de ces deux isoformes illustre bien le rôle de l'épissage alternatif dans le maintien de l'équilibre entre le développement et la réponse immunitaire des plantes. L'hypothèse émise sur le mécanisme d'action de ces deux isoformes veut que la version tronquée de *Nt-Sd-RLK* possède toujours la capacité de se lier au LPS. Cependant, elle serait incapable d'enclencher la cascade de signalisation nécessaire à la résistance. Cet isoforme agirait donc à titre de garde permettant la détection bactérienne en tout temps, le tout en évitant d'induire de voies de signalisation non requises. Une fois la présence de LPS perçue, l'isoforme codant pour la forme complète de *Nt-Sd-RLK* est générée et la réponse de défense peut alors débiter (Sanabria and Dubery, 2016). Ce système de surveillance permet d'assurer une réponse immunitaire rapide et peu demandante en ressources.

Lorsque la détection de PAMPs ne suffit pas à ralentir la progression d'agent pathogène, la cellule végétale repose sur la perception d'effecteurs d'agents infectieux sécrétés dans le cytosol. Cette détection induit alors la ETI (section 1.1.2.2). L'identification de ces effecteurs est médiée par les protéines NB-LRR. *RPS4* (*Resistance to P. syringae 4*) un gène de résistance qui encode une protéine NB-LRR, subit de l'épissage alternatif qui génère plusieurs isoformes qui ont été

caractérisés. RPS4 confère la résistance face à *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 exprimant l'effecteur *AvrRps4* (Hinsch and Staskawicz, 1996). En plus de son isoforme cryptique, *RPS4* encode 6 isoformes au total. Plusieurs sont le résultat de la rétention de l'intron 2 et/ou 3 et chacun possèdent une version raccourcie ou absente du domaine LRR de RPS4. Bien que les isoformes générés soient tronqués, on soupçonne quand même qu'ils soient requis pour la résistance à *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000. En effet, l'expression de chacun de ces isoformes est induite lors d'une interaction avec *avrRps4* (Zhang and Gassmann, 2007). De plus, la délétion de l'intron 2 et/ou 3 est suffisante pour abolir la résistance à *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 et ce même en présence de la forme entière de la protéine. De même que la complémentation d'un mutant *rps4* avec la forme complète ainsi que les formes tronquées de RPS4 ne suffit pas à restaurer la résistance. Cette observation suggère qu'un ratio particulier entre les différentes formes de RPS4 doit être atteint pour assurer sa fonctionnalité (Zhang and Gassmann, 2003, 2007).

Une fois la présence d'agent pathogène détecté via les PAMPs ou les effecteurs, la réponse de défense adéquate est enclenchée et l'expression de gènes de résistance démarre. Là encore, l'épissage alternatif de facteurs clés du mécanisme d'immunité végétale est requis. Récemment un variant d'épissage de EDS1 a été identifié chez *Vitis vinifera*. Bien que sa fonction biologique n'ait pas encore été caractérisée, il s'agit du premier cas rapporté d'épissage alternatif chez la protéine EDS1 (Voss *et al.*, 2023). Parmi les nombreux régulateurs du système immunitaire végétale, on compte notamment la famille des facteurs de transcription WRKY. Cette classe de facteurs de transcription est entre autres responsable de l'expression de plusieurs gènes de résistance (Wani *et al.*, 2021). *OsWRKY62* et *OsWRKY76* encodés dans le riz sont tous les deux impliqués dans la résistance à l'infection par le champignon *Magnaporthe oryzae* ainsi que la bactérie *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Ces deux facteurs de transcription agissent en tant que régulateurs négatifs de la réponse de défense. Chacun possède deux isoformes, une version tronquée avec une affinité réduite au site de liaison W retrouvé dans les gènes ciblés par les WRKY et une version entière. Puisque l'expression des protéines tronquées est favorisée pendant l'infection, l'hypothèse émise implique qu'elles agissent en tant que régulateur dominant-négatif. Les différents isoformes de *OsWRKY62* et *OsWRKY76* étant capables de former des homo- et hétéro-complexes, on soupçonne que leur activité de régulateur dominant-négatif provient de leurs interactions inter-protéines (Wahl *et al.*, 2009). Récemment, de nombreux variants d'épissages ont aussi été identifiés chez les *CaWRKY* de *Capsicum annuum*. Sur les 62 *CaWRKY* identifiés, 17 arborent des variants d'épissage qui sont exprimés lors d'une infection par le virus

de la mosaïque du concombre (CMV). D'ailleurs, plusieurs de ces variants possèdent des motifs reconnus pour être associés à différents stress (Zheng *et al.*, 2019).

Un autre acteur clé de la réponse de défense est la kinase MPK4. Cette kinase activée après détection de flg22 est responsable de l'expression de nombreux gènes de résistance (Meng and Zhang, 2013), mais aussi de leur épissage alternatif. Le mutant *mpk4* n'est plus capable d'induire le changement d'épissage alternatif requis à la résistance. Les mutants *mpk3* et *mpk6* quant à eux n'ont pas d'effet sur le paysage d'épissage alternatif. Ces expériences démontrent l'importance de MPK4 dans la régulation de l'épissage alternatif durant la réponse de défense. Puisque de quelques études ont déjà identifié certains facteurs d'épissage comme étant des cibles de phosphorylation de MPK4 (van Bentem *et al.*, 2006; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2008; Rayapuram *et al.*, 2018), il est juste de penser que le mécanisme de régulation de l'épissage alternatif de MPK4 passe donc par l'activation de ces facteurs. Parmi les gènes dont l'épissage est influencé par MPK4, on compte notamment *CPK28*, mentionné ci-dessus, *SERK4* et *CRK29* tous deux requis pour la mort cellulaire programmée (Bazin *et al.*, 2020).

Comme mentionné plus tôt, le processus d'épissage alternatif lui-même est régulé durant une interaction avec un microorganisme. De nombreux facteurs d'épissage sont donc impliqués dans l'immunité végétale. C'est le cas de *SUA* et *RSN2*. Ces deux facteurs d'épissages sont nécessaires à la réponse de défense induite par les PAMPs. Ils sont responsables de l'épissage des deux RLKs, *CERK1* et *SNC4*. *CERK1* est en charge de la perception de chitine tandis que *SNC4* est un inhibiteur de défense. Le mutant *sua* présente non seulement un seul des deux variants d'épissages de *SNC4*, celui avec un intron retenu, mais il est aussi plus susceptible à l'infection par *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 *hrc* (Zhang *et al.*, 2014b). Un autre bon exemple de modulation de la machinerie d'épissage alternatif nécessaire à la résistance se trouve en *SmD3*. Il s'agit d'une des protéines de l'épissosome, elle médie en outre le contact entre le pré-ARNm et les snRNP U. Lorsque mutés, *SmD3-a* et *SmD3-b* rendent la plante plus susceptible à l'infection par *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000, le tout accompagné d'une diminution drastique de l'expression de gènes de résistance. De plus, leur mutation entraîne un changement significatif d'épissage alternatif en présence d'agents pathogènes. Le mutant *smd3-b* plus particulièrement affecte le développement des stomates, ce qui participe sûrement à la propagation de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (Golisz *et al.*, 2021).

En plus des nombreux exemples que nous venons d'aborder, plusieurs autres acteurs de l'immunité végétale subissent de l'épissage alternatif. Une liste non-exhaustive a été montée par Kufel *et al.*, (2022).

L'épissage alternatif assure donc une fonction importante dans la réponse immunitaire chez les plantes, ce qui en fait donc une cible de choix pour plusieurs agents phytopathogènes.

L'oomycète *Phytophthora sojae* par exemple, sécrète l'effecteur PsAvr3c au cours de son processus d'infection chez le soja. PsAvr3c interagit avec GmSKRPs qui à son tour forme un complexe avec plusieurs composantes de l'épissosome. GmSKRP agit en tant qu'inhibiteur de la réponse de défense et son interaction avec PsAvr3c permet de la stabiliser. La surexpression de *GmSKRP* et *PsAvr3c* affectent grandement l'épissage de nombreux gènes de résistance en plus de promouvoir la propagation de *Phytophthora sojae* (Huang *et al.*, 2017). *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 lui aussi est capable d'interférer avec le processus d'épissage alternatif d'*Arabidopsis*. HopU1 est un effecteur sécrété par *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 qui cible jusqu'à 5 protéines liant l'ARN (Fu *et al.*, 2007). Parmi ces 5 protéines, on compte notamment (GRP7 Glycine-rich Protein 7) qui affecte l'épissage alternatif de nombreux gènes. GRP7 se lie entre autres directement avec les ARNm de *FLS2* et *EFR*. HopU1 agit en inhibant la liaison de GRP7 avec ses ARNm cibles menant éventuellement à la susceptibilité de la plante (Nicaise *et al.*, 2013).

Comme nous avons pu le constater, il existe un lien essentiel entre l'épissage alternatif et l'immunité végétale. Bien que le mécanisme global par lequel l'épissage alternatif influence la défense n'ait toujours pas été élucidé, le nombre grandissant d'études sur le sujet nous permet de l'entrevoir. En l'absence d'agent pathogène, l'accumulation de formes non ou peu fonctionnelles de protéines de défense, ou encore la traduction de transcrits alternatifs d'inhibiteurs de la défense permet le maintien de la plante dans un état normal de croissance. La présence d'agents pathogènes déclenche un changement majeur d'épissage, et ainsi plusieurs voies du système de défense sont alors activées. Une fois actives certaines protéines clés de l'immunité vont elles-mêmes avoir un impact sur l'épissage alternatif de nombreux gènes de résistances. Leurs effets sur l'épissage viennent de leur capacité à agir sur l'activité de facteurs d'épissages ou encore à interagir directement avec le pré-ARNm. Certains membres de l'épissosome ont aussi un rôle dans la régulation de l'épissage en réponse à un stress biotique. Cependant, la manière dont ces membres de la machinerie d'épissage perçoivent les stimuli n'est pas encore établie. Bien que pour l'instant, beaucoup de questions restent sans réponses, il semble évident que l'étude du lien entre l'épissage alternatif et l'immunité pourrait dévoiler un tout nouveau pan de la défense végétale.

1.5 Hypothèse et objectifs

Dans les trois sections précédentes nous avons souligné comment l'immunité, l'identité cellulaire et l'épissage alternatif interagissent les uns avec les autres. En effet, de plus en plus d'études mettent en évidence l'impact de l'épissage alternatif sur l'immunité ainsi que son lien sur l'identité cellulaire. Nous avons aussi discuté des nombreuses évidences qui pointent vers l'importance de l'identité cellulaire sur l'immunité. Jusqu'à maintenant chacun de ces pans majeurs de la biologie végétale ont été analysés en paire. Pourtant de nombreuses études laissent entendre que ces trois pans soient liés.

Nous avons donc émis l'hypothèse suivante; l'épissage alternatif, l'immunité et l'identité cellulaire sont interconnectés et interagissent tous les trois afin de maintenir l'équilibre nécessaire à la croissance végétale.

Afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse nous nous sommes posé les objectifs suivants :

- . Développer une technique efficace d'isolation d'une variété de types cellulaires de différents organes d'*Arabidopsis*, qui permet de conserver l'identité cellulaire.
- . La construction d'un atlas de données transcriptomiques de qualité provenant de plusieurs types cellulaires ayant été obtenus par le même procédé expérimental.
- . Analyser le paysage d'épissage alternatif à travers ces types cellulaires.
- . Observer les changements d'expression génique et d'épissage alternatif de gènes liés à l'immunité de manière spécifique au type cellulaire.

Les travaux de recherches présentés ici visent donc à combler le fossé entre ces trois pans et de les étudier comme un tout.

CHAPITRE II: Comprehensive mapping of Arabidopsis alternative splicing landscape reveals key insights into plant development and immunity.

TeuraBarff, Ingrid Berenice Sanchez Carrillo, Valeria Paola ParraGutiérrez, Mélodie B. Plourde, David L. Joly, Hugo Germain

Le contenu de ce chapitre est présenté sous forme d'article scientifique qui a été soumis en anglais dans la revue scientifique *Journal of Experimental Botany* le 04 Avril 2024.

2.1 Contributions des auteurs

Teura Barff, David Joly et Hugo Germain ont conjointement conceptualisé le projet, émis les hypothèses et établi les objectifs de recherche. Teura Barff a réalisé l'analyse de données, la rédaction et la présentation visuelle de tous les résultats. Teura Barff, Ingrid Berenice Sanchez Carrillo, Valeria Paola Parra Gutiérrez et Mélodie B. Plourde ont participé à la réalisation des expériences en laboratoire. Teura Barff, Ingrid Berenice Sanchez Carrillo et Valeria Paola Parra Gutiérrez ont mis en place le protocole d'extraction de protoplastes. Tous les auteurs ont révisé l'article avant sa soumission.

2.2 Résumé de l'article

Les différentes étapes de l'épissage alternatif chez les plantes ainsi que son mécanisme de régulation ont déjà été extensivement étudiés. Cependant, son impact plus large sur l'identité cellulaire et l'immunité végétale reste à être évalué. En utilisant des plants transgéniques d'*Arabidopsis*, nous avons trié par cytométrie en flux 11 types cellulaires différents venant d'organes aériens et racinaires. Les données de séquençage d'ARN ont été analysées avec vast-tools. Elles nous ont permis de générer le paysage d'épissage alternatif de différents types cellulaires tous obtenus par le même processus expérimental. L'analyse de l'expression et l'épissage différentiel spécifiques au type cellulaire soulignent l'importance de l'épissage

alternatif sur la régulation de la transcription et de l'épissage en tant que tel. L'épissage alternatif est aussi étroitement lié à l'identité cellulaire. En utilisant des types cellulaires proches en termes d'identité, notre analyse a identifié des événements d'épissage propre à certaines étapes spécifiques du développement. Parmi les types cellulaires utilisés ici, les cellules de la columelle exhibent une régulation de l'épissage plus intense, avec une attention particulière aux gènes liés à l'immunité. Ultiment, notre analyse a permis de générer un outil précieux pour l'étude de l'immunité, de l'identité cellulaire et l'épissage alternatif.

2.3 Article

Comprehensive mapping of Arabidopsis alternative splicing landscape reveals key insights into plant development and immunity.

Short title: Alternative splicing profile of Arabidopsis across cell types.

Teura Barff¹, Ingrid Berenice Sanchez Carrillo¹, Valeria Paola Parra Gutiérrez¹, Mélodie B.Plourde¹, David L. Joly², Hugo Germain¹

1) Department of Chemistry, Biochemistry and Physics and Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H9, Canada

2) Département de biologie, Université de Moncton, Moncton, NB, E1A 3E9, Canada

TB : Teura.Barff@uqtr.ca

IBSC: Ingrid.berenice.1194@gmail.com

VPPG : Valeria.p.parra96@gmail.com

MBP : Melodie.Bplourde@uqtr.ca

DLJ : David.joly@umoncton.ca

HG: Hugo.germain@uqtr.ca

Corresponding author: Hugo.germain@uqtr.ca

Date of submission: 2024-04-04

Number of tables: 1

Number of figures: 6

Word count: 5,710

Supplementary Tables: 7

Supplementary Figures: 6

Highlight

Alternative splicing analysis of aerial and root cell types gathered via the same experimental process, uncovers links between plant immunity-related genes and cell identity.

Abstract

The different steps of alternative splicing (AS) in plants and its regulatory mechanisms have already been studied extensively. Its broader impact on cell identity, plant immunity-related genes and their study as a whole remains to be investigated. Using transgenic plants, we sorted 11 different *Arabidopsis thaliana* cell types ranging from root to aerial organs using fluorescence-activated cell sorting. RNA-seq data were analysed with vast-tools and enabled us to generate a high resolution AS landscape across multiple cell types, all collected through the same experimental procedure. The analysis of cell type-specific gene expression and alternative splicing events highlight the importance of AS on transcription and AS regulation itself. AS is also shown to be tightly linked to cell identity. By using closely related cell types, we captured alternative splicing events involved in specific stages of plant development. The columella cells amongst others show intensified AS regulation and an interesting splicing profile especially regarding immunity-related genes. Overall, our analysis brings a valuable tool in the study of cell type identity, plant immunity, and alternative splicing.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, alternative splicing, fluorescence-activated cell sorting, cell-type, transcriptome, gene expression

Introduction

Alternative splicing (AS) is the process by which a single gene produces multiple messenger RNAs. It is believed that AS provides eukaryotes the level of transcriptome and proteome complexity necessary to adapt to environmental cues (Reddy *et al.*, 2013; Chaudhary *et al.*, 2019b). This widespread process is well documented in mammals and higher plants. In the human genome, it is estimated that approximately 94% of multiexonic genes undergo AS (Wang *et al.*, 2008), while plants are estimated to alternatively splice up to 62 % of multiexonic genes under normal developmental conditions (Marquez *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2021). The four main types of alternative splicing events (ASEs) are exon skipping (EX), intron retention (IR), alternative donor site (ALTD), and alternative acceptor site (ALTA). Intron retention is the most prevalent type of alternative splicing event in plants, with up to 65% of intron-containing genes subjected to AS (Ner-Gaon *et al.*, 2004; Marquez *et al.*, 2012), as opposed to 5% in humans (Wang *et al.*, 2008). AS may lead to (i) translation into functional proteins thus diversifying proteome complexity, (ii) introduction of a premature terminal codon leading to degradation through nonsense-mediated mRNA decay (NMD) (Kalyna *et al.*, 2012; Drechsel *et al.*, 2013; Ohtani and Wachter, 2019), (iii) nuclear sequestration for further mRNA processing on demand (Göhring *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017b; Hartmann *et al.*, 2018), and (iv) translation into truncated proteins (Liu *et al.*, 2013b). While AS regulation mostly relies on splicing factors like serine-arginine-rich (SR) proteins (Hertel and Maniatis, 1999; Erkelenz *et al.*, 2013) and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) (Huelga *et al.*, 2012), AS is considered a co-transcriptional process, thus will be greatly impacted by chromatin structure and by the speed and phosphorylation state of the mRNA polymerase II (Zhu *et al.*, 2018c).

Evidence of the impact of AS in plant development and cell type differentiation keeps emerging. While uncovering the role of specific AS isoforms in a precise stage of plant growth has been the focus of many, the advancement of high throughput transcriptomic analyses has enabled the mapping of the plant AS landscape to become increasingly common. For example, the AS mapping of the potato *Solanum tuberosum L.*, the black gram *Vigna mungo* and even the cotton *Gossypium hirsutum* were recently published (Zhang *et al.*, 2022; Hazra *et al.*, 2023; Ogungbayi *et al.*, 2023). *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) is one of the most studied plant species, including when it comes to AS research. High-resolution databases compiling the AS landscapes of *Arabidopsis* have brought valuable information and tools to understand the global impact of plant AS (Martín *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2023). Some studies focused on AS across cell types (Li *et al.*, 2016b; Martín *et al.*, 2021; Misra *et al.*,

2023), while others focused on AS under various conditions like abiotic and biotic stresses (Martín *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2023), the latter highlighting the broader importance of AS when facing immune challenges.

Amongst all the factors that influence plant immunity, the impact of cell identity has until recently been seldom investigated. The interest in organ-specific defense response emerged with the need to understand colonization patterns of naturally occurring pathogens. Some pathogens will favor given organs while others are able to infect the entire host (Balmer and Mauch-Mani, 2013). One of the first study recording organ-specific disease was done on the oomycete *Hyaloperonospora arabidopsidis*. During incompatible interaction, *H. arabidopsidis* causes resistant-like symptoms in Arabidopsis leaves but not in roots, although the plant still expresses the immune regulators *EDS1* and *NPR1* in both plant parts (Hermanns *et al.*, 2003). Although evidence of organ-specific immune response has been mounting in the past two decades, the study of cell type-specific immunity related genes is still at its starting point.

For example, the perception of flagellin peptide flg22 by multiple Arabidopsis root cell types was shown to be sufficient to trigger PAMP-Triggered Immunity (PTI), although, the intensity of the triggered response varies according to the cell type (Wyrsh *et al.*, 2015). In more detail, flg22 and the plant elicitor peptide 1 (Pep1) induce a different transcriptional network in the root epidermis, cortex, and pericycle by modulating the expression of genes with various transcription factor binding motifs (Rich-Griffin *et al.*, 2020b). Very recently (Tang *et al.*, 2023), characterized the Arabidopsis leaf cell type specific responses to *Colletotrichum higginsianum* infection using single-cell transcriptomics, further asserting the importance of cell identity on plant immunity.

Many steps of the plant defense response are paired with alternative splicing of resistance-related transcripts. For instance, PTI induction will trigger AS of CPK28 transcripts, leading to the accumulation of a non-functional truncated CPK28 protein, thus alleviating its role as a negative regulator of plant defense (Dressano *et al.*, 2020). Similarly, the resistance gene *RPS4* from Arabidopsis, which confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* strain DC3000 (DC3000) expressing AvrRps4, is also subjected to AS. More specifically, removal of one or two of the introns found in the dominant splice variant of *RPS4* did not affect its transcripts level but suppressed the function of the protein it encodes. This suggests that multiple variants of the RPS4 protein are required for proper immune response (Zhang and Gassmann, 2003). Phytopathogens are also able to modulate the host splicing machinery, as is the case for the *Phytophthora sojae* effector PsAvr3c (Huang *et al.*, 2017). Those are just a few examples showing the importance of proper mRNA splicing in plant defense.

Despite evidence of cell identity, immunity-related genes, and AS being interconnected, very little effort has been invested so far to study these processes as a whole. While extensive mapping of the *Arabidopsis* AS landscape has already been performed, these databases were generated using publicly available aggregated datasets from varying sources. The isolation of different cell types is a limiting step, as the number of cell types varies from one developmental stage to another, rendering this process arduous. Furthermore, techniques like manual organ dissection and laser-capture micro-dissection can be less precise and unpractical. In this study, we used cell type-specific reporter transgenic lines coupled with fluorescence-activated cell sorting (FACS) to collect 11 different *Arabidopsis* cell types from roots, stem, and leaves. In an effort to uncover the impact of AS on cell identity and immunity-related genes, we compared gene expression and alternatively spliced events across these 11 different cell types with a particular focus on immunity-related transcripts.

Our results demonstrate the feasibility of a pipeline combining flow cytometry sorting of fluorescent protoplasts from 11 cell types, followed by RNA extraction and deep-sequencing. We observe that gene expression is poorly connected with alternative splicing and successfully identify deregulated genes and AS events which are specific to individual cell types or groups of cell types. We also uncover the previously unreported importance of AS in regulating immunity-related genes, more specifically in columella cells. The use of closely related cell types enabled us to capture subtle changes in AS regulation needed during development and immune regulation. Overall, the dataset generated here provides a valuable tool in the study of cell type identity, plant immunity-related genes, and alternative splicing.

Methods

Plant material and growth conditions

The *Arabidopsis thaliana* Col-0 transgenic plants used in this study were kindly provided by Pr. Sebastian Wolf from Universität Heidelberg (Schürholz *et al.*, 2018) and are listed in Table 1. Plants were grown on Murashige and Skoog (MS) medium (2.15 g/L MS Basal salt mixture (Phytotech), 1 % (w/v) agar, pH 5.8) supplemented with 30 μ M dexamethasone (DEX) (Sigma-Aldrich). Once sowed, plates were placed in growth chambers with 10h/14h light/dark cycles. To ensure enough cells from each cell type were present, transgenic lines harbouring aerial cell type-specific promoters were grown for longer than the ones with root cell type-specific promoters. Therefore, *pLTP1*, *pUFO*, *pREV*, *pMLI*, and *pAPL* were incubated horizontally for 21 days, while

pATHB8, *pSCR*, *pTMO5*, *pSMLX5*, *pPXY*, and *pCASPI* transgenic lines were incubated vertically for 14 days.

Protoplast extraction

Protoplasts were extracted from the above-mentioned seedlings following the protocol described by Bargmann and Birnbaum (2010) and Sanchez Carrillo *et al.*, (2023) with the following modifications. For each Arabidopsis transgenic line, sections of plants containing the necessary cell type were cut from 30 MS plates with a minimum of 200 seedlings per plate. The sections were incubated in protoplasting solution (1 % cellulase from *Trichoderma* sp. (Sigma-Aldrich), 0.3 % Macerozyme (Sigma-Aldrich), 0.4 M mannitol, 20 mM KCl, 20 mM MES, 10 mM CaCl₂, 5 mM β -mercaptoethanol, 0.1 % BSA) for 1h30 on an orbital shaker at 75 rpm. Protoplasts were passed through a 30 μ m filter, centrifuged for 10 min at 500 g and resuspended in fresh W5 buffer (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 2 mM MES, pH 5.7). To ensure mTurquoise2 expression remained after extraction, protoplasts were checked under confocal microscopy before proceeding to FACS.

Confocal microscopy

mTurquoise2 expression was observed in seedlings prior to protoplast isolation with a Leica TCS SP8 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystem). Seedlings were stained with 1 ng/mL propidium iodide (PI) for 30 min before mounting in water under a coverslip. Excitation/Emission wavelengths during acquisition were 405 nm/460-520 nm for mTurquoise2, and 488 nm/590-660 nm for PI (Supplementary Fig. S1). Protoplasts before and after cell sorting were also visualized for mTurquoise2 expression using the same excitation and emission wavelength mentioned above (Supplementary Fig. S2A and Fig. S2B).

Fluorescence Activated Cell Sorting

FACS was performed on freshly extracted protoplasts using the BD FACS Melody Cell Sorter with a 100 μ m nozzle and W5 buffer as sheath fluid. Flow rate was 1%, and event rate was kept under 6,000 events/s. The BD FACS Melody Cell works with an operating pressure of 23 psi and a drop frequency of 34 kHz. mTurquoise2-positive protoplasts were identified by plotting events obtained with a laser of 405 nm and a bandpass filter of 528/545 nm against events obtained with a laser of 488 nm and a bandpass of 527/532. For each experiment, protoplasts extracted from transgenic plants grown on MS media without DEX were used to differentiate mTurquoise2 fluorescence from autofluorescence (Supplementary Fig. S2C-H). 50,000 to 100,000 cells were sorted and collected in 3 to 6 replicates for each cell type. Samples were harvested at 4°C directly in RLT lysis buffer (Qiagen) and stored at -80°C. In total, 58 samples were collected and processed for sequencing.

RNA isolation and sequencing

RNA was extracted with the RNeasy Micro kit (Qiagen), with the recommended DNase treatment according to the manufacturer's protocol. Quantification was performed with the Quanti-iT Ribogreen RNA reagent kit (Invitrogen) using the manufacturer's low-range standard curve. The Synergy H1 Multimode microplate reader (Biotek) was used to observe the Quanti-iT Ribogreen RNA reagent's fluorescence when bound to RNA, with an Excitation/Emission wavelength of 485/520 nm. QC was done with a 2100 Bioanalyzer (Agilent). Libraries were generated with a Low Input RNA Library Prep kit for Illumina (NEB) and sequenced on an Illumina NovaSeq 6000 S4 system in paired-end reads (100bp) by the *Centre d'expertise et de services Génome Québec*.

RNA-seq Data Analysis

Over 2 billion raw reads were trimmed using Trimmomatic v0.39 (Bolger, A. M. *et al.*, 2014) to remove the sequencing adapters. The alignment was performed with vast-tools v2.2.0 (Irimia *et al.*, 2014; Tapial *et al.*, 2017). Trimmed reads were mapped to the Arabidopsis (araTha10 version 23.06.20) library from vast-tools (Martín *et al.*, 2021). This database was generated using TAIR10 and Ensembl Plants v31 as scaffold. The vast-tools alignment step slices reads to 50nt fragments with a sliding window of 25nt to increase the mapping of junctions.

Alternative splicing analysis

All of the AS analyses were done using the vast-tools v2.2.0 toolset. By mapping reads to Exon-Exon Junctions, and Exon-Intron Junctions, vast-tools is able to generate the percent spliced-in value (PSI). Only the splicing events with sufficient read coverage (above or equal 'LOW' coverage) in at least 10 samples across cell types were considered. Furthermore, only the samples that passed the binomial test for IR were kept for further analysis. This test assesses proper balance of read at the exon-intron junction and is used to filter out IR events with read imbalance as described in Braunschweig *et al.*, (2014). The script used to identify cell type-specific ASE was developed by Martín *et al.*, (2021) and is available at <https://github.com/vastdb-pastdb/pastdb>. At this step, root and aerial cell types were analysed separately (Table 1). For the different cell types to be included in the analysis, each group needed a minimum of two replicates with sufficient coverage and the minimum number of cell types with sufficient coverage from each organ was four. To be considered cell type-specific, (i) a splicing event required an average $|\Delta\text{PSI}|$ of at least 25 when compared to the average of all other samples from either root or aerial cell types ($|\text{global } \Delta\text{PSI}| > 25$). Moreover, (ii) the ASE needed a difference in average PSI of at least 15 when compared to any other cell type ($|\text{minimum } \Delta\text{PSI}| > 15$). Finally, the minimum PSI range (i.e. the difference

between the maximum value from a cell type with the maximum value from another) for the event to be considered AS among groups was 2.

The immunity-related gene list was compiled using the ‘defense response’ annotation and children terms as a filter through the GO annotation of *Arabidopsis* list from TAIR (predicted and experimental) (Berardini *et al.*, 2004). This screening led to 4,869 annotations and 2,822 genes (Supplementary Table S1)

Differential gene expression assessment

The differential gene expression step was executed with a vast-tools script built by Martín *et al.*, (2021). The script is accessible at the following link: <https://github.com/vastdb-pastdb/pastdb>. For this analysis, aerial and root cell types were separated and only genes with a median expression cRPKM ≥ 5 in at least one cell type were considered. A gene with an absolute fold change ≥ 2 when compared to the median of each cell type, a fold change ≥ 5 when compared to the global median of all the other conditions, and an absolute difference in cRPKM ≥ 2 with every other cell type would be considered cell type specific. The normalized counts of the genes regulated by the cell type-specific promoters (Table 1) were calculated with DESeq2 (Love *et al.*, 2014) (Supplementary Fig. S3C).

GO term analysis

The functional annotation analysis was done with the DAVID tools v2023q2 (Huang *et al.*, 2009; Sherman *et al.*, 2022) using a custom background set of genes. This set is constituted of genes that pass the same quality control criteria used to define the cell type-specific AS or genes.

Results

Cell type identity is conserved upon cell sorting

The transgenic plants of *Arabidopsis* Col-0 used here carried the gene encoding for the fluorescent protein mTurquoise2 (Goedhart *et al.*, 2012), under the control of the inducible promoter pOP. This promoter relies upon the binding of the chimeric transcription factor LhG4. The interaction between LhG4 and the glucocorticoid Dexamethasone will cause the relocation of LhG4 to the nucleus where it is able to bind pOP and activate it (Craft *et al.*, 2005). The cell type specificity aspect of this system comes from the expression of LhG4, which is controlled by a cell type specific promoter (Fig. 1A) (Schürholz *et al.*, 2018). This multilayered system has enabled us to work with 11 different *Arabidopsis* transgenic lines, each harbouring a different cell type specific promoter. To collect only the targeted cell types, the transgenic plants were grown on DEX-containing medium (Fig. 1B) and then used for protoplast extraction followed by sorting via

FACS (Fig. 1B). To prevent protoplast dedifferentiation, we acted in a timely fashion, while still making sure that enough material was collected to proceed to FACS. The cell types subjected to Illumina sequencing are spread across the roots and aerial parts of the plants (Fig. 1A and Table 1).

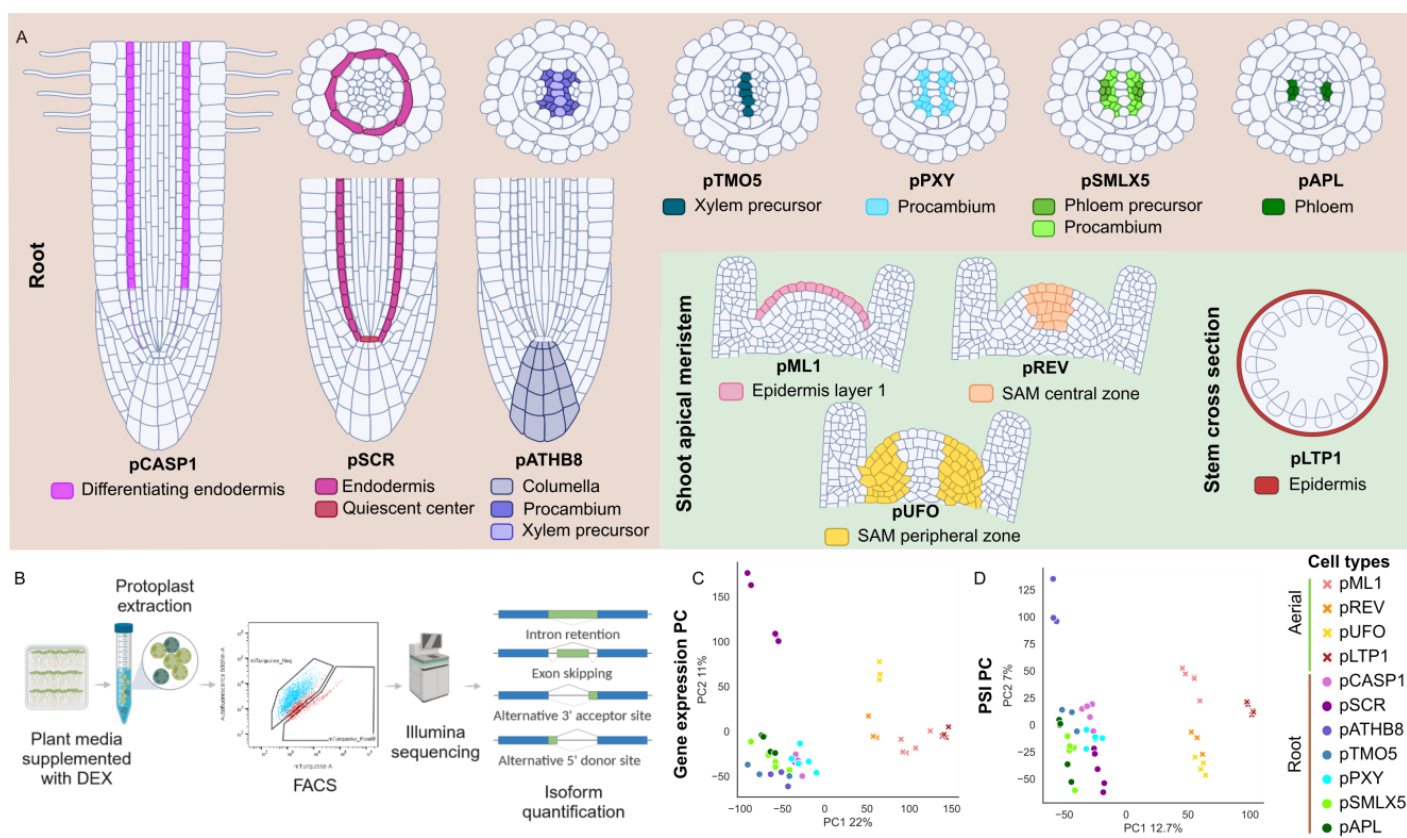
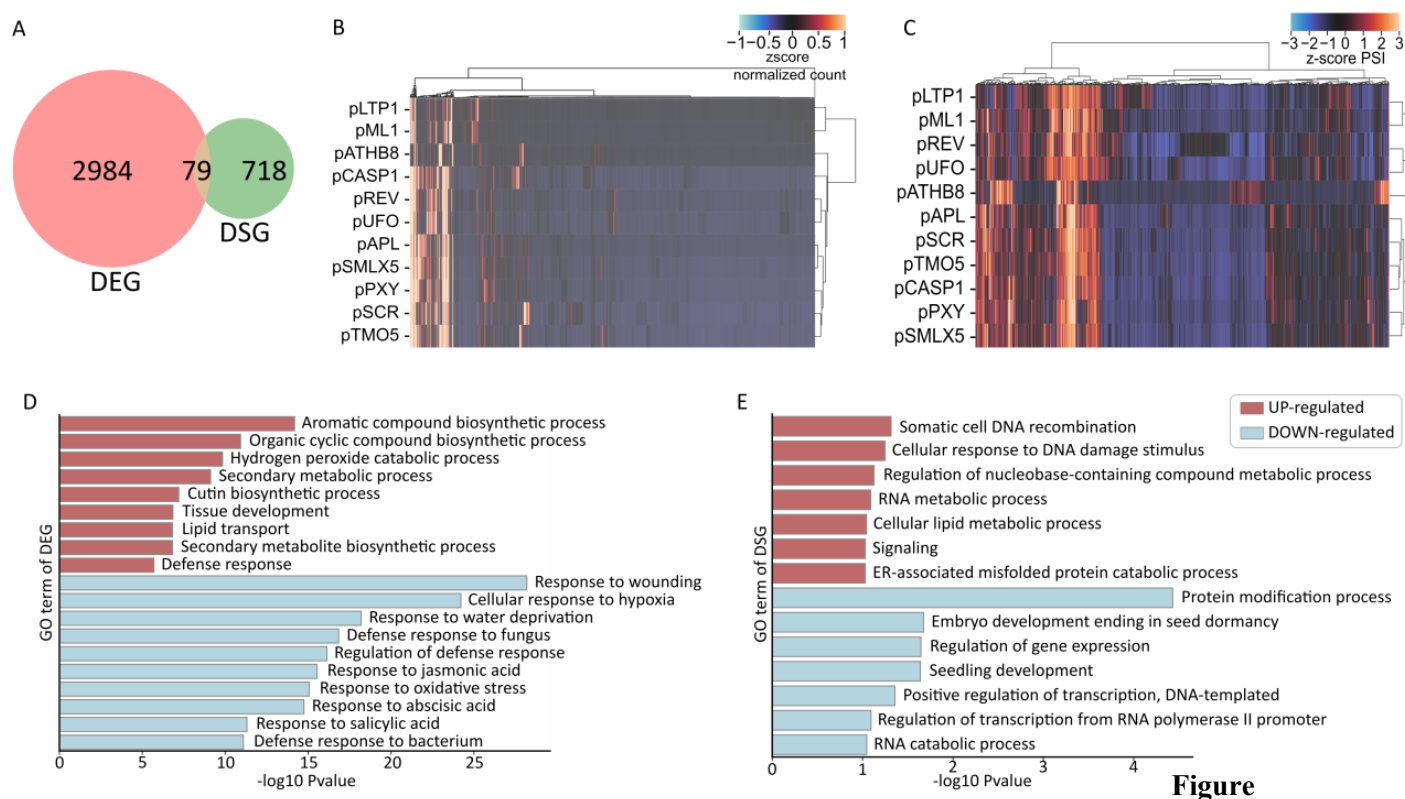


Figure 1. Cell type identity is conserved upon cell sorting.

(A) Schematic representation of the cell types selected for this study. Green zone represents cell types found in aerial plant parts. Brown zone represents cell types in roots. Root cells are depicted either in the full root or in cross section. (B) Experimental workflow used to collect 11 different cell types of *A. thaliana* for AS analysis. Plants are grown on a DEX-containing medium and used for protoplast extraction. Protoplasts are then sorted through FACS. To select only targeted cell types expressing mTurquoise2, protoplasts from plants grown on medium without DEX and therefore not producing mTurquoise2, are used as controls. The gating strategy to sort mTurquoise2-positive cells shown here is of pSMLX5. Following FACS, sorted protoplasts proceed to RNA extraction, library preparation and sequencing. PCA done on (C) cRPKM of genes and (D) PSI values of splicing events that passed the quality filters described in Methods.

To ensure that the experimental design of this study is reliable, we first confirmed that extracting protoplasts and sorting them would have minimal effect on the integrity and identity of the cells.

The confocal images of protoplasts taken before and after cell sorting confirmed that protoplast extraction and cell sorting did not affect mTurquoise2 emission (Supplementary Fig. S2A). They also confirmed that the protoplast population collected through FACS was indeed enriched with mTurquoise2-emitting cells (Supplementary Fig. S2A and Fig. S2B). Both the confocal images and the FACS data assured that protoplasts do conserve their integrity and therefore can be used for RNA-sequencing. With the RNA-seq data gathered, we were able to calculate the percent spliced-in values (PSI) of each ASE and the transcripts cRPKM (corrected for mappability) using vast-tools. After applying the quality filters described in Methods, we performed a principal component analysis (PCA) with the transcripts' cRPKM values (Fig. 1C) and the ASEs PSI values (Fig. 1D). This analysis shows that the different cell types cluster together according to the organ from which they originate. The clustering of the replicates is also visible on the Spearman cluster heatmap (Supplementary Fig. S3A and Fig. S3B). In addition to the heatmap and PCA, we also looked at the normalized read counts of the genes natively controlled by the cell type-specific promoters used in this study (Table 1, Supplementary Fig. S3C). Most of the genes observed exhibit the highest counts in their respective condition. Although *REV*, *LTP1*, *PXY*, *CASPI*, and *APL* did not demonstrate the highest level of counts in the cell type they belong to, they do harbour the second to fourth highest count number. This can be explained by the fact that some of those genes are expressed in similar cell types. *LTP1* for instance, has the highest count number in the cell type represented by *pML1*, which is expected as both *ML1* and *LTP1* are expressed in the epidermis (Thoma *et al.*, 1994; Sessions *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2020). It is also the case for *CASPI*, which has the highest count number in *pSCR*. While being expressed in the quiescent center, *SCR* is also expressed in the endodermis like *CASPI* (Malamy and Benfey, 1997; Roppolo *et al.*, 2011). *SMLX5* and *APL* are both specific to phloem cells, which is reflected by *SMLX5* having the highest number of count in *pAPL* (Bonke *et al.*, 2003; Wallner *et al.*, 2017). These results demonstrate that the procedure used herein does not significantly alter cell identity and can then be used to enrich cell populations for further characterization.



Figure

2. Gene expression is uncoupled from alternative splicing.

(A) Venn diagram of cell type-specific differentially expressed genes (DEGs) and cell type-specific differentially spliced genes (DSGs). Genes with at least one alternatively spliced event (ASE) were considered a DSG. Z-score cluster heatmap of (B) normalized counts from DEG and (C) PSIs from differentially spliced events (DSG). Clustering was done using the ward method. The conversion to z-score was performed after the hierarchical clustering so that it only affects the color grading. Enriched Gene Ontology (GO) terms in DEGs (D) and DSGs (E). Red and blue indicates up- and down-regulated genes. Bars indicate $-\log_{10}$ of the DAVID's EASE score modified P-value.

Gene expression is uncoupled from alternative splicing

To assess differences in gene expression in a cell type-specific manner from aerial or root organs, the script performed pairwise comparisons between the target cell type and a pool of all the other cell types. The goal here was to uncover genes whose expression did not overlap between cell types. Similarly, differences in gene splicing between cell types were measured by comparing PSI values in a targeted tissue against the average of all the other tissues, as described by Martín *et al.*, (2021). These two analyses yielded 2,984 and 718 differentially expressed (DEG) (Supplementary Table S2) and differentially spliced (DSG) (Supplementary Table S3) cell type-specific genes respectively (Fig. 2A). The two sets only share 79 genes, which are both

differentially expressed and alternatively spliced. Overall, the sets of genes that are regulated at the transcriptional level and the AS level show only minimal overlap, suggesting the two processes act independently in managing cell identity. For a gene to be considered differentially spliced in a cell type-specific manner, it needed at least one differentially spliced event (DSE). From the 718 DSGs, 997 DSEs were identified, implying that some genes have more than one cell type-specific DSE. The DEGs (Fig. 2B) and DSEs (Fig. 2C) exhibit distinct profiles. Interestingly, the splicing profiles also cluster according to the organ of origin, contrasting with the expression profiles, for which no evident pattern can be discerned (Fig. 2B and Fig. 2C). Even though the two groups are strikingly different, a unique pattern can be observed for *pATHB8* (Fig. 2B and Fig. 2C). We also looked at the expression of various housekeeping genes in *pATHB8*, and ensured their expression remains unchanged compared to all the other cell types (Supplementary Table S3) (Czechowski *et al.*, 2005).

The functional annotation analysis of each set of the DEG and DSG show very little similarity (Fig. 2D and Fig. 2E). Amongst the processes upregulated at the gene expression level, we notice tissue development. On the other hand, the downregulated processes are generally more focused on defense responses and stress (Fig. 2D). The DSGs are enriched for processes like protein modifications and RNA/DNA metabolic process (Fig. 2E). This is compatible with the fact that many splicing factors auto-regulate themselves through alternative splicing (Lopato *et al.*, 1996, 1999b; Lazar and Goodman, 2000). Interestingly, annotations related to transcription regulation are also represented in the DSGs (Fig. 2E), meaning that AS is involved in gene expression regulation. These results indicate that the regulation of transcription and of alternative splicing in a cell type specific manner are independent.

Cell identity shapes the need for transcription or alternative splicing regulation

The importance of alternative splicing in cell differentiation has already been studied (Li *et al.*, 2016b). To examine how the identity of this specific set of cell types affects the ASE population, we looked at the distribution of DEGs and DSEs across cell types. *pATHB8*, a promoter mostly expressed in the procambium, xylem precursor, and columella in the root apical meristem, displays a notable distribution profile with the largest number of DEGs (985) (Fig. 3A) and DSEs (452) (Fig. 3B), regardless of whether they are up or downregulated. The cell types represented by *pATHB8* make up 34% and 46% of the total DEGs and DSEs respectively. Of the 985 differentially expressed genes in *pATHB8*, 856 are unique to that promoter. Of the 129 genes left, 100 are shared between *pML1*, *pREV*, *pUFO*, and *pLTP1*, which are from aerial organs. The other 29 genes are spread across the rest of the cell types (Fig. 3A). At the other end of the spectrum,

cells sorted with *pPXY* exhibited the smallest number of DEGs with only 46 (1,6%) deregulated genes (Fig. 3A). At the splicing level, *pATHB8* presents 452 DSEs, among which 413 are unique to that promoter, whereas *pSMLX5* has only 13 (1,3%), making those two the most and least prone to AS regulation, respectively (Fig. 3B). Our analysis aimed at identifying non-overlapping DSEs. Hence, *pAPL* and *pSMLX5* both being expressed in the phloem led to the identification of fewer non-overlapping DSEs between promoters. Interestingly, some cell types display twice as many DEGs than DSEs. This is the case for *pSMLX5*, *pCASP1*, *pSCR*, and *pML1* (Fig. 3A and Fig. 3B). This phenomenon is not observed for DSEs over DEGs, which can in part be explained by the fact that the overall number of observed DEGs is greater than the number of DSGs (2,984 vs 714). Nonetheless, *pLTP1* and *pREV* both have more than 1.5-fold more DEGs than DSEs (Fig. 3A and Fig. 3B). This further implies that the importance of AS differs depending on the cell identity and the function they hold. The cell types represented by *pATHB8*, for example, appear to host processes that require more intense transcriptional and post-transcriptional

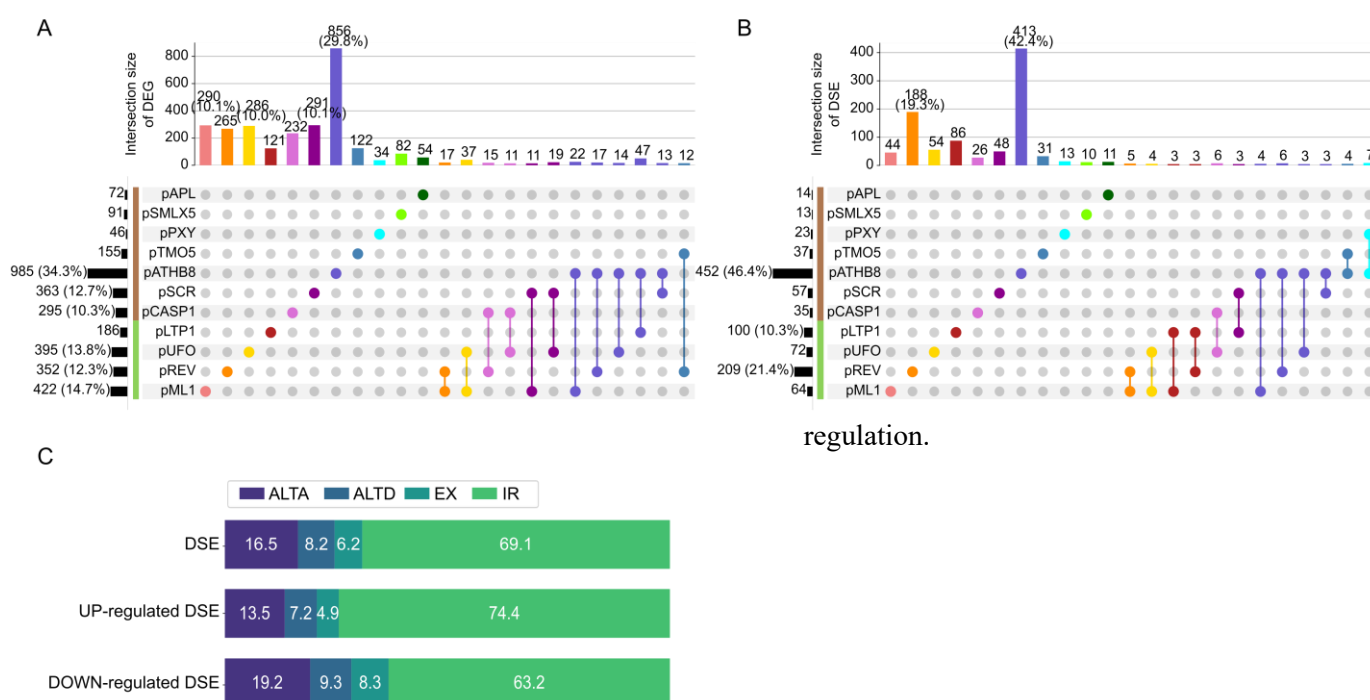


Figure 3. Cell identity shapes the need for transcription or alternative splicing regulation. Upsetplots of (A) DEGs and (B) DSEs. Each color represents a cell type. Vertical bars show the number of overlapping genes or ASEs across cell types. Colored dots indicate intersections from which DEGs and DSEs overlap. The number of genes or ASEs in each intersection is indicated

over the vertical bars, percentage is displayed when above 10%. Horizontal bars represent the total number of genes or ASEs that are differentially expressed or spliced according to different cell types. Green and brown bars represent aerial and root cell types, respectively. Proportions of the types of ASE from the DSEs, the upregulated and downregulated DSE (C). Colors and numbers in bars indicate the percentage of ASEs that are either ALTA (dark violet), ALTD (teal), EX, (dark green) or IR (light green).

To have a better understanding of the impact of cell type-specific AS, we looked at the proportion of the different types of events. As has been globally reported, the most prevalent type of ASE is intron retention, representing 69.1% of all the DSEs identified (Fig. 3C). Intron retention is followed by alternative acceptor site, alternative donor site, and exon skipping (16.5%, 8.2% and 6.2%, respectively). This corroborates previous reports of event type proportions found in plant cell type-specific AS datasets (Li *et al.*, 2016b; Martín *et al.*, 2021).

Even though the procedure to identify cell type-specific genes and ASEs uncovers only non-overlapping DEGs and DSEs, some are still shared between cell types. The analysis was done by separating cell types originating from different organs, which explains the overlap between cell types from aerial parts and from roots. The distribution of DEGs and DSEs across cell types highlights their varying needs in terms of splicing and transcription regulation.

Direction of gene expression and AS regulation is dependent on cell identity and function.

When DEGs are separated according to their up- (Fig. 4A) or downregulation (Fig. 4B), we can observe that the majority of *pATHB8* DEGs are downregulated with 62 up-DEGs (~4% of the total up-DEGs) (Fig. 4A) and 842 down-DEGs (50.6% of the total down-DEGs) (Fig. 4B). Although not at the same scale, *pAPL* also shows more down-DEGs (56) (Fig. 4B) than up-DEGs (7) (Fig. 4A). While the overall trend of the DEGs tend towards downregulation, this is mostly due to *pATHB8*, as other cell types like *pSCR*, *pTMO5*, *pPXY*, *pLTP1*, *pSMLX5*, *pREV*, and *pCASPI* have mostly up-DEGs. Amongst those mainly upregulated DEGs cell types, *pREV*, *pCASPI*, and *pSCR* are the most striking as they have 271 (18%), 241 (16%) and 272 (18%) of up-DEGs (Fig. 4A) and 49 (~3%), 22 (~1.2%) and 59 (~3.4%) down-DEGs (Fig. 4B) respectively. Looking at the up- (Fig. 4C) and down- (Fig. 4D) regulated DSEs, a clear tendency towards up-regulation can be seen. The only exceptions are *pATHB8* and *pMLI* which respectively have 149 (24.7%) and 17 (2.8%) up-DSEs (Fig. 4C) and 291 (65.7%) and 40 (9%)

down-DSEs (Fig. 4D). Those results indicate that the need for up or down-regulation of DEGs varies according to the identity and the function of each cell type.

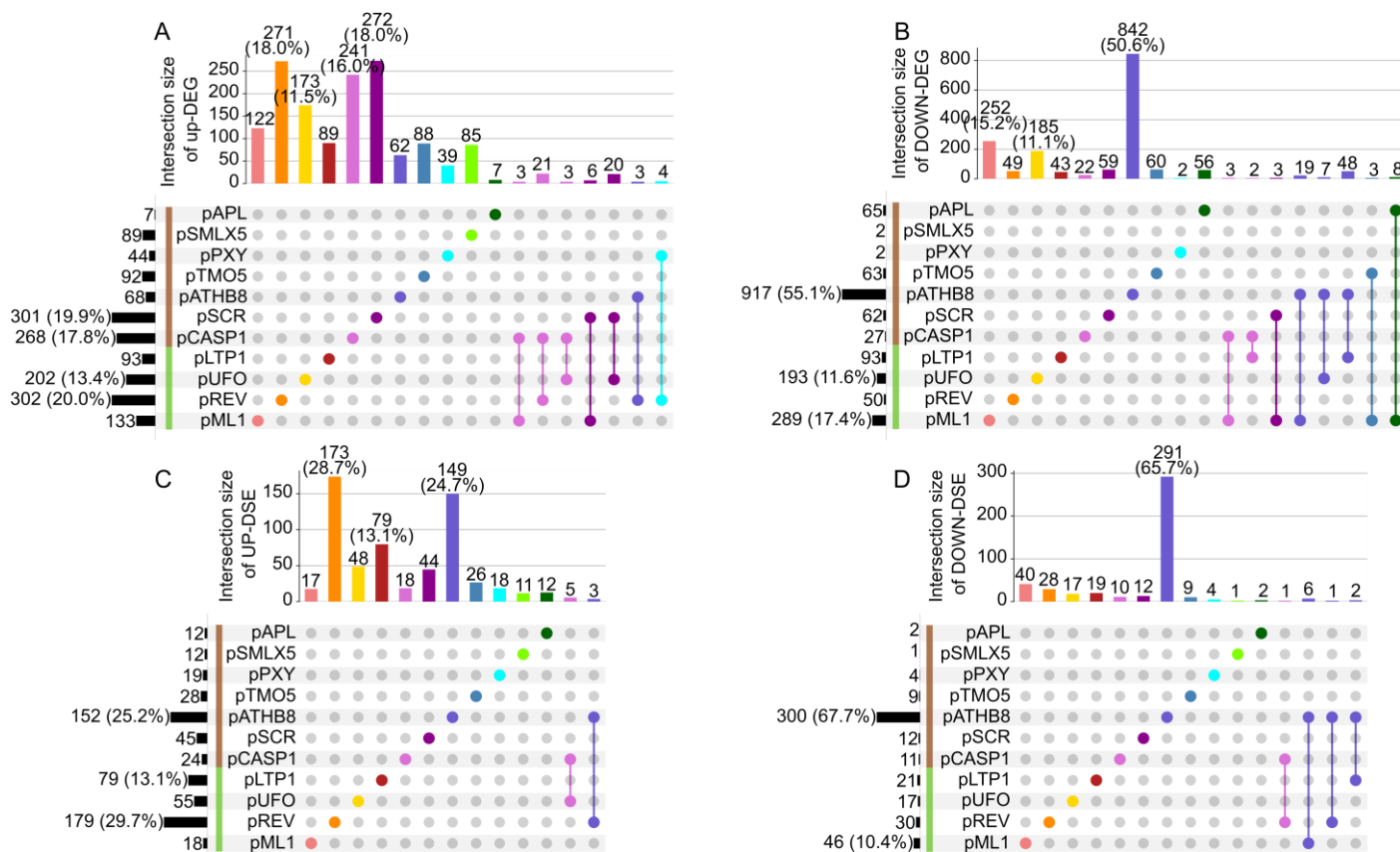


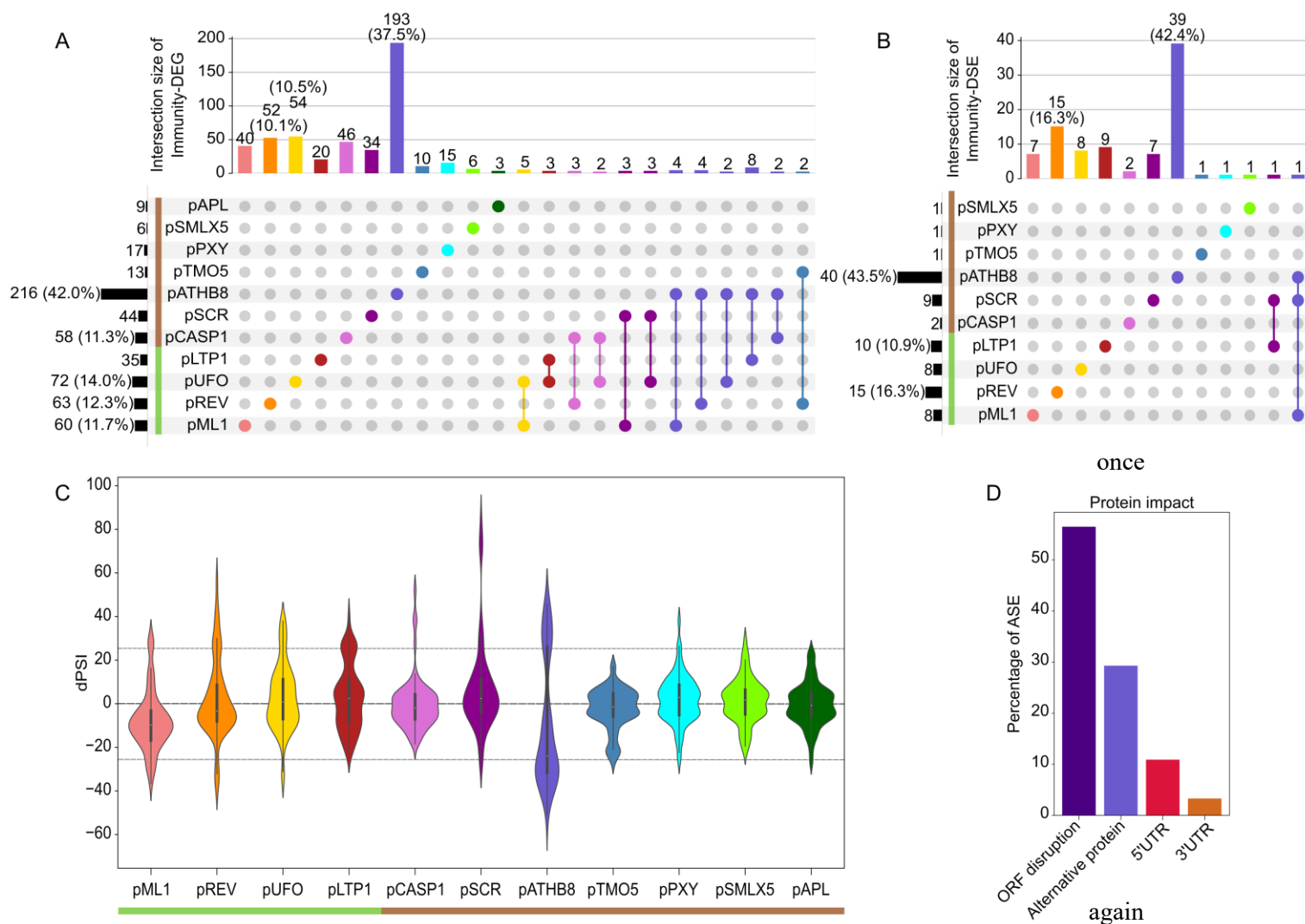
Figure 4. Direction of gene expression and AS regulation is dependent on cell identity and function.

Distribution of (A) upregulated ($\log_2 \text{FC} \geq 2$) and (B) downregulated ($\log_2 \text{FC} \leq -2$) DEGs, and of (C) upregulated ($\Delta\text{PSI} > 25$) and (D) downregulated DSEs ($\Delta\text{PSI} < -25$). As previously mentioned, cell types are colored as indicated; vertical bars represent the amount of genes or ASEs overlapping in the corresponding intersection. Numbers over the vertical bars indicate the quantity of genes or ASEs, percentage is displayed when above 10%. Green and brown bars represent aerial and root cell types, respectively.

Differential splicing of immunity-related genes is cell type-specific

The functional annotation analysis (Fig. 2D) highlighted a strong tendency towards various responses to biotic and abiotic stresses amongst the DEGs. We sought to investigate the impact of

cell identity on alternative splicing regulation of immunity-related genes. We first compiled a list of plant immunity-related genes (Supplementary Table S1). From this list, we then identified 530 DEGs and 92 DSEs associated with genes involved in plant immunity, which we named immunity-DEGs and immunity-DSEs (Supplementary Table S4). The 92 immunity-DSEs originate from 71 immunity-related genes (immunity-DSGs). Unsurprisingly, *pATHB8* shows



the highest amount of differentially expressed genes and spliced events, with 193 immunity-DEGs (Fig. 5A) and 39 immunity-DSEs (Fig. 5B), while *pAPL* shows only 3 immunity-DEGs (Fig. 5A) and no immunity-DSE (Fig. 5B). Besides *pATHB8*, most root associated promoters present very few immunity-DSEs. It is the case for *pTMO5*, *pPXY*, *pCASP1*, and *pSMLX5*, which have only 1 or 2 immunity-DSEs (Fig. 5B).

Figure 5. Differential splicing of biotic stress related genes is cell type-specific.

Upsetplots of immunity-related (A) DEGs (Immunity-DEGs) and (B) DSEs (Immunity-DSEs) across cell types. Green and brown bars represent aerial and root cell types, respectively. Violin plot of Δ PSI values for the 92 Immunity-DSEs in each cell type (C). Δ PSI represents an ASE's difference of PSI between a target tissue and the average of all the other tissues together (Δ PSI = $PSI_{\text{target}} - PSI_{\text{average}}$). Dotted lines show the thresholds used to determine if an ASE is significantly differentially spliced ($25 < \Delta$ PSI < -25). Predicted impact of the immunity-DSEs on proteins (D). Bars represent the percentage of DSEs, which are predicted to cause either ORF disruption, generate an alternative isoform, or overlap UTRs.

When looking at the Δ PSI (Δ PSI = $PSI_{\text{target}} - PSI_{\text{average}}$) of the immunity-DSEs across cell types (Fig. 5C), most of the immunity-DSEs in this cell type are either over- or under-represented, contrasting with the 10 other cell types where the Δ PSI median is closer to 0. Additionally, the functional analysis of the root cell types indicates that this promoter is mostly responsible for the immunity-related annotations (Supplementary Fig. S4) found in the DEGs.

To assess whether the 92 immunity-DSEs identified in our analysis have an impact on protein functionality, we used PastDB. This database generated by (Martín *et al.*, 2021) regroups alternative splicing profiles of Arabidopsis and associated features, like the predicted protein impact (Irimia *et al.*, 2014). Using this database, we were able to extract the predicted protein impact of the immunity-DSEs. Up to 56.5% of the immunity-DSEs are predicted to cause ORF disruption (Fig. 5D).

These observations align with the fact that, in addition to increased protein diversity, AS also plays a major role in gene translation regulation. In this instance, 60.4% of the immunity-DSEs causing ORF disruption are upregulated, which can lead to the translation of a non-functional protein or to isoforms being processed through NMD, both resulting in a diminished quantity of functional protein. On the other hand, 39.6% of DSEs causing ORF disruption are downregulated, which implies a need for the other isoforms from the same genes to be upregulated. It is also important to note that at least 29.3% of immunity-DSEs are predicted to generate alternative proteins (Supplementary Fig. S5).

Among the genes from this group, the gene-level expression varied significantly for 5 of them: *BCL-2 associated athanogene 6 (BAG6)*, *Plant and Fungi Atypical Dual-Specificity Phosphatase 3 (PFA-DSP3)*, *Mitochondrion-localized small heat shock protein 23.6 (HSP23.6-MITO)*, *Arabidopsis thaliana respiratory burst oxidase homolog F (RBOHF)*, and AT4G28703 (Fig. 6). These genes showed repressed gene expression and upregulated ASEs. This is the case for *BAG6*

(LFC = -4.33) and *HSP23.6-MITO* (LFC = -5.13), for which one ASE, AthINT0061548 and AthINT0080096 respectively, present a significant upregulation ($\Delta\text{PSI}_{\text{AthINT0061548}} = 27.8$ and $\Delta\text{PSI}_{\text{AthINT0080096}} = 27.13$) in *pLTP1* (Fig. 6, Supplementary Fig. S6, Supplementary Table S5). *RBOHF*, *PFA-DSP3*, and *AT4G28703* also have negative gene expression and positive ΔPSI s, but this time in *pATHB8* (Fig. 6). Interestingly, AthINT0061548 from *BAG6*, AthINT0080096 from *HSP23.6-MITO*, and AthINT0037028 from *AT4G28703* are all predicted to result in alternative proteins (Supplementary Table S5). This observation can also be made for *PFA-DSP3*,

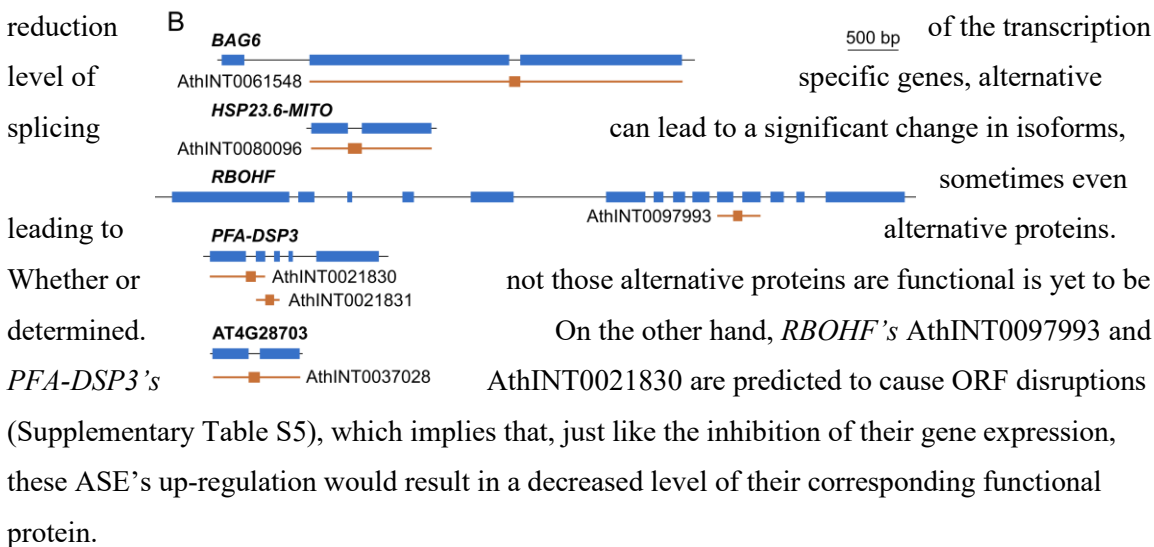
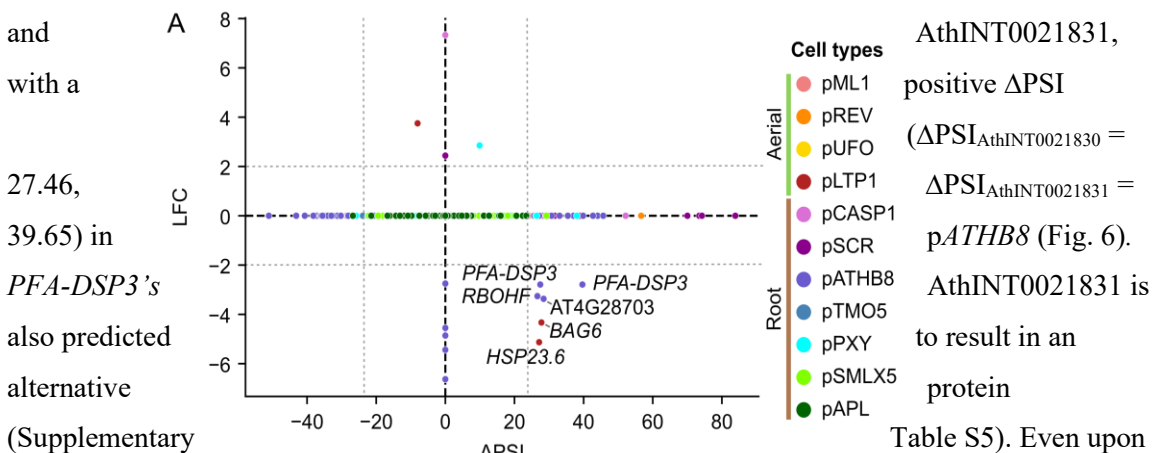


Figure 6. Gene expression and alternative splicing variation of immunity-related genes.

Comparison of gene expression and differential alternative splicing for the 92 immunity-related DSEs in the 11 cell types (A). Gene expression is represented as fold change in a logarithmic scale ($\log_2 FC$) (See Methods for details), while alternative splicing variation is represented as described previously with ΔPSI . Vertical dotted lines indicate the thresholds used to determine if an ASE is significantly differentially spliced ($25 < \Delta PSI < -25$). Horizontal dotted lines indicate the thresholds used to determine if a gene is significantly differentially expressed ($2 < \log_2 FC < -2$). DSEs that are differentially spliced and differentially expressed are identified by their gene name. Genomic representation of DSEs that are also differentially spliced (B). Blue and black tracks represent exons and introns, respectively. Orange tracks show introns retained in the ASEs, orange lines indicate adjoining exons.

Besides the 5 immunity-related genes mentioned previously, 58 of the immunity-related ASEs that are differentially spliced do not vary at the gene-level expression in at least one cell type. Out of those 58, 12 are predicted to encode for an alternative protein. This implies that, even though transcription regulation is not altered for those genes, a shift in isoform population still occurs (Supplementary Table S6).

Interestingly, our results accentuate the strong influence of alternative splicing on immunity-associated genes, even leading to possible production of alternative proteins. Lastly, we also uncovered hints pointing toward the importance of cell identity on immunity regulation.

Discussion

The process of AS in plants has proven to be an important tool in the adaptation to external and internal cues. While its mechanistic intricacies have been extensively analysed, its broad impact

on cell identity and plant immunity remains to be explored. In this study, we gathered data from 11 plant cell types originating from different organs, all collected through the same experimental process, to obtain high-resolution AS data. Through our analysis, we highlighted the significance of AS on transcription regulation as well as on AS regulation itself, all in a cell type-specific manner. Moreover, we showed that AS holds a role in the shaping of cell identity, especially in the columella cells. We also uncovered the impact of AS on immunity-related genes in the columella cells. This study attempts to bridge the gap between cell identity, alternative splicing, and response to biotic stress. In addition, the data set generated provides the scientific community with reliable tools to study cell identity and alternative splicing.

Alternative splicing regulation is independent from transcription

The first observation our findings indicate, is that the genes targeted by expression regulation and the ones targeted by AS do not overlap (Fig. 2A). Although AS occurs co-transcriptionally, our results suggest that AS regulation is largely independent from gene expression regulation. This aligns with previous studies in which cell identity and stress triggered transcription and AS changes on non-overlapping genes (Li *et al.*, 2013; Martín *et al.*, 2021; Cheng *et al.*, 2022). This phenomenon does not seem to be generalized to plant development overall, as the Arabidopsis germline shares a considerable number of differentially expressed and alternatively spliced genes (Misra *et al.*, 2023). The functional analysis of the differentially expressed genes highlighted tissue development amongst others as upregulated and immunity-related processes as downregulated. On the other hand, genes targeted by alternative splicing are enriched for GO terms like DNA metabolic process hence regulating gene expression. In addition, ASEs are also involved in RNA metabolic processes. This is expected as many splicing factors are themselves subjected to splicing, bringing another layer of regulation to AS (Lazar and Goodman, 2000; Jia *et al.*, 2023b).

Alternative splicing shapes cell identity

Through the use of specific promoters expressed on neighboring and sometimes even overlapping cell types, we managed to take a more refined look at the control AS holds over cell identity. Our dataset identified a greater number of cell type-specific ASEs than previously done using the same analysis tools (Martin *et al.*, 2021). This could be due to the process by which our dataset was generated, as all cell types were harvested similarly using the same induction system, whereas other studies have aggregated publicly available data. Although lower than the number of differentially expressed genes, we were still able to identify several cell type-specific

differentially spliced ASEs. Martin *et al.*, (2021) also documented tissue and cell identity as impacting gene expression at a greater scale than AS. Our functional analysis also suggests that tissue development is particularly supported by gene expression (Fig. 2D). While the influence of gene-level regulation on cell identity is considerable, the expression profile of ASEs clustering according to cell types still hints toward the effect of AS on cell identity to be impactful (Fig. 2B).

One of our main goals was to find non-overlapping regulated ASEs. Even though some root cell types studied here are either very close to each other in terms of identity or represented by multiple promoters, our analysis still yielded a few specific DSEs. We suspect that the difference in AS regulation between those cell types is due to the maturation stage of the root cells. The phloem cells, for example, are represented by both *pAPL* and *pSMLX5*. The main difference between the two promoters resides in the developmental phase of the phloem cells they represent. The same rationale applies to *pSCR* and *pCASPI* both expressed in the endodermis. Our analysis was able to capture the subtle changes in alternative splicing regulation necessary between different developmental stages of corresponding cell types. Hence, it identified genes better suited for future cell type-specific studies, as very few cell type-specific promoters available are truly cell type-specific. Just like the promoters used here, many will have overlapping expression across neighbouring cell types. Therefore, the present study provides a list of new genes and promoters to develop new cell type-specific biological tools (Supplemental Table S2).

The shoot and root apical meristem provided substantial differences in pathways (Supplementary Fig. S4) and intensity of gene-level expression and AS regulation. This is to be expected as even though both perform active mitotic cell division, the two meristems are involved in largely different tissue growth (Xue *et al.*, 2020b). While most aerial cell types differentially express a somewhat similar number of genes, the SAM central zone (*pREV*) is definitely subjected to a more intense ASE regulation (Fig. 3B). This is corroborated by Tian *et al.*, (2019) whom noted the same effect when comparing the different zones of the SAM. AS is known to be involved in maintaining the SAM zone boundaries and cell division pattern through proteins like SKIP for example (Li *et al.*, 2022). Nevertheless, the broader implication and importance of AS in the SAM, more particularly in the central zone has yet to be investigated. Similarly, the quiescent center of the RAM also shows a certain degree of AS regulation. We hypothesize that AS may hold a role in maintaining the stem niches and therefore in the developmental plasticity of meristems.

Alternative splicing, cell identity, and immunity associated genes are interconnected

To fill part of the gap between plant immune response, cell identity, and alternative splicing, we examined immunity-related genes amongst cell type-specific DEGs and DSGs. The distinction between transcription and AS regulation is also true for immunity-related genes. At first glance, the majority of the immunity-related processes seem transcriptionally regulated, as shown by the functional analysis of the DEGs (Fig. 2D). However, when separating root and aerial regulated ASEs, we noticed that aerial ASEs are enriched for plant hypersensitive response (Supplementary Fig. S4). The role of AS in immunity was proven multiple times through the study of key factors of plant defense (Liu *et al.*, 2022; Xie *et al.*, 2023) and yet the global extent of its impact on resistance has yet to be discussed. Almost up to 10% of the cell type-specific regulated ASEs are immunity-related even in the absence of an actual defense stimulus. This implies that AS could participate in maintaining the growth to immune response balance. According to the predicted protein impact, half of the defense ASEs are expected to cause ORF disruption (Fig. 5E). The aforementioned observation indicates that AS might act as another layer of immune transcriptional regulation. It possibly negatively regulates the accumulation of immunity-related proteins in a context in which they are not needed, while still maintaining a basal gene expression level to quickly produce the complete protein when needed. Still, the 30% of immunity-related ASEs resulting in actual alternative protein isoforms also imply that AS potentially has a direct impact on immune signaling pathways in a cell type-specific manner.

Columella cells defense system is regulated through alternative splicing

One of the main highlights of this analysis comes from *pATHB8* cells, which present the highest number of differentially expressed and spliced genes (Fig. 3A and 3B). These results could be partially attributed to the way the differentially spliced and differentially expressed analyses are inherently built. These analyses exclusively uncover non-overlapping genes between conditions, and since many of the promoters used are expressed in overlapping cell types (Fig. 1), we expected only a small number of differentially spliced or expressed genes. Amongst the root cell types promoters used here, *pATHB8* and *pSCR* are the only ones specific to the columella and the quiescent center respectively. Hence, *pATHB8* yielded more specific genes and isoforms than the other promoters did. Moreover, we safely assume that most of those regulated genes and isoforms are specific to the columella cells. Following this logic, we would also expect *pSCR* to exhibit a higher number of specific regulated genes and isoforms. While not as much as *pATHB8*, *pSCR* still presents more specific genes and isoforms than other root promoters do. The quiescent center being less represented than the endodermis in terms of quantity is probably one of the reasons

pSCR does not show higher number of DSEs and DEGs. However, this hypothesis only partially explains why pATHB8, and the columella in particular, seems to undergo intense gene and isoform regulation. Additionally, it does not clarify why nearly all of these genes are mostly downregulated.

Columella cells play multiple physiological roles including but not limited to the perception of gravity (Stahelin *et al.*, 2000), production of mucilage (Maeda *et al.*, 2019), acting as a physical barrier, and an involvement in plant defense (Hawes *et al.*, 2000; Driouich *et al.*, 2013). Those cells also undergo tight coordination of stem cell production and cell release at the outer root cap layer. This process is crucial for proper root development. The columella is thus composed of three underlying cell types; the columella stem cells, the columella differentiated cells and the border-like cells, which ultimately go through programmed cell death (Kumar and Iyer-Pascuzzi, 2020). Being responsible for such major functions could justify the need for a more intense regulation of genes expression and isoform splicing. We hypothesise that the imminent cell death could lead to major repression of gene expression. Additionally, columella cells and the root cap in general also act as barrier protecting the apical meristem (Hawes *et al.*, 2000, 2016; Driouich *et al.*, 2013; Fortier *et al.*, 2023). The mucilage they produce is among other things, composed of antimicrobial proteins and reactive oxygen species (Maeda *et al.*, 2019; Driouich *et al.*, 2021). The border-like cells in particular are responsible for the formation of the root extracellular trap, a biofilm like structure acting as the first physical line of defense of root meristems (Hawes *et al.*, 2000; Driouich *et al.*, 2021). According to our findings, the columella cells immune mechanism is subjected to intense regulation through gene expression, but also alternative splicing. The functional analysis of the DEG in pATHB8 (Supplementary Fig. S4) also indicate that the columella is responsible for the immunity-related annotations. We postulate that the crucial role of the border-like cells in plant defense is strongly controlled by alternative splicing and is responsible for the distribution of the immunity-related isoforms observed in pATHB8. While more extensive work is necessary to explore further on the subject, our result certainly highlights the unsuspected importance of alternative splicing in the columella cells.

Alternative splicing is a conserved process that enables eukaryotes to reach a higher level of transcriptome and proteome complexity. This mechanism is essential in the adaptation to various stresses and developmental stages of plants. To better understand the significance of AS on those numerous stimuli, many focused on the study of specific factors of plant development and stress tolerance. We however sought to observe AS's broader impact on plant growth and plant immunity. Here, we managed to establish links between AS, cell identity and immunity-related

genes. Our results also highlighted the unsuspected importance of AS in the columella cells. AS might play an important part in the balance between the growth and defense states. Although the global Arabidopsis AS landscape upon elicitation of a defense response still needs to be investigated, our analysis gives an interesting insight into the interconnection between AS, immunity-related genes, and cell identity.

Supplementary data

Supplementary data will be available at the journal's website upon publication.

Table S1. List of defense-related genes used to identify the immunity-DEGs and DSEs

Table S2. Cell type-specific genes and ASE

Table S3. Expression of housekeeping genes in *pATHB8*

Table S4. Cell type-specific immunity related genes and ASE

Table S5. Immunity-related splicing variant of interest

Table S6. Immunity-related DSE that do not vary at the gene expression level

Supplementary Figures: Fig. S1 to S6 (Annex A to F)

Acknowledgements

We thank Pr. Sebastian Wolf (Universität Heidelberg) for providing transgenic lines and clones used for the pOP6/ LhG4-mTurquoise2 expression system. We thank teams at the *Centre d'expertise et de services Génome Québec* for generating libraries and RNA sequencing. We would also like to thank Dr. Guiomar Martin (Universitat de Barcelona), Dr. Manuel Irimia (Universitat Pompeu Fabra) and teams for designing vast-tools, creating PastDB, providing the scripts used for splicing analysis and for their helpful insight. Finally, we thank Dr. Natacha Mérindol for her help optimising the cell sorting process on protoplasts. Part of the schematic of the cell types (Fig. 1A) and schematic of the experimental design (Fig. 1B) were created with BioRender.com.

Author contributions

TB, DLJ and HG: conceptualization; TB: formal analysis; TB, IBSC, VPPG and MBP: investigation; TB, IBSC and VPPG: methodology; TB: writing - original draft; TB: visualization; TB, IBSC, VPPG, MBP, DLJ and HG: writing - review & editing; HG: resources; HG: funding acquisition; HG and DLJ: supervision.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This work was supported by NSERC grant number RGPIN/4002-2020 and TB was supported by FRQNT-DE PhD grant.

Data availability

Raw sequencing data were submitted to Genbank under Bioproject accession number PRJNA1097566

References

Adelman K, La Porta A, Santangelo TJ, Lis JT, Roberts JW, Wang MD. 2002. Single molecule analysis of RNA polymerase elongation reveals uniform kinetic behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 13538–13543.

Aerts N, Pereira Mendes M, Van Wees SCM. 2021. Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense. *Plant Journal* **105**, 489–504.

Ali GS, Palusa SG, Golovkin M, Prasad J, Manley JL, Reddy ASN. 2007. Regulation of Plant Developmental Processes by a Novel Splicing Factor. *PLOS ONE* **2**, e471.

- Amsbury S, Kirk P, Benitez-Alfonso Y.** 2018. Emerging models on the regulation of intercellular transport by plasmodesmata-associated callose. *Journal of Experimental Botany* **69**, 105–115.
- Änkö M-L, Müller-McNicoll M, Brandl H, Curk T, Gorup C, Henry I, Ule J, Neugebauer KM.** 2012. The RNA-binding landscapes of two SR proteins reveal unique functions and binding to diverse RNA classes. *Genome Biology* **13**, R17.
- Arif M, Li Z, Luo Q, Li L, Shen Y, Men S.** 2021. The bag2 and bag6 genes are involved in multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences* **22**.
- Arnaud D, Deeks MJ, Smirnov N.** 2023. RBOHF activates stomatal immunity by modulating both reactive oxygen species and apoplastic pH dynamics in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **116**, 404–415.
- Ayako M, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N.** 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19613–19618.
- Balkunde R, Kitagawa M, Xu XM, Wang J, Jackson D.** 2017. SHOOT MERISTEMLESS trafficking controls axillary meristem formation, meristem size and organ boundaries in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **90**, 435–446.
- Balmer D, Mauch-Mani B.** 2013. More beneath the surface? Root versus shoot antifungal plant defenses. *Frontiers in plant science* **4**, 256.
- Banerji J, Rusconi S, Schaffner W.** 1981. Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* **27**, 299–308.
- Bargmann BOR, Birnbaum KD.** 2010. Fluorescence Activated Cell Sorting of Plant Protoplasts. *Journal of Visualized Experiments*, 2–5.
- Barta A, Kalyna M, Lorkovic' ZJL.** 2008. Plant SR Proteins and Their Functions. *Nuclear pre-mRNA Processing in Plants*. 83–102.
- Barta A, Kalyna M, Reddy ASN.** 2010. Implementing a rational and consistent nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins) in plants. *Plant Cell* **22**, 2926–2929.
- Bazin J, Mariappan K, Jiang Y, Blein T, Voelz R, Crespi M, Hirt H.** 2020. Role of MPK4 in pathogen-associated molecular pattern-triggered alternative splicing in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens* **16**.
- Benina M, Ribeiro DM, Gechev TS, Mueller-Roeber B, Schippers JHM.** 2015. A cell type-specific view on the translation of mRNAs from ROS-responsive genes upon paraquat treatment of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, Cell and Environment* **38**, 349–363.
- Bennett T, van den Toorn A, Willemsen V, Scheres B.** 2014. Precise control of plant stem cell activity through parallel regulatory inputs. *Development (Cambridge)* **141**, 4055–4064.

van Bentem S de la F, Anrather D, Roitingner E, Djamei A, Hufnagl T, Barta A, Csaszar E, Dohnal I, Lecourieux D, Hirt H. 2006. Phosphoproteomics reveals extensive in vivo phosphorylation of Arabidopsis proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Research* **34**, 3267–3278.

Berardini TZ, Mundodi S, Reiser L, et al. 2004. Functional annotation of the Arabidopsis genome using controlled vocabularies. *Plant physiology* **135**, 745–755.

Berget SM, Moore C, Sharp PA. 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 3171–3175.

Bhar A, Chakraborty A, Roy A. 2023. The captivating role of calcium in plant-microbe interaction. *Frontiers in Plant Science* **14**.

Bi G, Zhou Z, Wang W, Li L, Rao S, Wu Y, Zhang X, Menke FLH, Chen S, Zhou J-M. 2018. Receptor-Like Cytoplasmic Kinases Directly Link Diverse Pattern Recognition Receptors to the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Arabidopsis. *The Plant Cell* **30**, 1543–1561.

Bolger, A. M., Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **btu170**.

Bonardi V, Cherkis K, Nishimura MT, Dangl JL. 2012. A new eye on NLR proteins: focused on clarity or diffused by complexity? *Current Opinion in Immunology* **24**, 41–50.

Bonardi V, Tang S, Stallmann A, Roberts M, Cherkis K, Dangl JL. 2011. Expanded functions for a family of plant intracellular immune receptors beyond specific recognition of pathogen effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 16463–16468.

Bonke M, Thitamadee S, Mähönen AP, Hauser M-T, Helariutta Y. 2003. APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis. *Nature* **426**, 181–186.

Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng S-H, Sheen J. 2010. Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* **464**, 418–422.

Boutz PL, Bhutkar A, Sharp PA. 2015. Detained introns are a novel, widespread class of post-transcriptionally spliced introns. *Genes & Development* **29**, 63–80.

Braunschweig U, Barbosa-Morais NL, Pan Q, Nachman EN, Alipanahi B, Gonatopoulos-Pournatzis T, Frey B, Irimia M, Blencowe BJ. 2014. Widespread intron retention in mammals functionally tunes transcriptomes. *Genome Research* **24**, 1774–1786.

Brueckner F, Armache K-J, Cheung A, Damsma GE, Kettenberger H, Lehmann E, Sydow J, Cramer P. 2009. Structure–function studies of the RNA polymerase II elongation complex. *Acta Crystallographica Section D* **65**, 112–120.

- Brugiolo M, Botti V, Liu N, Müller-McNicoll M, Neugebauer KM.** 2017. Fractionation iCLIP detects persistent SR protein binding to conserved, retained introns in chromatin, nucleoplasm and cytoplasm. *Nucleic Acids Research* **45**, 10452–10465.
- Burley SK, Roeder RG.** 1996. BIOCHEMISTRY AND STRUCTURAL BIOLOGY OF TRANSCRIPTION FACTOR IID (TFIID). *Annual Review of Biochemistry* **65**, 769–799.
- Cannesan MA, Durand C, Burel C, Gangneux C, Lerouge P, Ishii T, Laval K, Follet-Gueye M-L, Driouich A, Vitré-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.
- Cao Y, Liang Y, Tanaka K, et al.** 2014. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife* **3**, 1504–1509.
- Césari S, Kanzaki H, Fujiwara T, Bernoux M, Chalvon V, Kawano Y, Shimamoto K, Dodds P, Terauchi R, Kroj T.** 2014. The NB - LRR proteins RGA 4 and RGA 5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *The EMBO Journal* **33**, 1941–1959.
- Chaouch S, Queval G, Noctor G.** 2012. AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **69**, 613–627.
- Chaudhary S, Jabre I, Reddy ASN, Staiger D, Syed NH.** 2019a. Perspective on Alternative Splicing and Proteome Complexity in Plants. *Trends in Plant Science* **24**, 496–506.
- Chaudhary S, Khokhar W, Jabre I, Reddy ASN, Byrne LJ, Wilson CM, Syed NH.** 2019b. Alternative splicing and protein diversity: Plants versus animals. *Frontiers in Plant Science* **10**, 1–14.
- Chen S, Li J, Liu Y, Li H.** 2019. Genome-Wide Analysis of Serine/Arginine-Rich Protein Family in Wheat and *Brachypodium distachyon*. *Plants* **8**.
- Chen X, Qi Y, Wu Z, et al.** 2021. Structural insights into preinitiation complex assembly on core promoters. *Science* **372**.
- Cheng X, Zhao C, Gao L, Zeng L, Xu Y, Liu F, Huang J, Liu L, Liu S, Zhang X.** 2022. Alternative splicing reprogramming in fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* at different infection stages on *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science* **13**, 1–13.
- Cho S, Hoang A, Sinha R, Zhong XY, Fu XD, Krainer AR, Ghosh G.** 2011. Interaction between the RNA binding domains of Ser-Arg splicing factor 1 and U1-70K snRNP protein determines early spliceosome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 8233–8238.
- Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ.** 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**, 1–8.

- Chung HS, Howe GA.** 2009. A Critical Role for the TIFY Motif in Repression of Jasmonate Signaling by a Stabilized Splice Variant of the JASMONATE ZIM-Domain Protein JAZ10 in Arabidopsis. *The Plant Cell* **21**, 131–145.
- Cianfrocco MA, Kassavetis GA, Grob P, Fang J, Juven-Gershon T, Kadonaga JT, Nogales E.** 2013. Human TFIID Binds to Core Promoter DNA in a Reorganized Structural State. *Cell* **152**, 120–131.
- Collier SM, Hamel L-P, Moffett P.** 2011. Cell Death Mediated by the N-Terminal Domains of a Unique and Highly Conserved Class of NB-LRR Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 918–931.
- Collier SM, Moffett P.** 2009. NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends in Plant Science* **14**, 521–529.
- Core LJ, Martins AL, Danko CG, Waters CT, Siepel A, Lis JT.** 2014. Analysis of nascent RNA identifies a unified architecture of initiation regions at mammalian promoters and enhancers. *Nature Genetics* **46**, 1311–1320.
- Craft J, Samalova M, Baroux C, Townley H, Martinez A, Jepson I, Tsiantis M, Moore I.** 2005. New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in Arabidopsis. *The Plant Journal* **41**, 899–918.
- Cramer P.** 2019. Organization and regulation of gene transcription. *Nature* **573**, 45–54.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R.** 2005. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**, 5–17.
- Day B, Dahlbeck D, Huang J, Chisholm ST, Li D, Staskawicz BJ.** 2005. Molecular Basis for the RIN4 Negative Regulation of RPS2 Disease Resistance. *The Plant Cell Online* **17**.
- De La Mata M, Alonso CR, Kadener S, Fededa JP, Blaustein M, Pelisch F, Cramer P, Bentley D, Kornblihtt AR.** 2003. A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Molecular Cell* **12**, 525–532.
- Ding F, Cui P, Wang Z, Zhang S, Ali S, Xiong L.** 2014. Genome-wide analysis of alternative splicing of pre-mRNA under salt stress in Arabidopsis. *BMC Genomics* **15**, 431.
- Drechsel G, Kahles A, Kesarwani AK, Stauffer E, Behr J, Drewe P, Rättsch G, Wachter A.** 2013. Nonsense-mediated decay of alternative precursor mRNA splicing variants is a major determinant of the Arabidopsis steady state transcriptome. *Plant Cell* **25**, 3726–3742.
- Dressano K, Weckwerth PR, Poretsky E, Takahashi Y, Villarreal C, Shen Z, Schroeder JI, Briggs SP, Huffaker A.** 2020. Dynamic regulation of Pep-induced immunity through post-translational control of defence transcript splicing. *Nature Plants* **6**, 1008–1019.
- Driouich A, Durand C, Vicré-Gibouin M.** 2007. Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science* **12**, 14–19.

- Driouich A, Follet-Gueye ML, 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.
- Driouich A, Gaudry A, Pawlak B, Moore JP.** 2021. Root cap-derived cells and mucilage: a protective network at the root tip. *Protoplasma* **258**, 1179–1185.
- Du K, Jiang T, Chen H, Murphy AM, Carr JP, Du Z, Li X, Fan Z, Zhou T.** 2020. Viral perturbation of alternative splicing of a host transcript benefits infection. *Plant Physiology* **184**, 1514–1531.
- Early P, Rogers J, Davis M, Calame K, Bond M, Wall R, Hood L.** 1980. Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin μ gene by alternative RNA processing pathways. *Cell* **20**, 313–319.
- Erkelenz S, Mueller WF, Evans MS, Busch A, Schöneweis K, Hertel KJ, Schaal H.** 2013. Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms (*RNA* (2013) **19**, (96-102)). *Rna* **19**, 1015.
- Escobar MR, Feussner I, Valle EM.** 2021. Mitochondrial Small Heat Shock Proteins Are Essential for Normal Growth of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **12**.
- FAO.** 2024. Plant Production and Protection. <https://www.fao.org/plant-production-protection/about/en>.
- de Felippes FF, Waterhouse PM.** 2023. Plant terminators: The unsung heroes of gene expression. *Journal of Experimental Botany* **74**, 2239–2250.
- Feng F, Yang F, Rong W, Wu X, Zhang J, Chen S, He C, Zhou J-M.** 2012. A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* **485**, 114–118.
- Fortier M, Lemaitre V, Gaudry A, Pawlak B, Driouich A, Follet-Gueye ML, Vicré M.** 2023. A fine-tuned defense at the pea root caps: Involvement of border cells and arabinogalactan proteins against soilborne diseases. *Frontiers in Plant Science* **14**, 1–7.
- Fröschel C, Komorek J, Attard A, et al.** 2021. Plant roots employ cell-layer-specific programs to respond to pathogenic and beneficial microbes. *Cell Host and Microbe* **29**, 299-310.e7.
- Fu XD.** 1995. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* **1**, 663–680.
- Fu ZQ, Guo M, Jeong B, Tian F, Elthon TE, Cerny RL, Staiger D, Alfano JR.** 2007. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* **447**, 284–288.
- Fuchs M, Lohmann JU.** 2020. Aiming for the top: non-cell autonomous control of shoot stem cells in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Research* **133**, 297–309.
- de la Fuente van Bentem S, Anrather D, Dohnal I, et al.** 2008. Site-Specific Phosphorylation Profiling of *Arabidopsis* Proteins by Mass Spectrometry and Peptide Chip Analysis. *Journal of Proteome Research* **7**, 2458–2470.

- Furlong EEM, Levine M.** 2018. Developmental enhancers and chromosome topology. *Science* **361**, 1341–1345.
- Gao X, Chen X, Lin W, et al.** 2013. Bifurcation of Arabidopsis NLR Immune Signaling via Ca²⁺-Dependent Protein Kinases. (S He, Ed.). *PLoS Pathogens* **9**, e1003127.
- Gayral M, Arias Gaguancela O, Vasquez E, Herath V, Flores FJ, Dickman MB, Verchot J.** 2020. Multiple ER-to-nucleus stress signaling pathways are activated during *Plantago asiatica* mosaic virus and Turnip mosaic virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **103**, 1233–1245.
- Gilbert W.** 1987. The exon theory of genes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **52**, 901–905.
- Glushkevich A, Spechenkova N, Fesenko I, Knyazev A, Samarskaya V, Kalinina NO, Taliansky M, Love AJ.** 2022. Transcriptomic Reprogramming, Alternative Splicing and RNA Methylation in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plants in Response to Potato Virus Y Infection. *Plants* **11**.
- Gnatt AL, Cramer P, Fu J, Bushnell DA, Kornberg RD.** 2001. Structural Basis of Transcription: An RNA Polymerase II Elongation Complex at 3.3 Å Resolution. *Science* **292**, 1876–1882.
- Goedhart J, Von Stetten D, Noirclerc-Savoye M, Lelimosin M, Joosen L, Hink MA, Van Weeren L, Gadella TWJ, Royant A.** 2012. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nature Communications* **3**.
- Göhring J, Jacak J, Barta A.** 2014. Imaging of endogenous messenger RNA splice variants in living cells reveals nuclear retention of transcripts inaccessible to nonsense-mediated decay in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 754–764.
- Golisz A, Krzyszton M, Stepień M, Dolata J, Piotrowska J, Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A, Kufel J.** 2021. Arabidopsis Spliceosome Factor Smd3 Modulates Immunity to *Pseudomonas syringae* Infection. *Frontiers in Plant Science* **12**.
- Graveley BR, Hertel KJ, Maniatis T.** 2001. The role of U2AF 35 and U2AF 65 in enhancer-dependent splicing. 806–818.
- Guilfoyle TJ, Dietrich MA.** 1987. Plant RNA Polymerases: Structures, Regulation, and Genes. In: Bruening G, Harada J, Kosuge T, Hollaender A, Kuny G, Wilson CM, eds. *Tailoring Genes for Crop Improvement: An Agricultural Perspective*. Boston, MA: Springer US, 87–100.
- Guo X, Wang T, Jiang L, Qi H, Zhang Z.** 2023. PlaSDB: a comprehensive database of plant alternative splicing events in response to stress. *BMC Plant Biology* **23**, 1–10.
- Haberle V, Stark A.** 2018. Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**, 621–637.
- Han N, Ji X-L, Du Y-P, He X, Zhao X-J, Zhai H.** 2017. Identification of a Novel Alternative Splicing Variant of VvPMA1 in Grape Root under Salinity. *Frontiers in Plant Science* **8**.

- Han H, Yan A, Li L, Zhu Y, Feng B, Liu X, Zhou Y.** 2020. A signal cascade originated from epidermis defines apical-basal patterning of Arabidopsis shoot apical meristems. *Nature Communications* **11**, 1–17.
- Hartmann L, Wießner T, Wachter A.** 2018. Subcellular compartmentation of alternatively spliced transcripts defines SERINE/ARGININE-RICH PROTEIN30 expression. *Plant Physiology* **176**, 2886–2903.
- Hartzog GA, Fu J.** 2013. The Spt4–Spt5 complex: A multi-faceted regulator of transcription elongation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1829**, 105–115.
- Hawes MC, Allen C, Turgeon BG, Curlango-Rivera G, Tran TM, Huskey DA, Xiong Z.** 2016. Root Border Cells and Their Role in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology* **54**, 143–161.
- 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.
- Hazra A, Pal A, Kundu A.** 2023. Alternative splicing shapes the transcriptome complexity in blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. *Functional & Integrative Genomics* **23**, 144.
- 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.
- Hertel KJ, Maniatis T.** 1999. Serine-arginine (SR)-rich splicing factors have an exon-independent function in pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2651–2655.
- Hill CH, Boreikaitė V, Kumar A, et al.** 2019. Activation of the Endonuclease that Defines mRNA 3' Ends Requires Incorporation into an 8-Subunit Core Cleavage and Polyadenylation Factor Complex. *Molecular Cell* **73**, 1217-1231.e11.
- Hinsch M, Staskawicz BJ.** 1996. Identification of a new Arabidopsis disease resistance locus, RPs4, and cloning of the corresponding avirulence gene, avrRps4, from *Pseudomonas syringae* pv. *psis*. *MPMI* **9**, 55–61.
- Howard BE, Hu Q, Babaoglu AC, et al.** 2013. High-Throughput RNA Sequencing of *Pseudomonas*-Infected Arabidopsis Reveals Hidden Transcriptome Complexity and Novel Splice Variants. *PLoS ONE* **8**.
- Howard JM, Sanford JR.** 2015. The RNAissance family: SR proteins as multifaceted regulators of gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **6**, 93–110.
- Huang J, Gu L, Zhang Y, et al.** 2017. An oomycete plant pathogen reprograms host pre-mRNA splicing to subvert immunity. *Nature Communications* **8**, 2051.
- Huang J, Lu X, Wu H, Xie Y, Peng Q, Gu L, Wu J, Wang Y, Reddy ASN, Dong S.** 2020. *Phytophthora* Effectors Modulate Genome-wide Alternative Splicing of Host mRNAs to Reprogram Plant Immunity. *Molecular Plant* **13**, 1470–1484.

- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA.** 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* **4**, 44–57.
- Huelga SC, Vu AQ, Arnold JD, et al.** 2012. Integrative Genome-wide Analysis Reveals Cooperative Regulation of Alternative Splicing by hnRNP Proteins. *Cell Reports* **1**, 167–178.
- Hunt AG, Xing D, Li QQ.** 2012. Plant polyadenylation factors: conservation and variety in the polyadenylation complex in plants. *BMC Genomics* **13**, 641.
- Importance des zones exemptes de phytoravageurs.** 2020. <https://planthealth.nappo.org/english/iyph/IYPH-Success-Stories/Importance-des-zones-exemptes-de-phytoravageurs-ZEP>. Accessed April 2024.
- Irimia M, Weatheritt RJ, Ellis JD, et al.** 2014. A highly conserved program of neuronal microexons is misregulated in autistic brains. *Cell* **159**, 1511–1523.
- Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, Panstruga R, Strizhov N, Schulze-Lefert P, Fincher GB.** 2003. An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *The Plant Cell* **15**, 2503–2513.
- Jaehning JA.** 2010. The Paf1 complex: Platform or player in RNA polymerase II transcription? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1799**, 379–388.
- Jia ZC, Das D, Zhang Y, Fernie AR, Liu YG, Chen M, Zhang J.** 2023a. Plant serine/arginine-rich proteins: versatile players in RNA processing. *Planta* **257**.
- Jia Z, Das D, Zhang Y, Fernie AR, Liu Y, Chen M, Zhang J.** 2023b. Plant serine_arginine-rich proteins versatile players in RNA processing. *Planta* **257**.
- Jia J, Long Y, Zhang H, et al.** 2020. Post-transcriptional splicing of nascent RNA contributes to widespread intron retention in plants. *Nature Plants* **6**, 780–788.
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B.** 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal* **19**, 4004–4014.
- Jin L, Chen M, Xiang M, Guo Z.** 2022. RNAi-Based Antiviral Innate Immunity in Plants. *Viruses* **14**.
- Kadota Y, Shirasu K, Zipfel C.** 2015. Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant and Cell Physiology* **56**, 1472–1480.
- Kalyna M, Simpson CG, Syed NH, et al.** 2012. Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research* **40**, 2454–2469.
- Kato H, Okazaki K, Urano T.** 2013. Spt6: Two fundamentally distinct functions in the regulation of histone modification. *Epigenetics* **8**, 1249–1253.

- Kaufmann I, Martin G, Friedlein A, Langen H, Keller W.** 2004. Human Fip1 is a subunit of CPSF that binds to U-rich RNA elements and stimulates poly(A) polymerase. *The EMBO Journal* **23**, 616-626–626.
- Kim G-D, Cho Y-H, Lee B-H, Yoo S-D.** 2017. STABILIZED1 Modulates Pre-mRNA Splicing for Thermotolerance. *Plant Physiology* **173**, 2370–2382.
- Kim Y, Geiger JamesH, Hahn S, Sigler PB.** 1993. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* **365**, 512–520.
- Kim G-D, Yoo S-D, Cho Y-H.** 2018. STABILIZED1 as a heat stress-specific splicing factor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* **13**, e1432955.
- Kindgren P, Ivanov M, Marquardt S.** 2020. Native elongation transcript sequencing reveals temperature dependent dynamics of nascent RNAPII transcription in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* **48**, 2332–2347.
- Kufel J, Diachenko N, Golisz A.** 2022. Alternative splicing as a key player in the fine-tuning of the immunity response in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology* **23**, 1226–1238.
- Kujirai T, Kurumizaka H.** 2020. Transcription through the nucleosome. *Current Opinion in Structural Biology* **61**, 42–49.
- Kumar N, Iyer-Pascuzzi AS.** 2020. Shedding the last layer: Mechanisms of root cap cell release. *Plants* **9**.
- Kumar K, Sinha SK, Maity U, Kirti PB, Kumar KRR.** 2023. Insights into established and emerging roles of SR protein family in plants and animals. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **14**.
- Lam PY, Wang L, Lo C, Zhu FY.** 2022. Alternative Splicing and Its Roles in Plant Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 1–20.
- Lawit SJ, O’Grady K, Gurley WB, Czarnecka-Verner E.** 2007. Yeast two-hybrid map of *Arabidopsis* TFIID. *Plant Molecular Biology* **64**, 73–87.
- Lazar G, Goodman HM.** 2000. The *Arabidopsis* splicing factor SR1 is regulated by alternative splicing. *Plant Molecular Biology* **42**, 571–581.
- Lee BH, Kapoor A, Zhu J, Zhu JK.** 2006. Stabilized1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1736–1749.
- Lee KC, Kim YC, Kim JK, Lee H, Lee JH.** 2023a. Regulation of Flowering Time and Other Developmental Plasticities by 3’ Splicing Factor-Mediated Alternative Splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Plants* **12**.
- Lee J-Y, Lu H.** 2011. Plasmodesmata: the battleground against intruders. *Trends in Plant Science* **16**, 201–210.

Lee HT, Park HY, Lee KC, Lee JH, Kim JK. 2023*b*. Two Arabidopsis Splicing Factors, U2AF65a and U2AF65b, Differentially Control Flowering Time by Modulating the Expression or Alternative Splicing of a Subset of FLC Upstream Regulators. *Plants* **12**.

Lee Y, Rio DC, Biology S, Biology C. 2015. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem.* **84**, 291–323.

Li Y, Guo Q, Liu P, Huang J, Zhang S, Yang G, Wu C, Zheng C, Yan K. 2021. Dual roles of the serine/arginine-rich splicing factor SR45a in promoting and interacting with nuclear cap-binding complex to modulate the salt-stress response in Arabidopsis. *New Phytologist* **230**, 641–655.

Li Y, Kabbage M, Liu W, Dickman MB. 2016*a*. Aspartyl protease-mediated cleavage of BAG6 is necessary for autophagy and fungal resistance in plants. *Plant Cell* **28**, 233–247.

Li W, Lin WD, Ray P, Lan P, Schmidt W. 2013. Genome-wide detection of condition-sensitive alternative splicing in Arabidopsis roots. *Plant Physiology* **162**, 1750–1763.

Li R, Wei Z, Li Y, Shang X, Cao Y, Duan L, Ma L. 2022. SKI-INTERACTING PROTEIN interacts with SHOOT MERISTEMLESS to regulate shoot apical meristem formation. *Plant Physiology* **189**, 2193–2209.

Li S, Yamada M, Han X, Ohler U, Benfey PN. 2016*b*. High-Resolution Expression Map of the Arabidopsis Root Reveals Alternative Splicing and lincRNA Regulation. *Developmental Cell* **39**, 508–522.

Li Y, Zhu Y, Liu Y, Shu Y, Meng F, Lu Y, Bai X, Liu B, Guo D. 2008. Genome-wide identification of osmotic stress response gene in Arabidopsis thaliana. *Genomics* **92**, 488–493.

Li-Byarlay H, Li Y, Stroud H, et al. 2013. RNA interference knockdown of DNA methyltransferase 3 affects gene alternative splicing in the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 12750–12755.

Ling Y, Mahfouz MM, Zhou S. 2021. Pre-mRNA alternative splicing as a modulator for heat stress response in plants. *Trends in Plant Science* **26**, 1153–1170.

Liu J, Chen X, Liang X, Zhou X, Yang F, Liu J, He SY, Guo Z. 2016. Alternative Splicing of Rice WRKY62 and WRKY76 Transcription Factor Genes in Pathogen Defense. *Plant Physiology* **171**, 1427–1442.

Liu XX, Guo QH, Xu WB, Liu P, Yan K. 2022. Rapid Regulation of Alternative Splicing in Response to Environmental Stresses. *Frontiers in Plant Science* **13**.

Liu J, Sun N, Liu M, Liu J, Du B, Wang X, Qi X. 2013*a*. An autoregulatory loop controlling Arabidopsis HsfA2 expression: Role of heat shock-induced alternative splicing. *Plant Physiology* **162**, 512–521.

Liu J, Sun N, Liu M, Liu J, Du B, Wang X, Qi X. 2013*b*. An autoregulatory loop controlling Arabidopsis HsfA2 expression: Role of heat shock-induced alternative splicing. *Plant Physiology* **162**, 512–521.

- Liu Y, Zhang S.** 2004. Phosphorylation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase by MPK6, a Stress-Responsive Mitogen-Activated Protein Kinase, Induces Ethylene Biosynthesis in Arabidopsis[W]. *The Plant Cell* **16**, 3386–3399.
- Liu J, Zhang Y, Zheng Y, Zhu Y, Shi Y, Guan Z, Lang K, Shen D, Huang W, Dou D.** 2023. PlantExp: a platform for exploration of gene expression and alternative splicing based on public plant RNA-seq samples. *Nucleic Acids Research* **51**, D1483–D1491.
- Long JC, Caceres JF.** 2008. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochemical Journal* **417**, 15–27.
- Lopato S, Gattoni R, Fabini G, Stevenin J, Barta A.** 1999*a*. A novel family of plant splicing factors with a Zn knuckle motif: examination of RNA binding and splicing activities. *Plant Molecular Biology* **39**, 761–773.
- Lopato S, Kalyna M, Dorner S, Kobayashi R, Krainer AR, Barta A.** 1999*b*. atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from Arabidopsis thaliana, regulates splicing of specific plant genes. *Genes and Development* **13**, 987–1001.
- Lopato S, Waigmann E, Barta A.** 1996. Characterization of a novel arginine/serine-rich splicing factor in Arabidopsis. *The Plant Cell* **8**, 2255–2264.
- Lorković ZJ, Hilscher J, Barta A.** 2008. Co-localisation studies of Arabidopsis SR splicing factors reveal different types of speckles in plant cell nuclei. *Experimental Cell Research* **314**, 3175–3186.
- Love MI, Huber W, Anders S.** 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**, 1–21.
- de Luxán-Hernández C, Lohmann J, Tranque E, Chumova J, Binarova P, Salinas J, Weingartner M.** 2023. MDF is a conserved splicing factor and modulates cell division and stress response in Arabidopsis. *Life science alliance* **6**.
- Lv B, Hu K, Tian T, Wei K, Zhang F, Jia Y, Tian H, Ding Z.** 2021. The pre-mRNA splicing factor RDM16 regulates root stem cell maintenance in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology* **63**, 662–678.
- Lyons R, Stiller J, Powell J, Rusu A, Manners JM, Kazan K.** 2015. Fusarium oxysporum Triggers Tissue-Specific Transcriptional Reprogramming in Arabidopsis thaliana. (MA Blazquez, Ed.). *PLOS ONE* **10**, e0121902.
- Maeda K, Kunieda T, Tamura K, Hatano K, Hara-Nishimura I, Shimada T.** 2019. Identification of periplasmic root-cap mucilage in developing columella cells of arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology* **60**, 1296–1303.
- Makarova OV, Makarov EM, Lührmann R.** 2001. The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6·U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes. *The EMBO Journal* **20**, 2553–2563.

- Malamy JE, Benfey PN.** 1997. Analysis of SCARECROW expression using a rapid system for assessing transgene expression in Arabidopsis roots. *Plant Journal* **12**, 957–963.
- Mandadi KK, Scholthof K-BG.** 2015. Genome-Wide Analysis of Alternative Splicing Landscapes Modulated during Plant-Virus Interactions in *Brachypodium distachyon*. *The Plant Cell* **27**, 71–85.
- Manley JL, Krainer AR.** 2010. A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *GENES & DEVELOPMENT*, 1073–1074.
- Mao G, Meng X, Liu Y, Zheng Z, Chen Z, Zhang S.** 2011. Phosphorylation of a WRKY Transcription Factor by Two Pathogen-Responsive MAPKs Drives Phytoalexin Biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* **23**, 1639–1653.
- Marquez Y, Brown JWS, Simpson C, Barta A, Kalyna M.** 2012. Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Research* **22**, 1184–1195.
- Marquez Y, Höpfler M, Ayatollahi Z, Barta A, Kalyna M.** 2015. Unmasking alternative splicing inside protein-coding exons defines exons and their role in proteome plasticity. *Genome Research* **25**, 995–1007.
- Martín G, Márquez Y, Mántica F, Duque P, Irimia M.** 2021. Alternative splicing landscapes in Arabidopsis thaliana across tissues and stress conditions highlight major functional differences with animals. *Genome Biology* **22**, 1–26.
- Mayer A, Landry HM, Churchman LS.** 2017. Pause & go: from the discovery of RNA polymerase pausing to its functional implications. *Current Opinion in Cell Biology* **46**, 72–80.
- Meng X, Zhang S.** 2013. MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 245–266.
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral BW, Young ND.** 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal* **20**, 317–332.
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW.** 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *The Plant cell* **15**, 809–34.
- Misra CS, Sousa AGG, Barros PM, Kermanov A, Becker JD.** 2023. Cell-type-specific alternative splicing in the Arabidopsis germline. *Plant Physiology* **192**, 85–101.
- Molina C, Grotewold E.** 2005. Genome wide analysis of Arabidopsis core promoters. *BMC Genomics* **6**, 25.
- Morales J, Kadota Y, Zipfel C, Molina A, Torres MA.** 2016. The Arabidopsis NADPH oxidases RbohD and RbohF display differential expression patterns and contributions during plant immunity. *Journal of Experimental Botany* **67**, 1663–1676.

Muhammad S, Xu X, Zhou W, Wu L. 2023. Alternative splicing: An efficient regulatory approach towards plant developmental plasticity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **14**, 1–26.

Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JDG. 2004. The Transcriptional Innate Immune Response to flg22. Interplay and Overlap with Avr Gene-Dependent Defense Responses and Bacterial Pathogenesis. *Plant Physiology* **135**, 1113–1128.

Ner-Gaon H, Halachmi R, Savaldi-Goldstein S, Rubin E, Ophir R, Fluhr R. 2004. Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in Arabidopsis. *Plant Journal* **39**, 877–885.

Nicaise V, Joe A, Jeong B, Korneli C, Boutrot F, Westedt I, Staiger D, Alfano JR, Zipfel C. 2013. *Pseudomonas* HopU1 modulates plant immune receptor levels by blocking the interaction of their mRNAs with GRP7. *The EMBO Journal* **32**, 701-712–712.

Noe Gonzalez M, Blears D, Svejstrup JQ. 2021. Causes and consequences of RNA polymerase II stalling during transcript elongation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **22**, 3–21.

Noman A, Aqeel M, Lou Y. 2019. PRRs and NB-LRRs: From signal perception to activation of plant innate immunity. *International Journal of Molecular Sciences* **20**.

Obermeyer S, Kapoor H, Markusch H, Grasser KD. 2023a. Transcript elongation by RNA polymerase II in plants: factors, regulation and impact on gene expression. *Plant Journal* doi: 10.1111/tpj.16115.

Obermeyer S, Stöckl R, Schnekenburger T, Kapoor H, Stempffl T, Schwartz U, Grasser KD. 2023b. TFIS Is Crucial During Early Transcript Elongation for Transcriptional Reprogramming in Response to Heat Stress. *Journal of Molecular Biology* **435**, 167917.

Ogungbayi A, Lee J, Vaghela V, Yu F, Min X, Xiangjia M. 2023. Systematic Collection and Analysis of Alternative Splicing Events in Potato Plants. *Journal of Plant Sciences* **11**, 98–106.

Ohtani M, Wachter A. 2019. NMD-Based Gene Regulation - A Strategy for Fitness Enhancement in Plants? *Plant and Cell Physiology* **60**, 1953–1960.

Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG, Valent B. 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. *The Plant cell* **12**, 2019–32.

Pandit S, Zhou Y, Shiue L, Coutinho-Mansfield G, Li H, Qiu J, Huang J, Yeo GW, Ares M, Fu XD. 2013. Genome-wide Analysis Reveals SR Protein Cooperation and Competition in Regulated Splicing. *Molecular Cell* **50**, 223–235.

Pardal R, Heidstra R. 2021. Root stem cell niche networks: it's complexed! Insights from Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **72**, 6727–6738.

Passmore LA, Collier J. 2022. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **23**, 93–106.

Peart JR, Mestre P, Lu R, Malcuit I, Baulcombe DC. 2005. NRG1, a CC-NB-LRR Protein, together with N, a TIR-NB-LRR Protein, Mediates Resistance against Tobacco Mosaic Virus. *Current Biology* **15**, 968–973.

Peng Y, Van Wersch R, Zhang Y. 2018. Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**, 403–409.

Perilli S, Di Mambro R, Sabatini S. 2012. Growth and development of the root apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 17–23.

Perruc E, Kinoshita N, Lopez-Molina L. 2007. The role of chromatin-remodeling factor PKL in balancing osmotic stress responses during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal* **52**, 927–936.

Qin N, Zhang R, Zhang M, et al. 2020. Global Profiling of Dynamic Alternative Splicing Modulation in Arabidopsis Root upon *Ralstonia solanacearum* Infection. *Genes* **11**.

Rahman MS, Madina MH, Plourde MB, Dos Santos KCG, Huang X, Zhang Y, Laliberté JF, Germain H. 2021. The fungal effector Mlp37347 alters plasmodesmata fluxes and enhances susceptibility to pathogen. *Microorganisms* **9**, 1232–1247.

Rayapuram N, Bigeard J, Alhoraibi H, Bonhomme L, Hesse A-M, Vinh J, Hirt H, Pflieger D. 2018. Quantitative Phosphoproteomic Analysis Reveals Shared and Specific Targets of *Arabidopsis* Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) MPK3, MPK4, and MPK6 *. *Molecular & Cellular Proteomics* **17**, 61–80.

Reddy ASN, Marquez Y, Kalyna M, Barta A. 2013. Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *Plant Cell* **25**, 3657–3683.

Remy E, Cabrito TR, Baster P, Batista RA, Teixeira MC, Friml J, Sá-Correia I, Duque P. 2013. A Major Facilitator Superfamily Transporter Plays a Dual Role in Polar Auxin Transport and Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell* **25**, 901–926.

Rich-Griffin C, Eichmann R, Reitz MU, et al. 2020a. Regulation of Cell Type-Specific Immunity Networks in Arabidopsis Roots. *The Plant cell* **32**, 2742–2762.

Rich-Griffin C, Eichmann R, Reitz MU, et al. 2020b. Regulation of Cell Type-Specific Immunity Networks in Arabidopsis Roots. *The Plant cell* **32**, 2742–2762.

Ropitiaux M, Bernard S, Follet-Gueye M-L, Vicré M, Boulogne I, Driouich A. 2019. Xyloglucan and cellulose form molecular cross-bridges connecting root border cells in pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiology and Biochemistry* **139**, 191–196.

Roppolo D, De Rybel B, Tendon VD, Pfister A, Alassimone J, Vermeer JEM, Yamazaki M, Stierhof YD, Beeckman T, Geldner N. 2011. A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature* **473**, 381–384.

Rosenfeld MG, Lin CR, Amara SG, Stolarsky L, Roos BA, Ong ES, Evans RM. 1982. Calcitonin mRNA polymorphism: Peptide switching associated with alternative RNA splicing events.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**, 1717–1721.

Safaeizadeh M, Boller T. 2019. Differential and tissue-specific activation pattern of the AtPROPEP and AtPEPR genes in response to biotic and abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* **14**, e1590094.

Sakharkar MK, Chow VTK, Kanguene P. 2004. Distributions of exons and introns in the human genome. *In silico biology* **4**, 387–393.

Samach A, Melamed-Bessudo C, Avivi-Ragolski N, Pietrokovski S, Levy AA. 2011. Identification of Plant RAD52 Homologs and Characterization of the *Arabidopsis thaliana* RAD52-Like Genes. *The Plant Cell* **23**, 4266–4279.

Sanabria NM, Dubery IA. 2016. Alternative splicing of the receptor-like kinase Nt-Sd-RLK in tobacco cells responding to lipopolysaccharides: suggestive of a role in pathogen surveillance and perception? *FEBS Letters* **590**, 3628–3638.

Sanchez Carrillo IB, Hoffmann PC, Barff T, Beck M, Germain H. 2023. Preparing *Arabidopsis thaliana* root protoplasts for cryo electron tomography. *Frontiers in Plant Science* **14**.

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution* **3**, 430–439.

Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, Felix G, Chinchilla D. 2010. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *The Journal of biological chemistry* **285**, 9444–51.

Schürholz A-K, Lopez-Salmeron V, Li Z, et al. 2018. A Comprehensive Toolkit for Inducible, Cell Type-Specific Gene Expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **178**, 40–53.

Seok HY, Ha J, Lee SY, Bae H, Moon YH. 2020. Two alternative splicing variants of *aterf73/hre1*, *hre1α* and *hre1β*, have differential transactivation activities in *arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 1–23.

Sessions A, Weigel D, Yanofsky MF. 1999. The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant Journal* **20**, 259–263.

Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, Imamichi T, Chang W. 2022. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research* **50**, 216–221.

Sigrist CJA, de Castro E, Cerutti L, Cucho BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I. 2013. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research* **41**, D344–D347.

Singh MB, Lohani N, Bhalla PL. 2021. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress Response in Pollen Development and Heat Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science* **12**.

- Smakowska E, Kong J, Busch W, Belkhadir Y.** 2016. Organ-specific regulation of growth-defense tradeoffs by plants. *Current Opinion in Plant Biology* **29**, 129–137.
- Song A, Chen FX.** 2022. The pleiotropic roles of SPT5 in transcription. *Transcription* **13**, 53–69.
- Song Z, Zhang C, Jin P, Tetteh C, Dong X, Luo S, Zhang S, Li X, Liu Y, Zhang H.** 2022. The cell-type specific role of Arabidopsis bZIP59 transcription factor in plant immunity. *Plant, Cell & Environment* **45**, 1843–1861.
- Soutourina J.** 2018. Transcription regulation by the Mediator complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**, 262–274.
- Stahelin LA, Zheng HQ, Yoder TL, Smith JD, Todd P.** 2000. Columella Cells Revisited: Novel Structures, Novel Properties, and a Novel Gravisensing Model. *Gravit Space Biol Bull* **13**, 95–100.
- Strotmann VI, Stahl Y.** 2021. At the root of quiescence: function and regulation of the quiescent center. *Journal of Experimental Botany* **72**, 6716–6726.
- Su SH, Gibbs NM, Jancewicz AL, Masson PH.** 2017. Molecular Mechanisms of Root Gravitropism. *Current Biology* **27**, 964–972.
- Sugliani M, Brambilla V, Clerckx EJM, Koornneef M, Soppe WJJ.** 2010. The Conserved Splicing Factor SUA Controls Alternative Splicing of the Developmental Regulator ABI3 in Arabidopsis. *The Plant Cell* **22**, 1936–1946.
- Sun Y, Hamilton K, Tong L.** 2020. Recent molecular insights into canonical pre-mRNA 3'-end processing. *Transcription* **11**, 83–96.
- Sun T, Zhang Y, Li Y, Zhang Q, Ding Y, Zhang Y.** 2015. ChIP-seq reveals broad roles of SARD1 and CBP60g in regulating plant immunity. *Nature Communications* **6**, 10159.
- Szakonyi D, Duque P.** 2018. Alternative splicing as a regulator of early plant development. *Frontiers in Plant Science* **9**.
- Tang B, Feng L, Hulin MT, Ding P, Tang B, Feng L, Hulin MT, Ding P, Ma W.** 2023. Resource Cell-type-specific responses to fungal infection in plants revealed by single-cell transcriptomics II II Cell-type-specific responses to fungal infection in plants revealed by single-cell transcriptomics. *Cell Host and Microbe* **31**, 1732-1747.e5.
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang H-S, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F.** 2003. Quantitative Nature of Arabidopsis Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* **15**, 317–330.
- Tapial J, Ha KCH, Sterne-Weiler T, et al.** 2017. An atlas of alternative splicing profiles and functional associations reveals new regulatory programs and genes that simultaneously express multiple major isoforms. *Genome Research* **27**, 1759–1768.

Theisen FF, Prestel A, Elkjær S, Leurs YHA, Morffy N, Strader LC, O'Shea C, Teilum K, Kragelund BB, Skriver K. 2024. Molecular switching in transcription through splicing and proline-isomerization regulates stress responses in plants. *Nature Communications* **15**, 592.

Thoma S, Hecht U, Kippers A, Botella J, De Vries S, Somerville C. 1994. Tissue-Specific Expression of a Gene Encoding a Cell Wall-Localized Lipid Transfer Protein from Arabidopsis. *Plant Physiology* **105**, 35–45.

Thomas QA, Ard R, Liu J, Li B, Wang J, Pelechano V, Marquardt S. 2020. Transcript isoform sequencing reveals widespread promoter-proximal transcriptional termination in Arabidopsis. *Nature Communications* **11**.

Thompson HL, Shen W, Matus R, et al. 2023. MERISTEM-DEFECTIVE/DEFECTIVELY ORGANIZED TRIBUTARIES2 regulates the balance between stemness and differentiation in the root meristem through RNA splicing control. *Development (Cambridge)* **150**.

Tian W, Hou C, Ren Z, et al. 2019a. A calmodulin-gated calcium channel links pathogen patterns to plant immunity. *Nature* **572**, 131–135.

Tian C, Wang Y, Yu H, He J, Wang J, Shi B, Du Q, Provart NJ, Meyerowitz EM, Jiao Y. 2019b. A gene expression map of shoot domains reveals regulatory mechanisms. *Nature Communications* **10**.

To A, Valon C, Savino G, Guilleminot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F. 2006. A Network of Local and Redundant Gene Regulation Governs Arabidopsis Seed Maturation. *The Plant Cell* **18**, 1642–1651.

Tognacca RS, Rodríguez FS, Aballay FE, Cartagena CM, Servi L, Petrillo E. 2023. Alternative splicing in plants: current knowledge and future directions for assessing the biological relevance of splice variants. *Journal of Experimental Botany* **74**, 2251–2272.

Ullah F, Hamilton M, Reddy ASN, Ben-Hur A. 2018. Exploring the relationship between intron retention and chromatin accessibility in plants. *BMC genomics* **19**, 21.

Vainonen JP, Jaspers P, Wrzaczek M, Lamminmäki A, Reddy RA, Vaahtera L, Brosché M, Kangasjärvi J. 2012. RCD1–DREB2A interaction in leaf senescence and stress responses in Arabidopsis thaliana. *Biochemical Journal* **442**, 573–581.

Van Aken O, Zhang B, Carrie C, Uggalla V, Paynter E, Giraud E, Whelan J. 2009. Defining the mitochondrial stress response in arabidopsis thaliana. *Molecular Plant* **2**, 1310–1324.

Viola IL, Gonzalez DH. 2016. Chapter 6 - Structure and Evolution of Plant Homeobox Genes. In: Gonzalez DH, ed. *Plant Transcription Factors*. Boston: Academic Press, 101–112.

Voigt CA. 2014. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science* **5**.

Voss M, Cseke LJ, Gassmann W, Niefind K. 2023. A splicing variant of EDS1 from *Vitis vinifera* forms homodimers but no heterodimers with PAD4. *Protein Science* **32**, e4624.

- Wahl MC, Will CL, Lührmann R.** 2009. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* **136**, 701–718.
- Wallner E-S, López-Salmerón V, Belevich I, et al.** 2017. Strigolactone- and Karrikin-Independent SMXL Proteins Are Central Regulators of Phloem Formation. *Current biology : CB* **27**, 1241–1247.
- Wang L, Cao C, Ma Q, et al.** 2014. RNA-seq analyses of multiple meristems of soybean: novel and alternative transcripts, evolutionary and functional implications. *BMC Plant Biology* **14**, 169.
- Wang X, Gong L, Zhang J, Wang L, Wu D, Xu J.** 2024. The Genome-Wide Profiling of Alternative Splicing in Willow under Salt Stress. *Forests* **15**.
- Wang X, Hu L, Wang X, Li N, Xu C, Gong L, Liu B.** 2016. DNA Methylation Affects Gene Alternative Splicing in Plants: An Example from Rice. *Molecular Plant* **9**, 305–307.
- Wang Z, Ji H, Yuan B, Wang S, Su C, Yao B, Zhao H, Li X.** 2015*a*. ABA signalling is fine-tuned by antagonistic HAB1 variants. *Nature Communications* **6**, 8138.
- Wang Z, Ji H, Yuan B, Wang S, Su C, Yao B, Zhao H, Li X.** 2015*b*. ABA signalling is fine-tuned by antagonistic HAB1 variants. *Nature Communications* **6**, 8138.
- Wang Y, Li X, Fan B, Zhu C, Chen Z.** 2021. Regulation and function of defense-related callose deposition in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 1–15.
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB.** 2008. Alternative Isoform Regulation in Human Tissue Transcriptomes. *Nature* **456**, 470–476.
- Wang M, Wang P, Liang F, et al.** 2018. A global survey of alternative splicing in allopolyploid cotton: landscape, complexity and regulation. *New Phytologist* **217**, 163–178.
- Wang Y-Y, Xiong F, Ren Q-P, Wang X-L.** 2020. Regulation of flowering transition by alternative splicing: the role of the U2 auxiliary factor. *Journal of Experimental Botany* **71**, 751–758.
- Wani SH, Anand S, Singh B, Bohra A, Joshi R.** 2021. WRKY transcription factors and plant defense responses: latest discoveries and future prospects. *Plant Cell Reports* **40**, 1071–1085.
- Willmann R, Lajunen HM, Erbs G, et al.** 2011. Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 19824–19829.
- Wu CH, Yamaguchi Y, Benjamin LR, Horvat-Gordon M, Washinsky J, Enerly E, Larsson J, Lambertsson A, Handa H, Gilmour D.** 2003. NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes and Development* **17**, 1402–1414.
- 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.

- Xiang T, Zong N, Zou Y, et al.** 2008. Pseudomonas syringae Effector AvrPto Blocks Innate Immunity by Targeting Receptor Kinases. *Current Biology* **18**, 74–80.
- Xie JQ, Zhou X, Jia ZC, Su CF, Zhang Y, Fernie AR, Zhang J, Du ZY, Chen MX.** 2023. Alternative Splicing, An Overlooked Defense Frontier of Plants with Respect to Bacterial Infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* doi: 10.1021/acs.jafc.3c04163.
- Xing D, Wang Y, Hamilton M, Ben-Hur A, Reddy ASN.** 2015. Transcriptome-Wide Identification of RNA Targets of Arabidopsis SERINE/ARGININE-RICH45 Uncovers the Unexpected Roles of This RNA Binding Protein in RNA Processing. *The Plant cell* **27**, 3294–3308.
- Xue Z, Liu L, Zhang C.** 2020a. Regulation of shoot apical meristem and axillary meristem development in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **21**.
- Xue Z, Liu L, Zhang C.** 2020b. Regulation of Shoot Apical Meristem and Axillary Meristem Development in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **21**.
- Xue C, Zhang H, Lin Q, Fan R, Gao C.** 2018. Manipulating mRNA splicing by base editing in plants. *Science China Life Sciences* **61**, 1293–1300.
- Yamamoto YY, Ichida H, Matsui M, Obokata J, Sakurai T, Satou M, Seki M, Shinozaki K, Abe T.** 2007. Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC Genomics* **8**, 67.
- Yan Q, Xia X, Sun Z, Fang Y.** 2017. Depletion of Arabidopsis SC35 and SC35-like serine/arginine-rich proteins affects the transcription and splicing of a subset of genes. *PLOS Genetics* **13**, e1006663.
- Yan J, Yu H, Li B, Fan A, Melkonian J, Wang X, Zhou T, Hua J.** 2019. Cell autonomous and non-autonomous functions of plant intracellular immune receptors in stomatal defense and apoplastic defense. *PLoS Pathogens* **15**, 1–25.
- Yang DL, Huang K, Deng D, Zeng Y, Wang Z, Zhang Y.** 2023. DNA-dependent RNA polymerases in plants. *Plant Cell* **35**, 3641–3661.
- Yang S, Tang F, Zhu H.** 2014a. Alternative splicing in plant immunity. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 10424–10445.
- Yang Z-T, Wang M-J, Sun L, Lu S-J, Bi D-L, Sun L, Song Z-T, Zhang S-S, Zhou S-F, Liu J-X.** 2014b. The Membrane-Associated Transcription Factor NAC089 Controls ER-Stress-Induced Programmed Cell Death in Plants. *PLOS Genetics* **10**, e1004243-.
- Yang W, Wightman R, Meyerowitz EM.** 2017a. Cell Cycle Control by Nuclear Sequestration of CDC20 and CDH1 mRNA in Plant Stem Cells. *Molecular Cell* **68**, 1108-1119.e3.
- Yang W, Wightman R, Meyerowitz EM.** 2017b. Cell Cycle Control by Nuclear Sequestration of CDC20 and CDH1 mRNA in Plant Stem Cells. *Molecular Cell* **68**, 1108-1119.e3.

Yearim A, Gelfman S, Shayevitch R, et al. 2015. HP1 Is Involved in Regulating the Global Impact of DNA Methylation on Alternative Splicing. *Cell Reports* **10**, 1122–1134.

Zhang R, Calixto CPG, Marquez Y, et al. 2017*a*. A high quality Arabidopsis transcriptome for accurate transcript-level analysis of alternative splicing. *Nucleic Acids Research* **45**, 5061–5073.

Zhang R, Calixto CPG, Tzioutziou NA, et al. 2015. AtRTD – a comprehensive reference transcript dataset resource for accurate quantification of transcript-specific expression in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **208**, 96–101.

Zhang W, Du B, Liu D, Qi X. 2014*a*. Splicing factor SR34b mutation reduces cadmium tolerance in Arabidopsis by regulating iron-regulated transporter 1 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **455**, 312–317.

Zhang X, Garreton V, Chua NH. 2005. The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes and Development* **19**, 1532–1543.

Zhang XC, Gassmann W. 2003. RPS4-Mediated Disease Resistance Requires the Combined Presence of RPS4 Transcripts with Full-Length and Truncated Open Reading Frames. *Plant Cell* **15**, 2333–2342.

Zhang X-C, Gassmann W. 2007. Alternative Splicing and mRNA Levels of the Disease Resistance Gene RPS4 Are Induced during Defense Responses. *Plant Physiology* **145**, 1577–1587.

Zhang R, Kuo R, Coulter M, et al. 2022. A high-resolution single-molecule sequencing-based Arabidopsis transcriptome using novel methods of Iso-seq analysis. *Genome Biology* **23**, 1–37.

Zhang Z, Liu Y, Ding P, Li Y, Kong Q, Zhang Y. 2014*b*. Splicing of receptor-like kinase-encoding SNC4 and CERK1 is regulated by two conserved splicing factors that are required for plant immunity. *Molecular Plant* **7**, 1766–1775.

Zhang X-N, Shi Y, Powers JJ, Gowda NB, Zhang C, Ibrahim HMM, Ball HB, Chen SL, Lu H, Mount SM. 2017*b*. Transcriptome analyses reveal SR45 to be a neutral splicing regulator and a suppressor of innate immunity in Arabidopsis thaliana. *BMC Genomics* **18**, 772.

Zheng J, Liu F, Zhu C, Li X, Dai X, Yang B, Zou X, Ma Y. 2019. Identification, expression, alternative splicing and functional analysis of pepper WRKY gene family in response to biotic and abiotic stresses. *PLOS ONE* **14**, e0219775-.

Zhou Z, Fu XD. 2013. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma* **122**, 191–207.

Zhu F, Farnung L, Kaasinen E, et al. 2018*a*. The interaction landscape between transcription factors and the nucleosome. *Nature* **562**, 76–81.

Zhu G, Li W, Zhang F, Guo W. 2018*b*. RNA-seq analysis reveals alternative splicing under salt stress in cotton, *Gossypium davidsonii*. *BMC Genomics* **19**, 73.

Zhu J, Liu M, Liu X, Dong Z. 2018c. RNA polymerase II activity revealed by GRO-seq and pNET-seq in Arabidopsis. *Nature Plants* **4**, 1112–1123.

Zhu X, Xu Z, Wang G, *et al.* 2023. Single-cell resolution analysis reveals the preparation for reprogramming the fate of stem cell niche in cotton lateral meristem. *Genome Biology* **24**, 1–31.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G. 2006. Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. *Cell* **125**, 749–760.

CHAPITRE III : DISCUSSION

L'épissage alternatif est un processus vital chez les eucaryotes. Ce mécanisme conservé participe grandement à la plasticité développementale des végétaux. Il permet donc l'adaptation aux stimuli internes et externes. Pour ce faire, il intervient à différentes étapes de nombreux mécanismes de tolérance aux stress, ainsi qu'au cours du développement normal des plantes. Par exemple, l'épissage alternatif peut agir en créant un changement de ratio entre différents isoformes de protéines, permettant ainsi l'activation ou la répression d'une voie de signalisation. Ce mécanisme peut aussi intervenir dans la régulation de la traduction en générant des variants d'épissage aberrants qui seront par la suite dégradés ou retenus dans le noyau. Enfin, le choix du site d'épissage ou encore la vitesse de l'ARN polymérase II impactent la production d'ARNm matures et donc la réponse de la plante à différents stimuli. Comme mentionné dans l'introduction, de nombreuses équipes se sont appliquées à l'identification d'isoformes de gènes spécifiques, ainsi qu'à leur caractérisation. De plus, on retrouve un nombre grandissant d'études tentant d'élucider la fonction biologique et le mécanisme d'action de plusieurs facteurs d'épissage. Le tout participe grandement à clarifier les nombreuses étapes du processus d'épissage alternatif ainsi que ses nombreuses fonctions. Malgré tout, plusieurs points clés de ce mécanisme nécessitent encore d'être analysés. La composition de l'épissosome à différentes étapes varie grandement. La compréhension de la dynamique exacte du réarrangement de l'épissosome pendant l'épissage a encore besoin d'être approfondie (Wahl *et al.*, 2009). La cinétique exacte de l'épissage couplé à la transcription est un autre exemple de processus nécessitant plus de recherches (Jia *et al.*, 2020). Enfin, l'étendue de l'impact de l'épissage alternatif à l'échelle de l'organisme au complet reste aussi à être étudiée.

Parmi les stimuli externes auxquels l'épissage alternatif a été lié, la réponse aux stress biotiques a notamment fait l'objet de plusieurs études récentes. Comme décrit plus tôt (section 1.4.3), l'immunité végétale est régulée à plusieurs étapes par l'épissage alternatif de multiples transcrits. Ce processus intervient aussi bien dans la détection d'agents pathogènes que dans l'activation des voies de défense qui en découlent. Il est aussi lui-même régulé durant la réponse immunitaire. En effet, l'intervention de facteurs d'épissage durant un stress biotique peut influencer le choix de site d'épissage et l'assemblage de l'épissosome. L'épissage alternatif joue donc un rôle important dans la réponse de défense des plantes face à l'infection par un microorganisme.

Les travaux de thèse présentés ici tentent de connecter trois pans majeurs de la biologie végétale: l'épissage alternatif, l'identité cellulaire et l'immunité végétale. En effet, de plus en plus d'études

soulignent l'impact de l'épissage sur l'identité cellulaire et l'immunité, d'autres ont mis en lumière l'influence de l'identité cellulaire sur l'immunité. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces trois aspects biologiques sont interconnectés et agissent de manière synergique afin d'établir l'équilibre nécessaire à la croissance végétale.

Pour déterminer si cette hypothèse est véridique ou non, nous avons monté un protocole d'extraction de protoplastes à partir de plants ayant poussé sur du milieu gélosé. Ce protocole nécessitait beaucoup d'optimisation et a été publié sous forme d'article scientifique (Sanchez Carrillo *et al.*, 2023). Il est disponible à l'annexe G. Par la suite, comme mentionné dans la partie *Methods* de la section 2.3, ces protoplastes sont triés par cytométrie en flux afin d'isoler les différents types cellulaires. L'ARN de ces protoplastes est extrait et envoyé au séquençage. Cette méthode, à l'inverse du séquençage de cellule unique, nous permet d'avoir un certain nombre de cellules du même type cellulaire afin de réaliser d'éventuelles validations par PCR.

3.1 L'épissage alternatif et la transcription, deux processus indépendants.

L'épissage est un processus dynamique qui fonctionne souvent en concordance avec la transcription. En effet, les ARN naissants sont souvent engagés dans l'épissosome avant même d'être séparé de la Pol II. De ce fait, plusieurs processus liés à la transcription vont donc influencer différentes étapes de l'épissage constitutif et alternatif. Malgré ces observations, en accord avec plusieurs autres études, nos résultats indiquent une disparité au niveau des gènes visés par la transcription et par l'épissage alternatif. Cette disparité n'est pas unique à l'identité cellulaire car elle est aussi retrouvée lors de la réponse à différents types de stress. Lors de l'analyse du paysage d'épissage alternatif des racines d'*Arabidopsis* déficientes en fer, Li *et al.*, (2013) ont observé le même phénomène. La déficience en fer induit l'épissage différentiel de 313 gènes et l'expression différentielle de 429 gènes. Ces deux groupes de gènes ne partagent que 26 gènes en commun. Leur analyse fonctionnelle a identifié aussi bien des différences que des similarités entre les deux groupes de gènes. Bien que la majorité des processus enrichis identifiés soit divergente, les quelques procédés partagés en commun sont liés directement à la tolérance au stress ferrique. Cette observation suggère que, bien que très différente, la régulation de l'expression génique et de l'épissage alternatif est coordonnée dans une certaine mesure en visant des processus cruciaux à l'adaptation de la plante. Le découplage de la transcription et de l'épissage alternatif, malgré que ce dernier se produise de façon concomitante à la transcription,

peut aussi être observé en réponse à de nombreux autres stress. Guo *et al.*, (2023) a rassemblé les données d'expression génique et d'épissage alternatif en réponse à 10 stress différents dans le but de construire la base de données PlaASB (section 1.4.1). Là aussi, les groupes de gènes différentiellement exprimés et différentiellement épissés partagent très peu de gènes en commun. À travers les 10 conditions de stress compilées ici, en moyenne seulement 17% des gènes régulés au niveau de l'épissage le sont aussi au niveau de l'expression. Leur analyse fonctionnelle de gènes différentiellement épissés identifie principalement des processus généraux comme la régulation de processus biologiques, ce qui suggère que l'épissage est en contrôle de fonctions plus basiques. L'analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés quant à elle identifie majoritairement des processus liés à la résistance aux stress. Martín *et al.*, (2021) a observé le même phénomène, aussi bien au niveau du nombre de gènes différentiellement exprimés et épissés, qu'au niveau de l'analyse fonctionnelle chez *Arabidopsis*. Là aussi la réponse au stress semble être liée principalement à la transcription, puisque le groupe de gènes régulés au niveau de la transcription est enrichi en processus tels que la réponse au froid pour le stress abiotique et la réponse de défense pour les stress biotiques. L'épissage alternatif vise des processus plus en amont tels que le traitement de l'ARNm et la régulation de la transcription. Cette observation est aussi applicable aux gènes régulés au niveau de l'expression et de l'épissage alternatif entre différents tissus et types cellulaires, comme c'est le cas dans notre analyse. En plus de cette différence entre la transcription et l'épissage alternatif, notre étude a aussi souligné une différence au niveau du profil de ces deux groupes. Le profil d'épissage alternatif regroupe les différents types cellulaires en fonction de leur organe d'origine. Les types cellulaires aériens et racinaires sont donc séparés en deux groupes. Ces grappes ne sont pas visibles au niveau du profil d'expression génique, ce qui suggère que le profil d'épissage alternatif corrèle plus fidèlement avec l'identité cellulaire. Il est important de noter que l'analyse de profil d'épissage alternatif et d'expression génique a été réalisée sur l'ensemble des gènes alignés et non sur les gènes identifiés comme étant spécifiques à un type cellulaire. Lorsqu'on observe l'analyse fonctionnelle des gènes régulés au niveau de la transcription spécifiquement à un type cellulaire, on note le développement tissulaire. Comme mentionné plus tôt, l'épissage alternatif semble réguler des processus plus en amont durant la réponse au stress. Cette observation est aussi vraie pour la différenciation cellulaire. Nos résultats d'analyse fonctionnelle montrent que l'épissage alternatif intervient dans des processus tels que la régulation de la transcription ou encore le métabolisme de l'ARN. Les profils d'expression et d'épissage couplés à l'analyse fonctionnelle suggèrent que la transcription cible directement des gènes impliqués dans le développement tissulaire. L'épissage alternatif quant à lui semble cibler la régulation de l'expression génique et de

l'épissage alternatif en tant que tel dans le but putatif d'influencer en aval des processus liés à l'identité cellulaire.

Bien que l'épissage alternatif soit un processus co-transcriptionnel, nos résultats combinés à ceux obtenus dans d'autres études, pointent tous vers la conclusion que la régulation de l'épissage alternatif et celle de la transcription sont indépendantes dans une certaine mesure. La régulation de la transcription et de l'épissage alternatif cible donc des processus biologiques aux rôles divergents, mais participent tous deux à l'adaptation aux signaux internes et externes et ce, à différents niveaux. Martin *et al.*, 2021 discute des régulations de ces deux processus comme étant très indépendantes. Les auteurs lient cette séparation entre les deux mécanismes aux différents motifs géniques retrouvés dans les gènes régulés au niveau de la transcription ou de l'épissage. Les gènes transcrits différemment ont tendance à présenter des sites d'épissage plus forts, à être de plus petite taille, avec moins d'introns et une séquence promotrice plus longue avec plus de sites de liaison aux facteurs de transcription. Les gènes régulés au niveau de l'épissage quant à eux présentent des motifs opposés à ceux vus précédemment. Ces observations laissent entendre que les gènes différemment transcrits ou épissés sont intrinsèquement plus sujets à être régulés au niveau de la transcription ou de l'épissage respectivement.

Il semble donc que bien que ces deux mécanismes fonctionnent en concordance, leur régulation est indépendante. Pourtant, comme nous l'avons abordé plus tôt (section 1.3.2.2), la régulation de l'épissage alternatif est, dans une certaine mesure, liée à la transcription puisqu'elle est entre autres influencée par la vitesse de l'ARN polymérase II. Malheureusement, la transcription et l'épissage alternatif sont deux processus très dynamiques, ce qui rend l'étude de la coordination de ces deux mécanismes, ardue. Pour y pallier, Jia *et al.*, (2020) ont eu recours à du séquençage en longues lectures couplé à du fractionnement de transcrits en cours d'élongation ou polyadénylés. Cette méthode a permis aux auteurs d'observer une accumulation d'ARNm partiellement épissés, polyadénylés et liés à la chromatine, dans le noyau. Ces ARNm subissent le processus d'épissage alternatif une première fois. Lors du premier épissage de ces ARNm, certains introns d'un même transcrit vont y être retenus, tandis que d'autres seront correctement épissés. Les sites d'épissage d'introns retenus étant plus faibles que ceux des introns correctement épissés la première fois pourrait expliquer cette sélection. La rétention de ces ARNm dans le noyau les protégerait de la dégradation par la NMD. Ces ARNm partiellement épissés seraient donc épissés de manière post-transcriptionnelle avant d'être transportés dans le cytosol pour traduction. Les auteurs émettent donc l'hypothèse que ces ARNm partiellement épissés sont conservés dans le noyau et épissés sur demande, évitant ainsi le besoin de passer par une étape de

transcription supplémentaire. Ce mécanisme est lié à l'activité de deux facteurs d'épissage; SKIP et PRMT5 (Protein Arginine Methyltransferase 5), puisque leur inactivation engendre la répression de l'épissage post-transcriptionnel. Ce phénomène a déjà été documenté dans d'autres organismes comme l'humain et la souris (Boutz *et al.*, 2015). Il est donc possible que le découplage entre l'expression génique et l'épissage alternatif observé soit attribuable à l'épissage post-transcriptionnel d'ARNm retenus dans le noyau.

Tous ces résultats compilés nous donnent une vue plus élargie de la coordination et la régulation de la transcription et de l'épissage alternatif. Malgré tout, beaucoup reste à faire pour être capable de comprendre les détails mécanistiques ainsi que la cinétique de régulation de la transcription et de l'épissage alternatif. L'utilisation de méthodes telles que le séquençage en longues lectures de gènes en cours d'élongation et/ou d'épissage pourrait apporter beaucoup à la compréhension de la dynamique entre ces deux mécanismes.

3.2 L'identité cellulaire et l'épissage alternatif

Notre étude a identifié une différence notable du paysage d'épissage alternatif à travers les 11 différents types cellulaires utilisés. L'épissage alternatif participe donc grandement à moduler l'identité cellulaire. Comme nous l'avons discuté plus tôt, il existe une certaine corrélation entre le profil d'épissage alternatif et l'organisation tissulaire, puisque ces profils se regroupent en fonction de l'organe duquel ils proviennent (ANNEXE D). Tels que mentionné ci-dessus, nous émettons l'hypothèse que l'épissage alternatif contrôle des processus biologiques généraux en amont de l'expression génique, qui elle-même impactera alors le développement végétal.

L'épissage alternatif a donc un lien indéniable avec le développement et l'identité cellulaire. Nous avons déjà discuté de son rôle au cours des différentes étapes du développement végétal tel que l'embryogénèse et la germination (section 1.3.3). Une des particularités de notre étude est qu'elle prend en compte de nombreux types cellulaires retrouvés dans les méristèmes végétaux. Jusqu'à présent, très peu se sont penchés sur l'impact global de l'épissage alternatif dans ces zones. Les méristèmes représentent des niches de cellules très actives dans lesquelles prennent place des processus développementaux cruciaux qui permettent la formation de la plupart des organes matures. Le manque d'études sur l'épissage alternatif et les méristèmes ne vient certainement pas d'un manque d'intérêt, mais plutôt d'une certaine complexité expérimentale. Bien que très actives, les cellules de méristèmes sont souvent présentes en nombre très faible.

C'est le cas par exemple du centre quiescent qui est constitué d'en moyenne 4 cellules chez *Arabidopsis* (Strotmann and Stahl, 2021), ce qui rend ardue l'obtention d'un nombre suffisant de cellules pour toutes les analyses. Parmi les études décrivant le paysage d'épissage alternatif du méristème apical, on compte notamment celle de Tian *et al.*, (2019b) que nous avons déjà mentionné plus tôt. Dans cet article, les auteurs ont analysé les changements d'expression génique à travers différents types cellulaires du SAM répartis à travers ses différentes zones développementales. Ils ont notamment identifié 757 gènes différentiellement épissés entre les différentes zones. Cette étude, ainsi que nos propres résultats, identifient la zone centrale du SAM comme étant particulièrement sujette à de la régulation d'épissage alternatif. La zone centrale regroupe des cellules souches qui sont sous une régulation stricte afin de contrôler la vitesse de différenciation et donc de formation des organes aériens (Xue *et al.*, 2020a). Nos résultats suggèrent fortement que l'épissage alternatif intervient dans le maintien de l'équilibre entre la pluripotence et la différenciation. Un autre point intéressant est la tendance générale vers l'induction de l'expression génique (plutôt que la répression) des cellules de la zone centrale, comparé aux cellules de la zone périphérique et de la première couche monoclonale L1. Ainsi, plus de processus biologiques spécifiques à la zone centrale nécessitent d'être déclenchés. Les cellules souches et leur maintien étant un processus très dynamique et probablement énergivore, il est raisonnable de penser qu'elles ont besoin de plus de mécanismes et de voies moléculaires que le reste du SAM. Cette tendance est aussi visible pour les gènes différentiellement épissés. Jusqu'à 85% de ces gènes sont régulés à la hausse. Cependant, nous ne pouvons émettre de conclusions par rapport à ce résultat. En effet, un variant d'épissage étant plus présent que ses autres isoformes n'indique pas nécessairement qu'il sera plus traduit par la suite. Puisque nous ne savons pas le type d'évènements d'épissage alternatif régulé à la hausse ici, il est difficile d'émettre plus de conclusions. Il pourrait, par exemple s'agir de transcrits aberrants qui seront dégradés par la NMD.

La fonction physiologique de cette régulation ainsi que celle des variants d'épissage générés dans les différentes zones du SAM restent encore à être élucidées. Cependant, l'analyse fonctionnelle des gènes différentiellement épissés et exprimés dans le SAM nous apportent des éléments de réponse. Là aussi, nous observons le même phénomène que décrit précédemment lorsque l'on compare les gènes différentiellement épissés et transcrits. Les cellules du SAM subissent de la régulation génique en lien direct avec le développement tissulaire et la maintenance du méristème, tandis que les gènes différentiellement épissés eux contrôlent des processus généraux tels que la signalisation cellulaire.

Le paysage d'épissage alternatif du méristème apical racinaire a quant à lui déjà été établi par plusieurs équipes en utilisant différentes méthodes, certaines d'entre elles ayant été listées plus tôt (section 1.4.1). Notre étude utilise cependant des types cellulaires racinaires très proches en termes d'identité, nous nous attendions donc à obtenir un nombre assez restreint d'évènements d'épissage spécifiques au type cellulaire. Malgré cela, nous avons tout de même été capables d'en identifier un certain nombre. Les types cellulaires racinaires adjacents se distinguent principalement par la zone développementale dans laquelle ils se trouvent. Ainsi, notre analyse a su rassembler les changements d'épissage alternatif et d'expression génique nécessaires aux différentes étapes développementales de types cellulaires analogues. Li *et al.*, (2016) a aussi observé la reprogrammation d'épissage alternatif entre les trois zones développementales majeures des racines, la zone méristématique, la zone d'élongation et la zone de maturation. Les auteurs soulignent notamment que les différentes zones développementales présentent beaucoup plus d'isoformes différentiellement épissés que lors de la comparaison deux à deux de types cellulaires adjacents. Ils en tirent la conclusion que l'épissage alternatif joue un rôle plus important dans le développement et la maturation des cellules, peu importe le type cellulaire. Cette observation est en concordance avec nos résultats jusqu'à une certaine mesure. En effet, l'intensité de la régulation de l'épissage alternatif entre les différents types cellulaires adjacents est relativement faible. Toutefois, cela ne signifie pas que l'épissage n'y joue pas un rôle important. Le fait que, même en comparant des types cellulaires proches en identité, on puisse identifier une reprogrammation d'épissage alternatif, suggère que ce mécanisme est impliqué dans des processus transitoires, mais néanmoins primordiaux à la maturation des différents types cellulaires. De plus, il semble évident que la comparaison de deux zones développementales aussi différentes que la zone méristématique et la zone de maturation, qui sont-elles mêmes composées de nombreux types cellulaires différents, mènera à l'identification de nettement plus d'évènements d'épissage différentiel.

Un des résultats les plus intéressants de notre étude est, bien sûr, l'intensité de la régulation d'épissage alternatif des cellules de la columelle et nous allons en discuter sous peu. Outre la columelle, les cellules du centre quiescent, bien qu'à une intensité bien moindre, présentent aussi un profil intéressant d'épissage alternatif et d'expression génique. C'est d'ailleurs le type cellulaire racinaire qui présente le plus de variants d'épissage après les cellules de la columelle. Ce résultat s'aligne avec notre hypothèse précédente qui soutient que l'épissage alternatif intervient dans le maintien des niches de cellules souches, comme c'est le cas dans le SAM.

Comme discuté ci-dessus, maintenant que le paysage d'épissage alternatif de types cellulaires a été établi, la question de la fonction physiologique des variants d'épissage identifiés reste à être

élucidée. Tel que décrit dans la section 1.3.3.1, certaines équipes ont entamé la caractérisation de variants d'épissage spécifiques des méristèmes. Ces études ouvrent la voie à de nombreuses perspectives liées à notre étude. Premièrement, notre étude a identifié plus de 700 gènes différentiellement épissés, établissant les bases pour une caractérisation plus systématique d'isoformes spécifiques aux types cellulaires. Deuxièmement, les études ayant élucidé la fonction physiologique d'isoformes liés aux méristèmes se concentre généralement sur les facteurs d'épissage tels que RDM16 ou encore MDF (section 1.3.3.1.2). Il serait donc intéressant dans le futur d'explorer notre jeu de données à la recherche de variants de facteurs d'épissage ou encore de composants de l'épissosome.

En général, les résultats présentés ici indiquent que l'épissage alternatif a un impact important sur l'identité cellulaire et le développement végétal en général. Plus particulièrement, l'épissage alternatif semble intervenir dans le maintien des niches de cellules souches aussi bien au niveau du RAM que du SAM. La base de données que nous avons assemblée ici représente une des premières bases composées de types cellulaires du SAM et du RAM ayant été échantillonnés et analysés de manière uniforme, permettant ainsi la comparaison du rôle de l'épissage alternatif dans les deux méristèmes.

3.3 L'épissage alternatif: un pont entre l'immunité et le développement végétal

Un des objectifs principaux des travaux de recherches présentés ici est notamment d'établir un lien entre l'épissage alternatif, l'identité cellulaire et l'immunité végétale. Tel que décrit plus tôt (section 1.4.3), l'épissage alternatif intervient à chaque étape de la réponse de défense et y occupe un rôle central de régulation. L'épissage alternatif impacte aussi grandement l'identité cellulaire comme le montrent nos propres résultats, ainsi que plusieurs autres travaux de recherche cités plus tôt. Du reste, de plus en plus d'études indiquent que la réponse de défense végétale est aussi dépendante du type cellulaire. Face à ces observations, nous avons émis l'hypothèse que l'immunité végétale, l'identité cellulaire et l'épissage alternatif sont interconnectés.

Notre analyse a identifié 92 variants d'épissage reliés à l'immunité végétale comme étant différentiellement épissés de manière spécifique au type cellulaire. Bien que ce nombre soit relativement faible, il n'est pas surprenant, puisque nous n'avons pas élicité de réponse de défense en tant que telle, dans les plants/cellules collecté.e.s au cours de nos expériences. De plus, l'analyse fonctionnelle des gènes régulés au niveau de la transcription a mis en lumière de

nombreux processus liés à l'immunité végétale. Cette observation est cohérente avec le nombre de gènes différentiellement exprimés de manière spécifique au type cellulaire, liés à l'immunité (n=530).

Toutes ces observations soulèvent bien entendu la question du besoin de réguler l'expression de gènes reliés à l'immunité en l'absence d'agent pathogène. Le processus de réponse aux stress biotiques est connu comme étant énergivore et a souvent pour effet de ralentir la croissance végétale (Smakowska *et al.*, 2016). Le déclenchement de réponses de défense ayant un coût, l'équilibre entre l'état de défense et de croissance normale doit donc être strictement régulé. Nos résultats pointent vers l'épissage alternatif comme étant impliqué dans le maintien de cet équilibre. Lorsqu'on observe l'analyse fonctionnelle des gènes régulés au niveau de la transcription, on note que la plupart des processus reliés à l'immunité sont régulés à la baisse. Cette tendance suggère que certains types cellulaires nécessitent de réprimer plusieurs gènes, voir même des mécanismes entiers lié à l'immunité. Ces résultats sont cohérents avec le besoin de réprimer tout mécanisme non essentiel dans le but de conserver toutes les ressources allouées à la croissance.

Là aussi, la question de la pertinence physiologique des variants d'épissage liés à l'immunité que nous avons identifié reste à être démontrée. L'analyse de prédiction de l'impact des événements d'épissage identifiés au niveau protéique révèle que plus de 50% de ces événements causent l'interruption du cadre de lecture. Cela signifie que l'épissage de ces événements représente une étape supplémentaire de régulation de l'expression génique puisqu'ils ne devraient pas mener à la production de protéines fonctionnelle. Néanmoins, il est tout de même intéressant de noter que 12 de ces événements d'épissage causeraient la traduction de protéines alternatives. La caractérisation de ces isoformes représente une perspective intéressante afin d'identifier de potentielles nouvelles voies mécanistiques reliées à l'immunité végétale spécifique au type cellulaire. Parmi les gènes concernés, on compte notamment *BAG6*, *HSP23.6-MIT*, *PFA-DSP3*, et *AT4G28703* qui exhibent un profil d'expression et d'épissage intéressant. Ces gènes présentent un événement d'épissage régulé à la hausse, tandis que la transcription de ces 4 gènes est régulée à la baisse. Au cours des dernières années, quelques-uns de ces gènes ont fait l'objet de recherches extensives.

C'est le cas de *HSP23.6-MIT* par exemple, qui encode une petite protéine mitochondriale de la famille de *Heat Shock Protein* (HSP). *HSP23.6* et *HSP23.5* sont tous deux fortement exprimés en réponse à de nombreux stress (Van Aken *et al.*, 2009). De façon surprenante, ces deux protéines sont aussi impliquées dans plusieurs processus développementaux normaux de la plante. Ils sont

en effet liés à la photosynthèse, mais aussi au système antioxydatif (Escobar *et al.*, 2021). La fonction de HSP23.6 dans le développement végétal pourrait être liée au besoin de réprimer son expression dans les cellules de l'épiderme de la tige, mais il est difficile d'émettre de conclusions sans connaître le mécanisme d'action précis de HSP23.6. Il serait d'ailleurs intéressant de vérifier le niveau d'expression de *HSP23.5*, puisqu'il a été suggéré que ces deux protéines interagissent ensemble afin de réguler la réponse aux stress (Van Aken *et al.*, 2009).

Comme HSP23.6, très peu d'informations sont disponibles à propos du gène identifié par le numéro d'accès AT4G28703 si ce n'est qu'il est surexprimé en conditions de stress osmotique (Li *et al.*, 2008). Néanmoins, nos travaux ouvrent la voie à des perspectives d'étude de ce gène notamment sur la régulation de son expression spécifique au type cellulaire.

PFA-DSP3 est une tyrosine phosphatase à double spécificité, c'est-à-dire qu'elle déphosphoryle aussi bien la tyrosine que les sérines et les thréonines. PFA-DSP3 déphosphoryle notamment MPK3 et MPK6, deux MAPK phosphatases impliquées dans la défense. Ces deux MPK sont membres de la cascade de signalisation enclenchée suite à la détection d'un agent pathogène, qui mène à l'expression de nombreux gènes liés à la résistance (Meng and Zhang, 2013). Bien que l'interaction entre MPK3, MPK6 et PFA-DSP3 ait été identifiée dans un contexte de stress salin, la traduction de *PFA-DSP3* a aussi été observée dans un contexte de stress oxydatif dû à la production d'espèce réactives de l'oxygène (Benina *et al.*, 2015).

BAG6 est une protéine associée à la mort cellulaire programmée. Ce mécanisme intervient dans de nombreux processus végétaux. La mort cellulaire régulée par BAG6 est notamment liée à la réponse de défense, mais aussi à la tolérance à l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique (RE) et dans le développement. Dans un contexte d'immunité, BAG6 contrôle la mort cellulaire programmée nécessaire à la résistance contre *Botrytis cinerea* (Li *et al.*, 2016a). BAG6 est lui-même contrôlé par le facteur de transcription NAC089 en réponse au stress au niveau du RE (Yang *et al.*, 2014b). De plus, l'expression de *NAC089* lui-même est nécessaire à la résistance face à l'infection par *Plantago Asiatica Mosaic Virus* (Gayral *et al.*, 2020). Il semble donc que la fonction de BAG6 dans la réponse au stress du RE soit liée à l'immunité. De plus, par son rôle dans la résistance au stress du RE, *BAG6* est aussi fortement exprimé en cours du développement du tube pollinique et des cellules de lignées germinales mâles (Singh *et al.*, 2021). En outre, la fonction de BAG6 de contrôle de la mort cellulaire programmée durant l'infection par *Botrytis cinerea* est conditionnelle à son clivage (Li *et al.*, 2016a). Bien que l'évènement d'épissage alternatif relié à BAG6 n'ait pas été caractérisé, il est intéressant de noter que selon PROSITE l'intron qui y est retenu interrompt le domaine BAG de la protéine (Sigrist *et*

al., 2013). Ce domaine formé de 110 acides aminés est requis pour l'interaction des BAG avec le domaine ATPase d'autres protéines tels que HSP70. Néanmoins, le domaine IQ de BAG6 serait toujours intègre dans la version alternativement épissée que nous avons identifiée. Le domaine IQ de BAG6 est requis pour l'induction de la mort cellulaire (Arif *et al.*, 2021). L'étude de l'impact de cet évènement d'épissage fournira certainement une perspective intéressante sur la fonction de BAG6, sa méthode de régulation ainsi que l'impact sur sa structure tri-dimensionnelle.

En plus des 4 gènes mentionnés plus tôt, notre analyse a aussi identifié un évènement d'épissage correspondant au gène *RBOHF*. Bien que cet évènement d'épissage soit prédit comme aberrant et que le variant soit donc probablement dégradé par la NMD, *RBOHF* en soit reste un gène intéressant. *RBOHF* est une protéine qui possède de multiples fonctions liées à la résistance au stress abiotique, la lignification, la fermeture stomatale et la défense (Arnaud *et al.*, 2023). *RBOHF* fait partie des NADPH oxydases responsables de l'explosion oxydative durant la réponse de défense (Morales *et al.*, 2016). Cette oxydase est notamment impliquée dans la résistance à l'agent pathogène virulent *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 (Chaouch *et al.*, 2012). La rétention d'intron identifiée dans cet évènement d'épissage nous indique que la traduction de *RBOHF* a besoin d'être inhibée dans les cellules de la columelle. L'expression de *RBOHF* est aussi différentielle en fonction du type cellulaire en l'absence d'agent pathogène. Son expression est très peu induite dans les racines, ce qui coïncide avec la dégradation du variant d'épissage dans les cellules de la columelle (Morales *et al.*, 2016)

Il est important de noter que pour chacun des gènes présentés précédemment, aucun isoforme n'a encore été identifié. Bien que l'épissage de ces variants ainsi que la fonctionnalité des protéines alternatives puissent être prédits, ils restent à être démontrés expérimentalement. Notre analyse ouvre la voie d'études plus approfondies de gènes candidats.

Comme nous l'avons décrit ci-dessus (section 1.4.3), il existe déjà plusieurs exemples de cas spécifiques où l'épissage alternatif intervient dans le maintien de la répression de la réponse de défense. C'est le cas de CPK28 dont la répression négative ne peut être obstruée que par la présence d'un isoforme moins fonctionnel (Dressano *et al.*, 2020). Un autre exemple intéressant est celui de Nt-Sd-RLK qui est responsable de la détection de LPS bactérien. Comme nous l'avons vu, l'isoforme tronqué de Nt-Sd-RLK perd son habilité à déclencher une réponse de défense, mais conserve tout de même sa capacité à détecter la présence de LPS (Sanabria and Dubery, 2016). Cet exemple illustre bien la capacité de l'épissage alternatif à intervenir de manière plus subtile, afin de maintenir un système de surveillance sans compromettre le développement de la plante. Notre analyse offre la possibilité d'explorer le rôle de variants

d'épissage liés à l'immunité n'ayant pas encore été caractérisés et ainsi de comprendre plus en détails le rôle de l'épissage alternatif dans la réponse de défense.

La raison pour laquelle certains types cellulaires nécessiteraient une régulation plus stricte de l'équilibre entre la défense et la croissance n'a pas encore été identifiée. Cependant, l'identité des types cellulaires concernés nous permet d'émettre des hypothèses pouvant éventuellement diriger de futurs travaux plus approfondis et spécifiques. La distribution des gènes d'immunité régulés au niveau de l'épissage alternatif identifie les cellules de la zone centrale du SAM et de la columelle comme étant particulièrement régulés. Cependant, ce résultat peut possiblement être lié au fait que ces deux types cellulaires sont déjà les plus régulés au niveau de l'épissage alternatif non spécifique à l'immunité. Cette observation est toutefois intéressante puisqu'elle établit des liens jusque-là inconnus entre la zone centrale du SAM et l'immunité. Comme décrit plus tôt, la zone centrale du SAM héberge une niche de cellules souches permettant la croissance des organes aériens de la plante. Nous avons aussi discuté ci-dessus de la possibilité que le besoin de régulation de l'immunité végétale en l'absence d'agent pathogène viendrait de la nécessité de réprimer l'activation des mécanismes de défense. Toutefois, nous avons aussi mentionné la tendance à la régulation à la hausse des gènes transcrits spécifiquement dans la zone centrale du SAM. Ces deux constatations semblent contradictoires et nous invitent à nous interroger sur le besoin de ces cellules souches à réguler l'immunité. Premièrement, bien que la transcription des gènes spécifiques aux cellules de cette zone soit généralement à la hausse, nous ne connaissons malheureusement pas la distribution spécifique des gènes liés à l'immunité. Nous ignorons donc si cette tendance vers l'induction de l'expression est conservée dans ce groupe de gènes. Deuxièmement, au niveau de l'épissage alternatif, comme il a été évoqué précédemment, la direction de régulation (à la hausse ou à la baisse) n'indique pas forcément l'induction ou la répression de voie métabolique. La seule hypothèse que nous pouvons émettre ici est que l'épissage alternatif agit en tant que régulateur de l'immunité dans la niche de cellules souches du SAM, probablement dans le but de la réprimer. Malgré tout, notre étude apporte la première preuve que l'immunité nécessite d'être régulée avec une attention particulière à la zone centrale du SAM.

Tel qu'énoncé précédemment, les cellules de la columelle subissent une régulation de transcription, mais aussi d'épissage alternatif bien plus intense que les 10 autres types cellulaires étudiés ici. Elles présentent en effet le plus grand nombre de gènes différenciellement transcrits et épissés. En dépit du fait que le paysage d'épissage alternatif de type cellulaire racinaire ait déjà été compilé, de façon surprenante, cette tendance de régulation dans les cellules de la columelle ne semble pas avoir été relevée. Pour nous assurer qu'il ne s'agit pas d'un biais expérimental,

nous avons pris le temps de vérifier que le nombre de lectures ayant été correctement alignées ne diffère pas de la moyenne de tous les échantillons. Nous avons aussi pris le temps d'observer le niveau d'expression de gènes constitutifs qui devrait être stable à travers les types cellulaires. Tel qu'attendu, nous n'avons pas noté de changement notable au niveau de l'expression de ces gènes. La contribution apportée par la manière dont l'analyse d'identification de gènes et événements d'épissage alternatif à cette observation a déjà été discuté dans le cadre de notre article de recherche (section 2.3). À travers la comparaison de multiples types cellulaires tous collectés par la même méthode expérimentale, nos travaux mettent donc en lumière l'importance insoupçonnée de l'épissage alternatif dans les cellules de la columelle.

Les cellules de la columelle assurent plusieurs fonctions vitales chez la plante. Elles sont notamment en charge de la perception de la gravité et des ressources et dirigent donc la croissance de la racine dans le sol (Su *et al.*, 2017). Ce type cellulaire est composé de trois sous-populations de cellules; les cellules souches de la columelle adjacentes au centre quiescent, les cellules différenciées et enfin les cellules qui se trouvent à l'extrémité de la racine et qui représentent la dernière couche de cellules, les Border-likeCells (BC) (Bennett *et al.*, 2014). Ainsi, les cellules de la columelle sont constamment renouvelées, pourtant la taille de la columelle ne varie que très rarement. Ce phénomène est dû à une régulation stricte du processus de maturation de ces cellules, couplé au détachement progressif de la couche de BC de la racine. Une fois détachées, les BC seront ultimement soumises à la mort cellulaire programmée (Kumar and Iyer-Pascuzzi, 2020). En plus de la perception de la gravité, la columelle est aussi responsable de la protection du RAM. Elle produit notamment du mucilage qui en plus de faciliter la mobilité des racines dans le sol, possède des propriétés antimicrobiennes. Une fois détachées, les BC restent viables pendant plusieurs jours (Driouich *et al.*, 2007). L'accumulation de ces cellules et du mucilage forment le *Root Extracellular Trap*. Cette formation permet la protection contre les agents pathogènes du sol, mais permet aussi d'attirer des microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère (Hawes *et al.*, 2016). Parmi les composants du *Root Extracellular Trap* on compte des polysaccharides issus de la dégradation de la membrane cellulaire. Ces molécules ont pour fonction suggérée la stabilité du *Root Extracellular Trap* dans le sol, notamment en favorisant l'agglomération du sol en périphérie des racines (Ropitiaux *et al.*, 2019). Elles peuvent aussi affecter la motilité de spores d'oomycètes pathogènes, réduisant ainsi leur virulence (Cannesan *et al.*, 2012). On retrouve aussi de l'ADN extracellulaire, des espèces réactives de l'oxygène, dans le *Root Extracellular Trap*, le tout participant à sélectionner les espèces microbiennes bénéfiques et éliminer celles pouvant être détritimentaires (Driouich *et al.*, 2021). Ainsi, les cellules de la columelle sont responsables de processus non seulement

primordiaux, mais aussi extrêmement spécifiques. Nous soupçonnons donc que la fonction de ces cellules dans des mécanismes aussi importants requiert une régulation stricte, notamment par l'intermédiaire de l'épissage alternatif. Comme nous l'avons mentionné précédemment, nous ne connaissons pour l'instant que très peu sur la régulation par l'épissage alternatif ou encore sur le rôle de potentiels isoformes dans ces cellules. Le sol étant un milieu riche en diverses microorganismes et le RAM étant une zone très sensible, cela explique pourquoi la plupart des processus liés à l'immunité sont enrichis principalement dans ces cellules. Nos travaux mettent donc en lumière l'importance insoupçonnée de l'épissage alternatif dans les cellules de la columelle, en plus d'identifier de potentiels nouveaux acteurs de la réponse de défense en lien avec la protection du RAM.

CHAPITRE IV : PERSPECTIVES, LIMITATIONS ET CONCLUSION

Nos travaux ont identifié des liens insoupçonnés entre l'épissage alternatif, l'immunité végétale et le développement. Au cours de la discussion précédente, nous avons à plusieurs reprises mentionné des possibilités de perspectives intéressantes découlant de nos résultats. Bien qu'extrêmement informative, notre étude reste une analyse transcriptomique essentiellement descriptive. Elle explore de manière plus large l'impact de l'identité cellulaire sur la transcription ainsi que l'épissage, et identifie donc une pléthore de nouveaux isoformes candidats. La caractérisation de ces variants d'épissage permettrait une meilleure compréhension de tous les mécanismes impliqués. La caractérisation d'évènements d'épissage ne menant pas à la production de protéines est tout aussi intéressante. Elle permettra certainement de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'épissage alternatif en tant que tel, mais aussi de la traduction et de la NMD. Puisque notre analyse a su identifier un profil d'épissage et d'expression différent des précédentes études, un projet intéressant serait d'intégrer nos données brutes dans une des bases de données existantes afin de comparer les résultats obtenus via d'autres outils d'analyses informatiques. Cela permettrait d'identifier si la différence observée provient du design expérimental ou bien du type d'outil informatique.

La méthode de séparation des types cellulaires que nous avons utilisée s'est avérée être robuste au prélèvement de cellules viables tout en conservant leur identité cellulaire. Cependant, cette technique repose sur la disponibilité de promoteurs spécifiques au type cellulaire et sur la production de plants transgéniques. Tel que discuté antérieurement, certains des promoteurs à notre portée au moment du design expérimental sont exprimés dans plusieurs types cellulaires à la

fois. Bien que cet aspect nous ait permis de réaliser une analyse plus affinée du paysage d'épissage alternatif et d'identifier des événements d'épissage spécifiques à des types cellulaires adjacents, il serait intéressant de réaliser la même analyse, mais avec des promoteurs dont l'expression ne se chevauche pas entre types cellulaires. Un autre outil intéressant est le séquençage d'ARN à partir de cellules isolées (*single cellRNAseq*) qui permettrait de réaliser le même type d'analyse, sans passer par l'intermédiaire de promoteurs cellules-spécifiques. L'ensemble de données que nous avons collectées ici permet d'explorer la distribution au travers des types cellulaires d'une vaste gamme d'acteurs biologiques tels que les ARN longs non codants, les motifs de liaison aux facteurs de transcription, les facteurs d'épissage. Une autre piste de recherche intéressante serait l'exploration plus détaillée d'événements d'épissage plus complexes comme les exitrons, les exons mutuellement exclus ou encore les microexons. Enfin, l'étape suivante la plus logique et importante serait bien sûr d'observer les changements d'expression génique ainsi que d'épissage alternatif après avoir élicité la réponse de défense. Il serait d'ailleurs fort intéressant de comparer différents mécanismes de défense en utilisant différents éliciteurs tel que des PAMPs pour la PTI, des effecteurs pour la ETI et des virus pour l'ARNi. Les résultats de nos travaux offrent donc de vastes possibilités de nouveaux projets de recherche dans le futur. Les travaux de recherches présentés ici établissent les bases de l'étude de l'immunité végétale de l'identité cellulaire et de l'épissage alternatif en un ensemble.

RÉFÉRENCES

- Adelman K, La Porta A, Santangelo TJ, Lis JT, Roberts JW, Wang MD.** 2002. Single molecule analysis of RNA polymerase elongation reveals uniform kinetic behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 13538–13543.
- Aerts N, Pereira Mendes M, Van Wees SCM.** 2021. Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense. *Plant Journal* **105**, 489–504.
- Ali GS, Palusa SG, Golovkin M, Prasad J, Manley JL, Reddy ASN.** 2007. Regulation of Plant Developmental Processes by a Novel Splicing Factor. *PLOS ONE* **2**, e471.
- Amsbury S, Kirk P, Benitez-Alfonso Y.** 2018. Emerging models on the regulation of intercellular transport by plasmodesmata-associated callose. *Journal of Experimental Botany* **69**, 105–115.
- Änkö M-L, Müller-McNicoll M, Brandl H, Curk T, Gorup C, Henry I, Ule J, Neugebauer KM.** 2012. The RNA-binding landscapes of two SR proteins reveal unique functions and binding to diverse RNA classes. *Genome Biology* **13**, R17.
- Arif M, Li Z, Luo Q, Li L, Shen Y, Men S.** 2021. The bag2 and bag6 genes are involved in multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences* **22**.
- Arnaud D, Deeks MJ, Smirnoff N.** 2023. RBOHF activates stomatal immunity by modulating both reactive oxygen species and apoplastic pH dynamics in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **116**, 404–415.
- Ayako M, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N.** 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19613–19618.
- Balkunde R, Kitagawa M, Xu XM, Wang J, Jackson D.** 2017. SHOOT MERISTEMLESS trafficking controls axillary meristem formation, meristem size and organ boundaries in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **90**, 435–446.
- Balmer D, Mauch-Mani B.** 2013. More beneath the surface? Root versus shoot antifungal plant defenses. *Frontiers in plant science* **4**, 256.
- Banerji J, Rusconi S, Schaffner W.** 1981. Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* **27**, 299–308.
- Bargmann BOR, Birnbaum KD.** 2010. Fluorescence Activated Cell Sorting of Plant Protoplasts. *Journal of Visualized Experiments*, 2–5.
- Barta A, Kalyna M, Lorkovic´ ZJL.** 2008. Plant SR Proteins and Their Functions. *Nuclear pre-mRNA Processing in Plants*. 83–102.
- Barta A, Kalyna M, Reddy ASN.** 2010. Implementing a rational and consistent nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins) in plants. *Plant Cell* **22**, 2926–2929.

- Bazin J, Mariappan K, Jiang Y, Blein T, Voelz R, Crespi M, Hirt H.** 2020. Role of MPK4 in pathogen-associated molecular pattern-triggered alternative splicing in Arabidopsis. *PLoS Pathogens* **16**.
- Benina M, Ribeiro DM, Gechev TS, Mueller-Roeber B, Schippers JHM.** 2015. A cell type-specific view on the translation of mRNAs from ROS-responsive genes upon paraquat treatment of Arabidopsis thaliana leaves. *Plant, Cell and Environment* **38**, 349–363.
- Bennett T, van den Toorn A, Willemsen V, Scheres B.** 2014. Precise control of plant stem cell activity through parallel regulatory inputs. *Development (Cambridge)* **141**, 4055–4064.
- van Bentem S de la F, Anrather D, Roitinger E, Djamei A, Hufnagl T, Barta A, Csaszar E, Dohnal I, Lecourieux D, Hirt H.** 2006. Phosphoproteomics reveals extensive in vivo phosphorylation of Arabidopsis proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Research* **34**, 3267–3278.
- Berardini TZ, Mundodi S, Reiser L, et al.** 2004. Functional annotation of the Arabidopsis genome using controlled vocabularies. *Plant physiology* **135**, 745–755.
- Berget SM, Moore C, Sharp PA.** 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 3171–3175.
- Bhar A, Chakraborty A, Roy A.** 2023. The captivating role of calcium in plant-microbe interaction. *Frontiers in Plant Science* **14**.
- Bi G, Zhou Z, Wang W, Li L, Rao S, Wu Y, Zhang X, Menke FLH, Chen S, Zhou J-M.** 2018. Receptor-Like Cytoplasmic Kinases Directly Link Diverse Pattern Recognition Receptors to the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Arabidopsis. *The Plant Cell* **30**, 1543–1561.
- Bolger, A. M., Lohse M, Usadel B.** 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **btu170**.
- Bonardi V, Cherkis K, Nishimura MT, Dangl JL.** 2012. A new eye on NLR proteins: focused on clarity or diffused by complexity? *Current Opinion in Immunology* **24**, 41–50.
- Bonardi V, Tang S, Stallmann A, Roberts M, Cherkis K, Dangl JL.** 2011. Expanded functions for a family of plant intracellular immune receptors beyond specific recognition of pathogen effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 16463–16468.
- Bonke M, Thitamadee S, Mähönen AP, Hauser M-T, Helariutta Y.** 2003. APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis. *Nature* **426**, 181–186.
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng S-H, Sheen J.** 2010. Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* **464**, 418–422.
- Boutz PL, Bhutkar A, Sharp PA.** 2015. Detained introns are a novel, widespread class of post-transcriptionally spliced introns. *Genes & Development* **29**, 63–80.

- Braunschweig U, Barbosa-Morais NL, Pan Q, Nachman EN, Alipanahi B, Gonatopoulos-Pournatzis T, Frey B, Irimia M, Blencowe BJ.** 2014. Widespread intron retention in mammals functionally tunes transcriptomes. *Genome Research* **24**, 1774–1786.
- Brueckner F, Armache K-J, Cheung A, Damsma GE, Kettenberger H, Lehmann E, Sydow J, Cramer P.** 2009. Structure–function studies of the RNA polymerase II elongation complex. *Acta Crystallographica Section D* **65**, 112–120.
- Brugiolo M, Botti V, Liu N, Müller-McNicoll M, Neugebauer KM.** 2017. Fractionation iCLIP detects persistent SR protein binding to conserved, retained introns in chromatin, nucleoplasm and cytoplasm. *Nucleic Acids Research* **45**, 10452–10465.
- Burley SK, Roeder RG.** 1996. BIOCHEMISTRY AND STRUCTURAL BIOLOGY OF TRANSCRIPTION FACTOR IID (TFIID). *Annual Review of Biochemistry* **65**, 769–799.
- Cannesan MA, Durand C, Burel C, Gangneux C, Lerouge P, Ishii T, Laval K, Follet-Gueye M-L, Driouch A, Vicré-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.
- Cao Y, Liang Y, Tanaka K, et al.** 2014. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife* **3**, 1504–1509.
- Césari S, Kanzaki H, Fujiwara T, Bernoux M, Chalvon V, Kawano Y, Shimamoto K, Dodds P, Terauchi R, Kroj T.** 2014. The NB - LRR proteins RGA 4 and RGA 5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *The EMBO Journal* **33**, 1941–1959.
- Chaouch S, Queval G, Noctor G.** 2012. AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in Arabidopsis. *The Plant Journal* **69**, 613–627.
- Chaudhary S, Jabre I, Reddy ASN, Staiger D, Syed NH.** 2019a. Perspective on Alternative Splicing and Proteome Complexity in Plants. *Trends in Plant Science* **24**, 496–506.
- Chaudhary S, Khokhar W, Jabre I, Reddy ASN, Byrne LJ, Wilson CM, Syed NH.** 2019b. Alternative splicing and protein diversity: Plants versus animals. *Frontiers in Plant Science* **10**, 1–14.
- Chen S, Li J, Liu Y, Li H.** 2019. Genome-Wide Analysis of Serine/Arginine-Rich Protein Family in Wheat and Brachypodium distachyon. *Plants* **8**.
- Chen X, Qi Y, Wu Z, et al.** 2021. Structural insights into preinitiation complex assembly on core promoters. *Science* **372**.
- Cheng X, Zhao C, Gao L, Zeng L, Xu Y, Liu F, Huang J, Liu L, Liu S, Zhang X.** 2022. Alternative splicing reprogramming in fungal pathogen Sclerotinia sclerotiorum at different infection stages on Brassica napus. *Frontiers in Plant Science* **13**, 1–13.

- Cho S, Hoang A, Sinha R, Zhong XY, Fu XD, Krainer AR, Ghosh G.** 2011. Interaction between the RNA binding domains of Ser-Arg splicing factor 1 and U1-70K snRNP protein determines early spliceosome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 8233–8238.
- Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ.** 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**, 1–8.
- Chung HS, Howe GA.** 2009. A Critical Role for the TIFY Motif in Repression of Jasmonate Signaling by a Stabilized Splice Variant of the JASMONATE ZIM-Domain Protein JAZ10 in Arabidopsis. *The Plant Cell* **21**, 131–145.
- Cianfrocco MA, Kassavetis GA, Grob P, Fang J, Juven-Gershon T, Kadonaga JT, Nogales E.** 2013. Human TFIID Binds to Core Promoter DNA in a Reorganized Structural State. *Cell* **152**, 120–131.
- Collier SM, Hamel L-P, Moffett P.** 2011. Cell Death Mediated by the N-Terminal Domains of a Unique and Highly Conserved Class of NB-LRR Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 918–931.
- Collier SM, Moffett P.** 2009. NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends in Plant Science* **14**, 521–529.
- Core LJ, Martins AL, Danko CG, Waters CT, Siepel A, Lis JT.** 2014. Analysis of nascent RNA identifies a unified architecture of initiation regions at mammalian promoters and enhancers. *Nature Genetics* **46**, 1311–1320.
- Craft J, Samalova M, Baroux C, Townley H, Martinez A, Jepson I, Tsiantis M, Moore I.** 2005. New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in Arabidopsis. *The Plant Journal* **41**, 899–918.
- Cramer P.** 2019. Organization and regulation of gene transcription. *Nature* **573**, 45–54.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R.** 2005. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**, 5–17.
- Day B, Dahlbeck D, Huang J, Chisholm ST, Li D, Staskawicz BJ.** 2005. Molecular Basis for the RIN4 Negative Regulation of RPS2 Disease Resistance. *The Plant Cell Online* **17**.
- De La Mata M, Alonso CR, Kadener S, Fededa JP, Blaustein M, Pelisch F, Cramer P, Bentley D, Kornblihtt AR.** 2003. A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Molecular Cell* **12**, 525–532.
- Ding F, Cui P, Wang Z, Zhang S, Ali S, Xiong L.** 2014. Genome-wide analysis of alternative splicing of pre-mRNA under salt stress in Arabidopsis. *BMC Genomics* **15**, 431.
- Drechsel G, Kahles A, Kesarwani AK, Stauffer E, Behr J, Drewe P, Rättsch G, Wachter A.** 2013. Nonsense-mediated decay of alternative precursor mRNA splicing variants is a major determinant of the Arabidopsis steady state transcriptome. *Plant Cell* **25**, 3726–3742.

- Dressano K, Weckwerth PR, Poretsky E, Takahashi Y, Villarreal C, Shen Z, Schroeder JI, Briggs SP, Huffaker A.** 2020. Dynamic regulation of Pep-induced immunity through post-translational control of defence transcript splicing. *Nature Plants* **6**, 1008–1019.
- Driouich A, Durand C, Vicré-Gibouin M.** 2007. Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science* **12**, 14–19.
- Driouich A, Follet-Gueye ML, 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.
- Driouich A, Gaudry A, Pawlak B, Moore JP.** 2021. Root cap-derived cells and mucilage: a protective network at the root tip. *Protoplasma* **258**, 1179–1185.
- Du K, Jiang T, Chen H, Murphy AM, Carr JP, Du Z, Li X, Fan Z, Zhou T.** 2020. Viral perturbation of alternative splicing of a host transcript benefits infection. *Plant Physiology* **184**, 1514–1531.
- Early P, Rogers J, Davis M, Calame K, Bond M, Wall R, Hood L.** 1980. Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin μ gene by alternative RNA processing pathways. *Cell* **20**, 313–319.
- Erkelenz S, Mueller WF, Evans MS, Busch A, Schöneweis K, Hertel KJ, Schaal H.** 2013. Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms (RNA (2013) 19, (96-102)). *Rna* **19**, 1015.
- Escobar MR, Feussner I, Valle EM.** 2021. Mitochondrial Small Heat Shock Proteins Are Essential for Normal Growth of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **12**.
- FAO.** 2024. Plant Production and Protection. <https://www.fao.org/plant-production-protection/about/en>.
- de Felippes FF, Waterhouse PM.** 2023. Plant terminators: The unsung heroes of gene expression. *Journal of Experimental Botany* **74**, 2239–2250.
- Feng F, Yang F, Rong W, Wu X, Zhang J, Chen S, He C, Zhou J-M.** 2012. A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* **485**, 114–118.
- Fortier M, Lemaitre V, Gaudry A, Pawlak B, Driouich A, Follet-Gueye ML, Vicré M.** 2023. A fine-tuned defense at the pea root caps: Involvement of border cells and arabinogalactan proteins against soilborne diseases. *Frontiers in Plant Science* **14**, 1–7.
- Fröschel C, Komorek J, Attard A, et al.** 2021. Plant roots employ cell-layer-specific programs to respond to pathogenic and beneficial microbes. *Cell Host and Microbe* **29**, 299-310.e7.
- Fu XD.** 1995. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* **1**, 663–680.
- Fu ZQ, Guo M, Jeong B, Tian F, Elthon TE, Cerny RL, Staiger D, Alfano JR.** 2007. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* **447**, 284–288.

- Fuchs M, Lohmann JU.** 2020. Aiming for the top: non-cell autonomous control of shoot stem cells in Arabidopsis. *Journal of Plant Research* **133**, 297–309.
- de la Fuente van Bentem S, Anrather D, Dohnal I, et al.** 2008. Site-Specific Phosphorylation Profiling of Arabidopsis Proteins by Mass Spectrometry and Peptide Chip Analysis. *Journal of Proteome Research* **7**, 2458–2470.
- Furlong EEM, Levine M.** 2018. Developmental enhancers and chromosome topology. *Science* **361**, 1341–1345.
- Gao X, Chen X, Lin W, et al.** 2013. Bifurcation of Arabidopsis NLR Immune Signaling via Ca²⁺-Dependent Protein Kinases. (S He, Ed.). *PLoS Pathogens* **9**, e1003127.
- Gayral M, Arias Gaguancela O, Vasquez E, Herath V, Flores FJ, Dickman MB, Verchot J.** 2020. Multiple ER-to-nucleus stress signaling pathways are activated during Plantago asiatica mosaic virus and Turnip mosaic virus infection in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **103**, 1233–1245.
- Gilbert W.** 1987. The exon theory of genes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **52**, 901–905.
- Glushkevich A, Spechenkova N, Fesenko I, Knyazev A, Samarskaya V, Kalinina NO, Taliansky M, Love AJ.** 2022. Transcriptomic Reprogramming, Alternative Splicing and RNA Methylation in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plants in Response to Potato Virus Y Infection. *Plants* **11**.
- Gnatt AL, Cramer P, Fu J, Bushnell DA, Kornberg RD.** 2001. Structural Basis of Transcription: An RNA Polymerase II Elongation Complex at 3.3 Å Resolution. *Science* **292**, 1876–1882.
- Goedhart J, Von Stetten D, Noirclerc-Savoye M, Lelimosin M, Joosen L, Hink MA, Van Weeren L, Gadella TWJ, Royant A.** 2012. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nature Communications* **3**.
- Göhring J, Jacak J, Barta A.** 2014. Imaging of endogenous messenger RNA splice variants in living cells reveals nuclear retention of transcripts inaccessible to nonsense-mediated decay in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**, 754–764.
- Golisz A, Krzyszton M, Stepień M, Dolata J, Piotrowska J, Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A, Kufel J.** 2021. Arabidopsis Spliceosome Factor SmD3 Modulates Immunity to Pseudomonas syringae Infection. *Frontiers in Plant Science* **12**.
- Graveley BR, Hertel KJ, Maniatis T.** 2001. The role of U2AF 35 and U2AF 65 in enhancer-dependent splicing. 806–818.
- Guilfoyle TJ, Dietrich MA.** 1987. Plant RNA Polymerases: Structures, Regulation, and Genes. In: Bruening G, Harada J, Kosuge T, Hollaender A, Kuny G, Wilson CM, eds. *Tailoring Genes for Crop Improvement: An Agricultural Perspective*. Boston, MA: Springer US, 87–100.
- Guo X, Wang T, Jiang L, Qi H, Zhang Z.** 2023. PlaASDB: a comprehensive database of plant alternative splicing events in response to stress. *BMC Plant Biology* **23**, 1–10.

- Haberle V, Stark A.** 2018. Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**, 621–637.
- Han N, Ji X-L, Du Y-P, He X, Zhao X-J, Zhai H.** 2017. Identification of a Novel Alternative Splicing Variant of VvPMA1 in Grape Root under Salinity. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Han H, Yan A, Li L, Zhu Y, Feng B, Liu X, Zhou Y.** 2020. A signal cascade originated from epidermis defines apical-basal patterning of Arabidopsis shoot apical meristems. *Nature Communications* **11**, 1–17.
- Hartmann L, Wießner T, Wachter A.** 2018. Subcellular compartmentation of alternatively spliced transcripts defines SERINE/ARGININE-RICH PROTEIN30 expression. *Plant Physiology* **176**, 2886–2903.
- Hartzog GA, Fu J.** 2013. The Spt4–Spt5 complex: A multi-faceted regulator of transcription elongation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1829**, 105–115.
- Hawes MC, Allen C, Turgeon BG, Curlango-Rivera G, Tran TM, Huskey DA, Xiong Z.** 2016. Root Border Cells and Their Role in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology* **54**, 143–161.
- 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.
- Hazra A, Pal A, Kundu A.** 2023. Alternative splicing shapes the transcriptome complexity in blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. *Functional & Integrative Genomics* **23**, 144.
- 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.
- Hertel KJ, Maniatis T.** 1999. Serine-arginine (SR)-rich splicing factors have an exon-independent function in pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2651–2655.
- Hill CH, Boreikaitė V, Kumar A, et al.** 2019. Activation of the Endonuclease that Defines mRNA 3' Ends Requires Incorporation into an 8-Subunit Core Cleavage and Polyadenylation Factor Complex. *Molecular Cell* **73**, 1217-1231.e11.
- Hinsch M, Staskawicz BJ.** 1996. Identification of a new Arabidopsis disease resistance locus, RPs4, and cloning of the corresponding avirulence gene, avrRps4, from *Pseudomonas syringae* pv. *psis*. *MPMI* **9**, 55–61.
- Howard BE, Hu Q, Babaoglu AC, et al.** 2013. High-Throughput RNA Sequencing of *Pseudomonas*-Infected Arabidopsis Reveals Hidden Transcriptome Complexity and Novel Splice Variants. *PLoS ONE* **8**.
- Howard JM, Sanford JR.** 2015. The RNAissance family: SR proteins as multifaceted regulators of gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **6**, 93–110.

- Huang J, Gu L, Zhang Y, et al.** 2017. An oomycete plant pathogen reprograms host pre-mRNA splicing to subvert immunity. *Nature Communications* **8**, 2051.
- Huang J, Lu X, Wu H, Xie Y, Peng Q, Gu L, Wu J, Wang Y, Reddy ASN, Dong S.** 2020. Phytophthora Effectors Modulate Genome-wide Alternative Splicing of Host mRNAs to Reprogram Plant Immunity. *Molecular Plant* **13**, 1470–1484.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA.** 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* **4**, 44–57.
- Huelga SC, Vu AQ, Arnold JD, et al.** 2012. Integrative Genome-wide Analysis Reveals Cooperative Regulation of Alternative Splicing by hnRNP Proteins. *Cell Reports* **1**, 167–178.
- Hunt AG, Xing D, Li QQ.** 2012. Plant polyadenylation factors: conservation and variety in the polyadenylation complex in plants. *BMC Genomics* **13**, 641.
- Importance des zones exemptes de phytoravageurs.** 2020. <https://planthealth.nappo.org/english/iyp/h/IYPH-Success-Stories/Importance-des-zones-exemptes-de-phytoravageurs-ZEP>. Accessed April 2024.
- Irimia M, Weatheritt RJ, Ellis JD, et al.** 2014. A highly conserved program of neuronal microexons is misregulated in autistic brains. *Cell* **159**, 1511–1523.
- Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, Panstruga R, Strizhov N, Schulze-Lefert P, Fincher GB.** 2003. An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *The Plant Cell* **15**, 2503–2513.
- Jaehning JA.** 2010. The Paf1 complex: Platform or player in RNA polymerase II transcription? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1799**, 379–388.
- Jia ZC, Das D, Zhang Y, Fernie AR, Liu YG, Chen M, Zhang J.** 2023a. Plant serine/arginine-rich proteins: versatile players in RNA processing. *Planta* **257**.
- Jia Z, Das D, Zhang Y, Fernie AR, Liu Y, Chen M, Zhang J.** 2023b. Plant serine_arginine-rich proteins versatile players in RNA processing. *Planta* **257**.
- Jia J, Long Y, Zhang H, et al.** 2020. Post-transcriptional splicing of nascent RNA contributes to widespread intron retention in plants. *Nature Plants* **6**, 780–788.
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B.** 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal* **19**, 4004–4014.
- Jin L, Chen M, Xiang M, Guo Z.** 2022. RNAi-Based Antiviral Innate Immunity in Plants. *Viruses* **14**.
- Kadota Y, Shirasu K, Zipfel C.** 2015. Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant and Cell Physiology* **56**, 1472–1480.

Kalyana M, Simpson CG, Syed NH, et al. 2012. Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research* **40**, 2454–2469.

Kato H, Okazaki K, Urano T. 2013. Spt6: Two fundamentally distinct functions in the regulation of histone modification. *Epigenetics* **8**, 1249–1253.

Kaufmann I, Martin G, Friedlein A, Langen H, Keller W. 2004. Human Fip1 is a subunit of CPSF that binds to U-rich RNA elements and stimulates poly(A) polymerase. *The EMBO Journal* **23**, 616–626–626.

Kim G-D, Cho Y-H, Lee B-H, Yoo S-D. 2017. STABILIZED1 Modulates Pre-mRNA Splicing for Thermotolerance. *Plant Physiology* **173**, 2370–2382.

Kim Y, Geiger JamesH, Hahn S, Sigler PB. 1993. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* **365**, 512–520.

Kim G-D, Yoo S-D, Cho Y-H. 2018. STABILIZED1 as a heat stress-specific splicing factor in Arabidopsis thaliana. *Plant Signaling & Behavior* **13**, e1432955.

Kindgren P, Ivanov M, Marquardt S. 2020. Native elongation transcript sequencing reveals temperature dependent dynamics of nascent RNAPII transcription in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research* **48**, 2332–2347.

Kufel J, Diachenko N, Golisz A. 2022. Alternative splicing as a key player in the fine-tuning of the immunity response in Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology* **23**, 1226–1238.

Kujirai T, Kurumizaka H. 2020. Transcription through the nucleosome. *Current Opinion in Structural Biology* **61**, 42–49.

Kumar N, Iyer-Pascuzzi AS. 2020. Shedding the last layer: Mechanisms of root cap cell release. *Plants* **9**.

Kumar K, Sinha SK, Maity U, Kirti PB, Kumar KRR. 2023. Insights into established and emerging roles of SR protein family in plants and animals. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **14**.

Lam PY, Wang L, Lo C, Zhu FY. 2022. Alternative Splicing and Its Roles in Plant Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 1–20.

Lawit SJ, O’Grady K, Gurley WB, Czarnecka-Verner E. 2007. Yeast two-hybrid map of Arabidopsis TFIID. *Plant Molecular Biology* **64**, 73–87.

Lazar G, Goodman HM. 2000. The Arabidopsis splicing factor SR1 is regulated by alternative splicing. *Plant Molecular Biology* **42**, 571–581.

Lee BH, Kapoor A, Zhu J, Zhu JK. 2006. Stabilized1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 1736–1749.

- Lee KC, Kim YC, Kim JK, Lee H, Lee JH.** 2023a. Regulation of Flowering Time and Other Developmental Plasticities by 3' Splicing Factor-Mediated Alternative Splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Plants* **12**.
- Lee J-Y, Lu H.** 2011. Plasmodesmata: the battleground against intruders. *Trends in Plant Science* **16**, 201–210.
- Lee HT, Park HY, Lee KC, Lee JH, Kim JK.** 2023b. Two *Arabidopsis* Splicing Factors, U2AF65a and U2AF65b, Differentially Control Flowering Time by Modulating the Expression or Alternative Splicing of a Subset of FLC Upstream Regulators. *Plants* **12**.
- Lee Y, Rio DC, Biology S, Biology C.** 2015. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem.* **84**, 291–323.
- Li Y, Guo Q, Liu P, Huang J, Zhang S, Yang G, Wu C, Zheng C, Yan K.** 2021. Dual roles of the serine/arginine-rich splicing factor SR45a in promoting and interacting with nuclear cap-binding complex to modulate the salt-stress response in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **230**, 641–655.
- Li Y, Kabbage M, Liu W, Dickman MB.** 2016a. Aspartyl protease-mediated cleavage of BAG6 is necessary for autophagy and fungal resistance in plants. *Plant Cell* **28**, 233–247.
- Li W, Lin WD, Ray P, Lan P, Schmidt W.** 2013. Genome-wide detection of condition-sensitive alternative splicing in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* **162**, 1750–1763.
- Li R, Wei Z, Li Y, Shang X, Cao Y, Duan L, Ma L.** 2022. SKI-INTERACTING PROTEIN interacts with SHOOT MERISTEMLESS to regulate shoot apical meristem formation. *Plant Physiology* **189**, 2193–2209.
- Li S, Yamada M, Han X, Ohler U, Benfey PN.** 2016b. High-Resolution Expression Map of the *Arabidopsis* Root Reveals Alternative Splicing and lincRNA Regulation. *Developmental Cell* **39**, 508–522.
- Li Y, Zhu Y, Liu Y, Shu Y, Meng F, Lu Y, Bai X, Liu B, Guo D.** 2008. Genome-wide identification of osmotic stress response gene in *Arabidopsis thaliana*. *Genomics* **92**, 488–493.
- Li-Byarlay H, Li Y, Stroud H, et al.** 2013. RNA interference knockdown of DNA methyltransferase 3 affects gene alternative splicing in the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 12750–12755.
- Ling Y, Mahfouz MM, Zhou S.** 2021. Pre-mRNA alternative splicing as a modulator for heat stress response in plants. *Trends in Plant Science* **26**, 1153–1170.
- Liu J, Chen X, Liang X, Zhou X, Yang F, Liu J, He SY, Guo Z.** 2016. Alternative Splicing of Rice WRKY62 and WRKY76 Transcription Factor Genes in Pathogen Defense. *Plant Physiology* **171**, 1427–1442.
- Liu XX, Guo QH, Xu WB, Liu P, Yan K.** 2022. Rapid Regulation of Alternative Splicing in Response to Environmental Stresses. *Frontiers in Plant Science* **13**.

- Liu J, Sun N, Liu M, Liu J, Du B, Wang X, Qi X.** 2013*a*. An autoregulatory loop controlling Arabidopsis HsfA2 expression: Role of heat shock-induced alternative splicing. *Plant Physiology* **162**, 512–521.
- Liu J, Sun N, Liu M, Liu J, Du B, Wang X, Qi X.** 2013*b*. An autoregulatory loop controlling Arabidopsis HsfA2 expression: Role of heat shock-induced alternative splicing. *Plant Physiology* **162**, 512–521.
- Liu Y, Zhang S.** 2004. Phosphorylation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase by MPK6, a Stress-Responsive Mitogen-Activated Protein Kinase, Induces Ethylene Biosynthesis in Arabidopsis[W]. *The Plant Cell* **16**, 3386–3399.
- Liu J, Zhang Y, Zheng Y, Zhu Y, Shi Y, Guan Z, Lang K, Shen D, Huang W, Dou D.** 2023. PlantExp: a platform for exploration of gene expression and alternative splicing based on public plant RNA-seq samples. *Nucleic Acids Research* **51**, D1483–D1491.
- Long JC, Caceres JF.** 2008. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochemical Journal* **417**, 15–27.
- Lopato S, Gattoni R, Fabini G, Stevenin J, Barta A.** 1999*a*. A novel family of plant splicing factors with a Zn knuckle motif: examination of RNA binding and splicing activities. *Plant Molecular Biology* **39**, 761–773.
- Lopato S, Kalyna M, Dorner S, Kobayashi R, Krainer AR, Barta A.** 1999*b*. atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from Arabidopsis thaliana, regulates splicing of specific plant genes. *Genes and Development* **13**, 987–1001.
- Lopato S, Waigmann E, Barta A.** 1996. Characterization of a novel arginine/serine-rich splicing factor in Arabidopsis. *The Plant Cell* **8**, 2255–2264.
- Lorković ZJ, Hilscher J, Barta A.** 2008. Co-localisation studies of Arabidopsis SR splicing factors reveal different types of speckles in plant cell nuclei. *Experimental Cell Research* **314**, 3175–3186.
- Love MI, Huber W, Anders S.** 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**, 1–21.
- de Luxán-Hernández C, Lohmann J, Tranque E, Chumova J, Binarova P, Salinas J, Weingartner M.** 2023. MDF is a conserved splicing factor and modulates cell division and stress response in Arabidopsis. *Life science alliance* **6**.
- Lv B, Hu K, Tian T, Wei K, Zhang F, Jia Y, Tian H, Ding Z.** 2021. The pre-mRNA splicing factor RDM16 regulates root stem cell maintenance in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology* **63**, 662–678.
- Lyons R, Stiller J, Powell J, Rusu A, Manners JM, Kazan K.** 2015. Fusarium oxysporum Triggers Tissue-Specific Transcriptional Reprogramming in Arabidopsis thaliana. (MA Blazquez, Ed.). *PLOS ONE* **10**, e0121902.

- Maeda K, Kunieda T, Tamura K, Hatano K, Hara-Nishimura I, Shimada T.** 2019. Identification of periplasmic root-cap mucilage in developing columella cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **60**, 1296–1303.
- Makarova OV, Makarov EM, Lührmann R.** 2001. The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6·U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes. *The EMBO Journal* **20**, 2553–2563.
- Malamy JE, Benfey PN.** 1997. Analysis of SCARECROW expression using a rapid system for assessing transgene expression in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* **12**, 957–963.
- Mandadi KK, Scholthof K-BG.** 2015. Genome-Wide Analysis of Alternative Splicing Landscapes Modulated during Plant-Virus Interactions in *Brachypodium distachyon*. *The Plant Cell* **27**, 71–85.
- Manley JL, Krainer AR.** 2010. A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *GENES & DEVELOPMENT*, 1073–1074.
- Mao G, Meng X, Liu Y, Zheng Z, Chen Z, Zhang S.** 2011. Phosphorylation of a WRKY Transcription Factor by Two Pathogen-Responsive MAPKs Drives Phytoalexin Biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **23**, 1639–1653.
- Marquez Y, Brown JWS, Simpson C, Barta A, Kalyna M.** 2012. Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Research* **22**, 1184–1195.
- Marquez Y, Höpfler M, Ayatollahi Z, Barta A, Kalyna M.** 2015. Unmasking alternative splicing inside protein-coding exons defines exons and their role in proteome plasticity. *Genome Research* **25**, 995–1007.
- Martín G, Márquez Y, Mantica F, Duque P, Irimia M.** 2021. Alternative splicing landscapes in *Arabidopsis thaliana* across tissues and stress conditions highlight major functional differences with animals. *Genome Biology* **22**, 1–26.
- Mayer A, Landry HM, Churchman LS.** 2017. Pause & go: from the discovery of RNA polymerase pausing to its functional implications. *Current Opinion in Cell Biology* **46**, 72–80.
- Meng X, Zhang S.** 2013. MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 245–266.
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral BW, Young ND.** 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal* **20**, 317–332.
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW.** 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **15**, 809–34.
- Misra CS, Sousa AGG, Barros PM, Kermanov A, Becker JD.** 2023. Cell-type-specific alternative splicing in the *Arabidopsis* germline. *Plant Physiology* **192**, 85–101.

- Molina C, Grotewold E.** 2005. Genome wide analysis of Arabidopsis core promoters. *BMC Genomics* **6**, 25.
- Morales J, Kadota Y, Zipfel C, Molina A, Torres MA.** 2016. The Arabidopsis NADPH oxidases RbohD and RbohF display differential expression patterns and contributions during plant immunity. *Journal of Experimental Botany* **67**, 1663–1676.
- Muhammad S, Xu X, Zhou W, Wu L.** 2023. Alternative splicing: An efficient regulatory approach towards plant developmental plasticity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **14**, 1–26.
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JDG.** 2004. The Transcriptional Innate Immune Response to flg22. Interplay and Overlap with Avr Gene-Dependent Defense Responses and Bacterial Pathogenesis. *Plant Physiology* **135**, 1113–1128.
- Ner-Gaon H, Halachmi R, Savaldi-Goldstein S, Rubin E, Ophir R, Fluhr R.** 2004. Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in Arabidopsis. *Plant Journal* **39**, 877–885.
- Nicaise V, Joe A, Jeong B, Korneli C, Boutrot F, Westedt I, Staiger D, Alfano JR, Zipfel C.** 2013. *Pseudomonas* HopU1 modulates plant immune receptor levels by blocking the interaction of their mRNAs with GRP7. *The EMBO Journal* **32**, 701-712–712.
- Noe Gonzalez M, Blears D, Svejstrup JQ.** 2021. Causes and consequences of RNA polymerase II stalling during transcript elongation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **22**, 3–21.
- Noman A, Aqeel M, Lou Y.** 2019. PRRs and NB-LRRs: From signal perception to activation of plant innate immunity. *International Journal of Molecular Sciences* **20**.
- Obermeyer S, Kapoor H, Markusch H, Grasser KD.** 2023a. Transcript elongation by RNA polymerase II in plants: factors, regulation and impact on gene expression. *Plant Journal* doi: 10.1111/tbj.16115.
- Obermeyer S, Stöckl R, Schneckeburger T, Kapoor H, Stempfl T, Schwartz U, Grasser KD.** 2023b. TFIS Is Crucial During Early Transcript Elongation for Transcriptional Reprogramming in Response to Heat Stress. *Journal of Molecular Biology* **435**, 167917.
- Ogungbayi A, Lee J, Vaghela V, Yu F, Min X, Xiangjia M.** 2023. Systematic Collection and Analysis of Alternative Splicing Events in Potato Plants. *Journal of Plant Sciences* **11**, 98–106.
- Ohtani M, Wachter A.** 2019. NMD-Based Gene Regulation - A Strategy for Fitness Enhancement in Plants? *Plant and Cell Physiology* **60**, 1953–1960.
- Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG, Valent B.** 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. *The Plant cell* **12**, 2019–32.
- Pandit S, Zhou Y, Shiue L, Coutinho-Mansfield G, Li H, Qiu J, Huang J, Yeo GW, Ares M, Fu XD.** 2013. Genome-wide Analysis Reveals SR Protein Cooperation and Competition in Regulated Splicing. *Molecular Cell* **50**, 223–235.

- Pardal R, Heidstra R.** 2021. Root stem cell niche networks: it's complexed! Insights from Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **72**, 6727–6738.
- Passmore LA, Collier J.** 2022. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **23**, 93–106.
- Peart JR, Mestre P, Lu R, Malcuit I, Baulcombe DC.** 2005. NRG1, a CC-NB-LRR Protein, together with N, a TIR-NB-LRR Protein, Mediates Resistance against Tobacco Mosaic Virus. *Current Biology* **15**, 968–973.
- Peng Y, Van Wersch R, Zhang Y.** 2018. Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**, 403–409.
- Perilli S, Di Mambro R, Sabatini S.** 2012. Growth and development of the root apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 17–23.
- Perruc E, Kinoshita N, Lopez-Molina L.** 2007. The role of chromatin-remodeling factor PKL in balancing osmotic stress responses during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal* **52**, 927–936.
- Qin N, Zhang R, Zhang M, et al.** 2020. Global Profiling of Dynamic Alternative Splicing Modulation in Arabidopsis Root upon *Ralstonia solanacearum* Infection. *Genes* **11**.
- Rahman MS, Madina MH, Plourde MB, Dos Santos KCG, Huang X, Zhang Y, Laliberté JF, Germain H.** 2021. The fungal effector Mlp37347 alters plasmodesmata fluxes and enhances susceptibility to pathogen. *Microorganisms* **9**, 1232–1247.
- Rayapuram N, Bigeard J, Alhoraibi H, Bonhomme L, Hesse A-M, Vinh J, Hirt H, Pflieger D.** 2018. Quantitative Phosphoproteomic Analysis Reveals Shared and Specific Targets of Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) MPK3, MPK4, and MPK6 *. *Molecular & Cellular Proteomics* **17**, 61–80.
- Reddy ASN, Marquez Y, Kalyna M, Barta A.** 2013. Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *Plant Cell* **25**, 3657–3683.
- Remy E, Cabrito TR, Baster P, Batista RA, Teixeira MC, Friml J, Sá-Correia I, Duque P.** 2013. A Major Facilitator Superfamily Transporter Plays a Dual Role in Polar Auxin Transport and Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell* **25**, 901–926.
- Rich-Griffin C, Eichmann R, Reitz MU, et al.** 2020a. Regulation of Cell Type-Specific Immunity Networks in Arabidopsis Roots. *The Plant cell* **32**, 2742–2762.
- Rich-Griffin C, Eichmann R, Reitz MU, et al.** 2020b. Regulation of Cell Type-Specific Immunity Networks in Arabidopsis Roots. *The Plant cell* **32**, 2742–2762.
- Ropitiaux M, Bernard S, Follet-Gueye M-L, Vicré M, Boulogne I, Driouich A.** 2019. Xyloglucan and cellulose form molecular cross-bridges connecting root border cells in pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiology and Biochemistry* **139**, 191–196.

Roppolo D, De Rybel B, Tendon VD, Pfister A, Alassimone J, Vermeer JEM, Yamazaki M, Stierhof YD, Beeckman T, Geldner N. 2011. A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature* **473**, 381–384.

Rosenfeld MG, Lin CR, Amara SG, Stolarsky L, Roos BA, Ong ES, Evans RM. 1982. Calcitonin mRNA polymorphism: Peptide switching associated with alternative RNA splicing events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 1717–1721.

Safaeizadeh M, Boller T. 2019. Differential and tissue-specific activation pattern of the AtPROPEP and AtPEPR genes in response to biotic and abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* **14**, e1590094.

Sakharkar MK, Chow VTK, Kanguene P. 2004. Distributions of exons and introns in the human genome. *In silico biology* **4**, 387–393.

Samach A, Melamed-Bessudo C, Avivi-Ragolski N, Pietrokovski S, Levy AA. 2011. Identification of Plant RAD52 Homologs and Characterization of the *Arabidopsis thaliana* RAD52-Like Genes. *The Plant Cell* **23**, 4266–4279.

Sanabria NM, Dubery IA. 2016. Alternative splicing of the receptor-like kinase Nt-Sd-RLK in tobacco cells responding to lipopolysaccharides: suggestive of a role in pathogen surveillance and perception? *FEBS Letters* **590**, 3628–3638.

Sanchez Carrillo IB, Hoffmann PC, Barff T, Beck M, Germain H. 2023. Preparing *Arabidopsis thaliana* root protoplasts for cryo electron tomography. *Frontiers in Plant Science* **14**.

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution* **3**, 430–439.

Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, Felix G, Chinchilla D. 2010. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *The Journal of biological chemistry* **285**, 9444–51.

Schürholz A-K, Lopez-Salmeron V, Li Z, et al. 2018. A Comprehensive Toolkit for Inducible, Cell Type-Specific Gene Expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **178**, 40–53.

Seok HY, Ha J, Lee SY, Bae H, Moon YH. 2020. Two alternative splicing variants of *aterf73/hre1*, *hre1α* and *hre1β*, have differential transactivation activities in *arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 1–23.

Sessions A, Weigel D, Yanofsky MF. 1999. The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant Journal* **20**, 259–263.

Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, Imamichi T, Chang W. 2022. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research* **50**, 216–221.

- Sigrist CJA, de Castro E, Cerutti L, Cucho BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I.** 2013. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research* **41**, D344–D347.
- Singh MB, Lohani N, Bhalla PL.** 2021. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress Response in Pollen Development and Heat Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science* **12**.
- Smakowska E, Kong J, Busch W, Belkhadir Y.** 2016. Organ-specific regulation of growth-defense tradeoffs by plants. *Current Opinion in Plant Biology* **29**, 129–137.
- Song A, Chen FX.** 2022. The pleiotropic roles of SPT5 in transcription. *Transcription* **13**, 53–69.
- Song Z, Zhang C, Jin P, Tetteh C, Dong X, Luo S, Zhang S, Li X, Liu Y, Zhang H.** 2022. The cell-type specific role of Arabidopsis bZIP59 transcription factor in plant immunity. *Plant, Cell & Environment* **45**, 1843–1861.
- Soutourina J.** 2018. Transcription regulation by the Mediator complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**, 262–274.
- Stahelin LA, Zheng HQ, Yoder TL, Smith JD, Todd P.** 2000. Columella Cells Revisited: Novel Structures, Novel Properties, and a Novel Gravisensing Model. *Gravit Space Biol Bull* **13**, 95–100.
- Strotmann VI, Stahl Y.** 2021. At the root of quiescence: function and regulation of the quiescent center. *Journal of Experimental Botany* **72**, 6716–6726.
- Su SH, Gibbs NM, Jancewicz AL, Masson PH.** 2017. Molecular Mechanisms of Root Gravitropism. *Current Biology* **27**, 964–972.
- Sugliani M, Brambilla V, Clerckx EJM, Koornneef M, Soppe WJJ.** 2010. The Conserved Splicing Factor SUA Controls Alternative Splicing of the Developmental Regulator ABI3 in Arabidopsis. *The Plant Cell* **22**, 1936–1946.
- Sun Y, Hamilton K, Tong L.** 2020. Recent molecular insights into canonical pre-mRNA 3'-end processing. *Transcription* **11**, 83–96.
- Sun T, Zhang Y, Li Y, Zhang Q, Ding Y, Zhang Y.** 2015. ChIP-seq reveals broad roles of SARD1 and CBP60g in regulating plant immunity. *Nature Communications* **6**, 10159.
- Szakonyi D, Duque P.** 2018. Alternative splicing as a regulator of early plant development. *Frontiers in Plant Science* **9**.
- Tang B, Feng L, Hulin MT, Ding P, Tang B, Feng L, Hulin MT, Ding P, Ma W.** 2023. Resource Cell-type-specific responses to fungal infection in plants revealed by single-cell transcriptomics II II Cell-type-specific responses to fungal infection in plants revealed by single-cell transcriptomics. *Cell Host and Microbe* **31**, 1732-1747.e5.
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang H-S, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F.** 2003. Quantitative Nature of Arabidopsis Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* **15**, 317–330.

Tapial J, Ha KCH, Sterne-Weiler T, et al. 2017. An atlas of alternative splicing profiles and functional associations reveals new regulatory programs and genes that simultaneously express multiple major isoforms. *Genome Research* **27**, 1759–1768.

Theisen FF, Prestel A, Elkjær S, Leurs YHA, Morffy N, Strader LC, O’Shea C, Teilum K, Kragelund BB, Skriver K. 2024. Molecular switching in transcription through splicing and proline-isomerization regulates stress responses in plants. *Nature Communications* **15**, 592.

Thoma S, Hecht U, Kippers A, Botella J, De Vries S, Somerville C. 1994. Tissue-Specific Expression of a Gene Encoding a Cell Wall-Localized Lipid Transfer Protein from Arabidopsis. *Plant Physiology* **105**, 35–45.

Thomas QA, Ard R, Liu J, Li B, Wang J, Pelechano V, Marquardt S. 2020. Transcript isoform sequencing reveals widespread promoter-proximal transcriptional termination in Arabidopsis. *Nature Communications* **11**.

Thompson HL, Shen W, Matus R, et al. 2023. MERISTEM-DEFECTIVE/DEFECTIVELY ORGANIZED TRIBUTARIES2 regulates the balance between stemness and differentiation in the root meristem through RNA splicing control. *Development (Cambridge)* **150**.

Tian W, Hou C, Ren Z, et al. 2019a. A calmodulin-gated calcium channel links pathogen patterns to plant immunity. *Nature* **572**, 131–135.

Tian C, Wang Y, Yu H, He J, Wang J, Shi B, Du Q, Provart NJ, Meyerowitz EM, Jiao Y. 2019b. A gene expression map of shoot domains reveals regulatory mechanisms. *Nature Communications* **10**.

To A, Valon C, Savino G, Guillemot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F. 2006. A Network of Local and Redundant Gene Regulation Governs Arabidopsis Seed Maturation. *The Plant Cell* **18**, 1642–1651.

Tognacca RS, Rodríguez FS, Aballay FE, Cartagena CM, Servi L, Petrillo E. 2023. Alternative splicing in plants: current knowledge and future directions for assessing the biological relevance of splice variants. *Journal of Experimental Botany* **74**, 2251–2272.

Ullah F, Hamilton M, Reddy ASN, Ben-Hur A. 2018. Exploring the relationship between intron retention and chromatin accessibility in plants. *BMC genomics* **19**, 21.

Vainonen JP, Jaspers P, Wrzaczek M, Lamminmäki A, Reddy RA, Vaahtera L, Brosché M, Kangasjärvi J. 2012. RCD1–DREB2A interaction in leaf senescence and stress responses in Arabidopsis thaliana. *Biochemical Journal* **442**, 573–581.

Van Aken O, Zhang B, Carrie C, Uggalla V, Paynter E, Giraud E, Whelan J. 2009. Defining the mitochondrial stress response in arabidopsis thaliana. *Molecular Plant* **2**, 1310–1324.

Viola IL, Gonzalez DH. 2016. Chapter 6 - Structure and Evolution of Plant Homeobox Genes. In: Gonzalez DH, ed. *Plant Transcription Factors*. Boston: Academic Press, 101–112.

- Voigt CA.** 2014. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Voss M, Cseke LJ, Gassmann W, Niefind K.** 2023. A splicing variant of EDS1 from *Vitis vinifera* forms homodimers but no heterodimers with PAD4. *Protein Science* **32**, e4624.
- Wahl MC, Will CL, Lührmann R.** 2009. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* **136**, 701–718.
- Wallner E-S, López-Salmerón V, Belevich I, et al.** 2017. Strigolactone- and Karrikin-Independent SMXL Proteins Are Central Regulators of Phloem Formation. *Current biology : CB* **27**, 1241–1247.
- Wang L, Cao C, Ma Q, et al.** 2014. RNA-seq analyses of multiple meristems of soybean: novel and alternative transcripts, evolutionary and functional implications. *BMC Plant Biology* **14**, 169.
- Wang X, Gong L, Zhang J, Wang L, Wu D, Xu J.** 2024. The Genome-Wide Profiling of Alternative Splicing in Willow under Salt Stress. *Forests* **15**.
- Wang X, Hu L, Wang X, Li N, Xu C, Gong L, Liu B.** 2016. DNA Methylation Affects Gene Alternative Splicing in Plants: An Example from Rice. *Molecular Plant* **9**, 305–307.
- Wang Z, Ji H, Yuan B, Wang S, Su C, Yao B, Zhao H, Li X.** 2015*a*. ABA signalling is fine-tuned by antagonistic HAB1 variants. *Nature Communications* **6**, 8138.
- Wang Z, Ji H, Yuan B, Wang S, Su C, Yao B, Zhao H, Li X.** 2015*b*. ABA signalling is fine-tuned by antagonistic HAB1 variants. *Nature Communications* **6**, 8138.
- Wang Y, Li X, Fan B, Zhu C, Chen Z.** 2021. Regulation and function of defense-related callose deposition in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 1–15.
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB.** 2008. Alternative Isoform Regulation in Human Tissue Transcriptomes. *Nature* **456**, 470–476.
- Wang M, Wang P, Liang F, et al.** 2018. A global survey of alternative splicing in allopolyploid cotton: landscape, complexity and regulation. *New Phytologist* **217**, 163–178.
- Wang Y-Y, Xiong F, Ren Q-P, Wang X-L.** 2020. Regulation of flowering transition by alternative splicing: the role of the U2 auxiliary factor. *Journal of Experimental Botany* **71**, 751–758.
- Wani SH, Anand S, Singh B, Bohra A, Joshi R.** 2021. WRKY transcription factors and plant defense responses: latest discoveries and future prospects. *Plant Cell Reports* **40**, 1071–1085.
- Willmann R, Lajunen HM, Erbs G, et al.** 2011. Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 19824–19829.

- Wu CH, Yamaguchi Y, Benjamin LR, Horvat-Gordon M, Washinsky J, Enerly E, Larsson J, Lambertsson A, Handa H, Gilmour D.** 2003. NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes and Development* **17**, 1402–1414.
- 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.
- Xiang T, Zong N, Zou Y, et al.** 2008. *Pseudomonas syringae* Effector AvrPto Blocks Innate Immunity by Targeting Receptor Kinases. *Current Biology* **18**, 74–80.
- Xie JQ, Zhou X, Jia ZC, Su CF, Zhang Y, Fernie AR, Zhang J, Du ZY, Chen MX.** 2023. Alternative Splicing, An Overlooked Defense Frontier of Plants with Respect to Bacterial Infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* doi: 10.1021/acs.jafc.3c04163.
- Xing D, Wang Y, Hamilton M, Ben-Hur A, Reddy ASN.** 2015. Transcriptome-Wide Identification of RNA Targets of *Arabidopsis* SERINE/ARGININE-RICH45 Uncovers the Unexpected Roles of This RNA Binding Protein in RNA Processing. *The Plant cell* **27**, 3294–3308.
- Xue Z, Liu L, Zhang C.** 2020a. Regulation of shoot apical meristem and axillary meristem development in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **21**.
- Xue Z, Liu L, Zhang C.** 2020b. Regulation of Shoot Apical Meristem and Axillary Meristem Development in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **21**.
- Xue C, Zhang H, Lin Q, Fan R, Gao C.** 2018. Manipulating mRNA splicing by base editing in plants. *Science China Life Sciences* **61**, 1293–1300.
- Yamamoto YY, Ichida H, Matsui M, Obokata J, Sakurai T, Satou M, Seki M, Shinozaki K, Abe T.** 2007. Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC Genomics* **8**, 67.
- Yan Q, Xia X, Sun Z, Fang Y.** 2017. Depletion of *Arabidopsis* SC35 and SC35-like serine/arginine-rich proteins affects the transcription and splicing of a subset of genes. *PLOS Genetics* **13**, e1006663.
- Yan J, Yu H, Li B, Fan A, Melkonian J, Wang X, Zhou T, Hua J.** 2019. Cell autonomous and non-autonomous functions of plant intracellular immune receptors in stomatal defense and apoplastic defense. *PLoS Pathogens* **15**, 1–25.
- Yang DL, Huang K, Deng D, Zeng Y, Wang Z, Zhang Y.** 2023. DNA-dependent RNA polymerases in plants. *Plant Cell* **35**, 3641–3661.
- Yang S, Tang F, Zhu H.** 2014a. Alternative splicing in plant immunity. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 10424–10445.
- Yang Z-T, Wang M-J, Sun L, Lu S-J, Bi D-L, Sun L, Song Z-T, Zhang S-S, Zhou S-F, Liu J-X.** 2014b. The Membrane-Associated Transcription Factor NAC089 Controls ER-Stress-Induced Programmed Cell Death in Plants. *PLOS Genetics* **10**, e1004243-.

- Yang W, Wightman R, Meyerowitz EM.** 2017*a*. Cell Cycle Control by Nuclear Sequestration of CDC20 and CDH1 mRNA in Plant Stem Cells. *Molecular Cell* **68**, 1108-1119.e3.
- Yang W, Wightman R, Meyerowitz EM.** 2017*b*. Cell Cycle Control by Nuclear Sequestration of CDC20 and CDH1 mRNA in Plant Stem Cells. *Molecular Cell* **68**, 1108-1119.e3.
- Yearim A, Gelfman S, Shayevitch R, et al.** 2015. HP1 Is Involved in Regulating the Global Impact of DNA Methylation on Alternative Splicing. *Cell Reports* **10**, 1122–1134.
- Zhang R, Calixto CPG, Marquez Y, et al.** 2017*a*. A high quality Arabidopsis transcriptome for accurate transcript-level analysis of alternative splicing. *Nucleic Acids Research* **45**, 5061–5073.
- Zhang R, Calixto CPG, Tzioutziou NA, et al.** 2015. AtRTD – a comprehensive reference transcript dataset resource for accurate quantification of transcript-specific expression in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **208**, 96–101.
- Zhang W, Du B, Liu D, Qi X.** 2014*a*. Splicing factor SR34b mutation reduces cadmium tolerance in Arabidopsis by regulating iron-regulated transporter 1 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **455**, 312–317.
- Zhang X, Garreton V, Chua NH.** 2005. The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes and Development* **19**, 1532–1543.
- Zhang XC, Gassmann W.** 2003. RPS4-Mediated Disease Resistance Requires the Combined Presence of RPS4 Transcripts with Full-Length and Truncated Open Reading Frames. *Plant Cell* **15**, 2333–2342.
- Zhang X-C, Gassmann W.** 2007. Alternative Splicing and mRNA Levels of the Disease Resistance Gene RPS4 Are Induced during Defense Responses. *Plant Physiology* **145**, 1577–1587.
- Zhang R, Kuo R, Coulter M, et al.** 2022. A high-resolution single-molecule sequencing-based Arabidopsis transcriptome using novel methods of Iso-seq analysis. *Genome Biology* **23**, 1–37.
- Zhang Z, Liu Y, Ding P, Li Y, Kong Q, Zhang Y.** 2014*b*. Splicing of receptor-like kinase-encoding SNC4 and CERK1 is regulated by two conserved splicing factors that are required for plant immunity. *Molecular Plant* **7**, 1766–1775.
- Zhang X-N, Shi Y, Powers JJ, Gowda NB, Zhang C, Ibrahim HMM, Ball HB, Chen SL, Lu H, Mount SM.** 2017*b*. Transcriptome analyses reveal SR45 to be a neutral splicing regulator and a suppressor of innate immunity in Arabidopsis thaliana. *BMC Genomics* **18**, 772.
- Zheng J, Liu F, Zhu C, Li X, Dai X, Yang B, Zou X, Ma Y.** 2019. Identification, expression, alternative splicing and functional analysis of pepper WRKY gene family in response to biotic and abiotic stresses. *PLOS ONE* **14**, e0219775-.
- Zhou Z, Fu XD.** 2013. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma* **122**, 191–207.

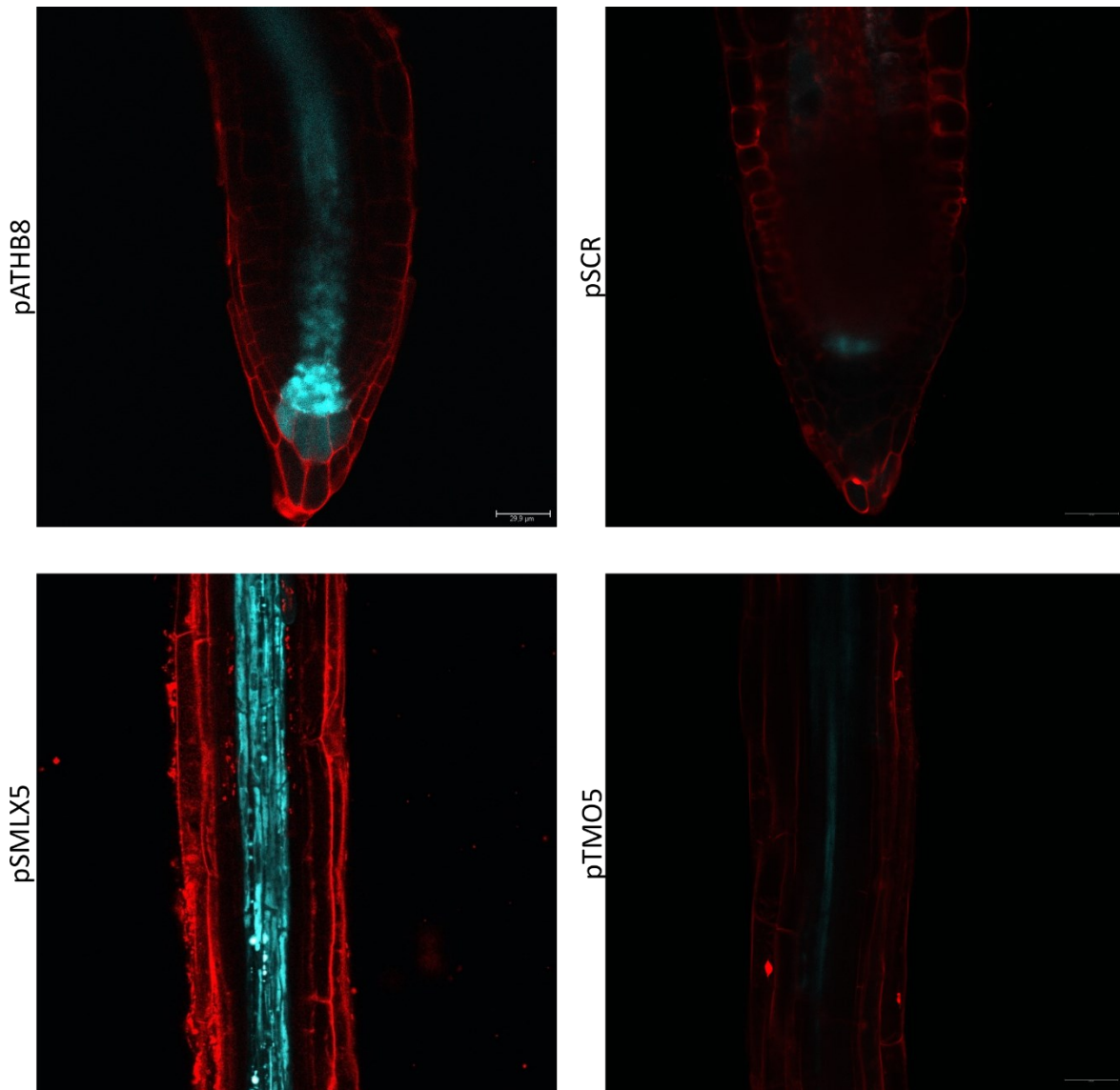
Zhu F, Farnung L, Kaasinen E, et al. 2018*a*. The interaction landscape between transcription factors and the nucleosome. *Nature* **562**, 76–81.

Zhu G, Li W, Zhang F, Guo W. 2018*b*. RNA-seq analysis reveals alternative splicing under salt stress in cotton, *Gossypium davidsonii*. *BMC Genomics* **19**, 73.

Zhu J, Liu M, Liu X, Dong Z. 2018*c*. RNA polymerase II activity revealed by GRO-seq and pNET-seq in *Arabidopsis*. *Nature Plants* **4**, 1112–1123.

Zhu X, Xu Z, Wang G, et al. 2023. Single-cell resolution analysis reveals the preparation for reprogramming the fate of stem cell niche in cotton lateral meristem. *Genome Biology* **24**, 1–31.

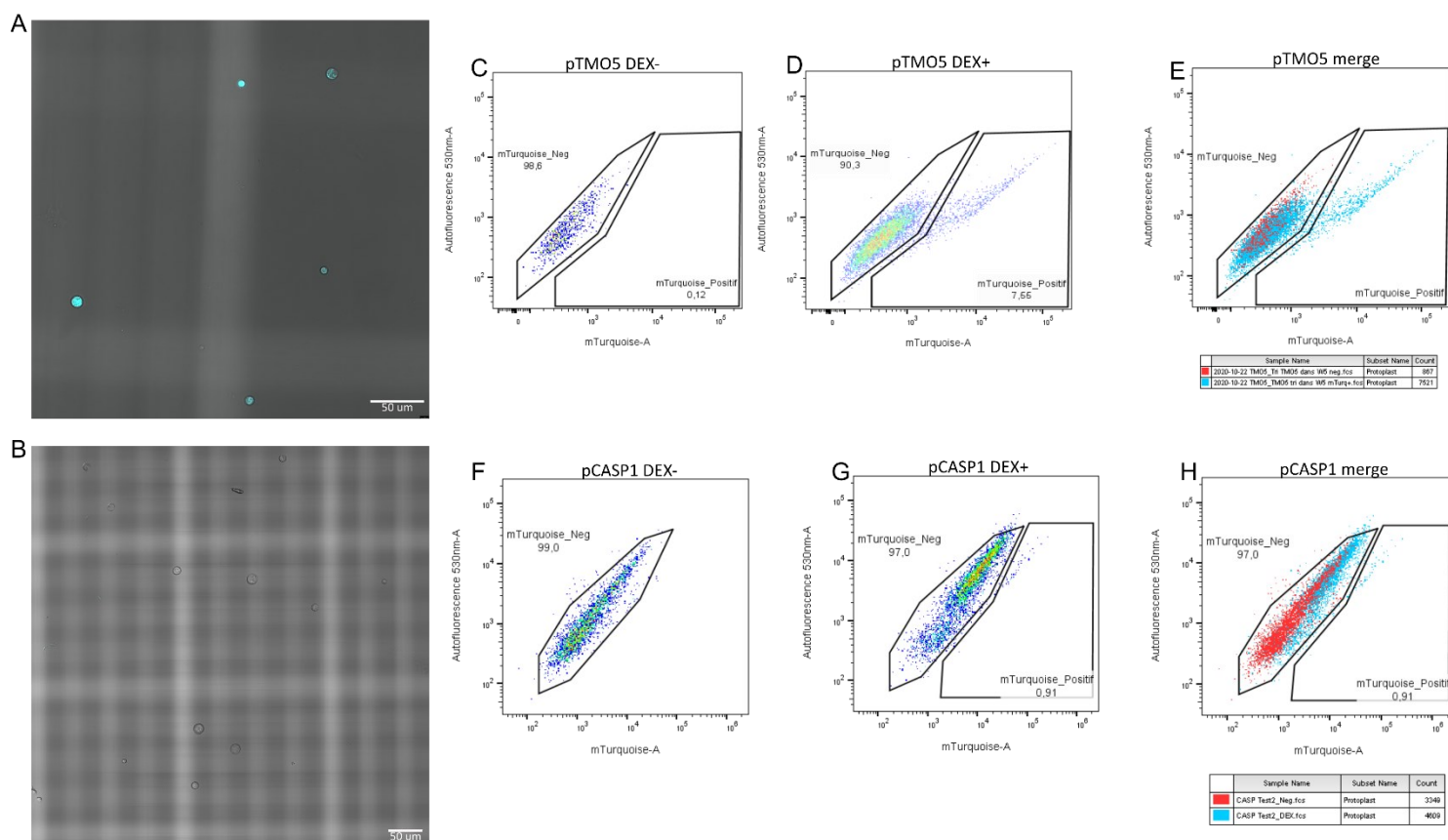
Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G. 2006. Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell* **125**, 749–760.

ANNEXE A : EXPRESSION DE MTURQUOISE2 DANS LES RACINES

Supplementary Figure S1. Confocal images of root cell types.

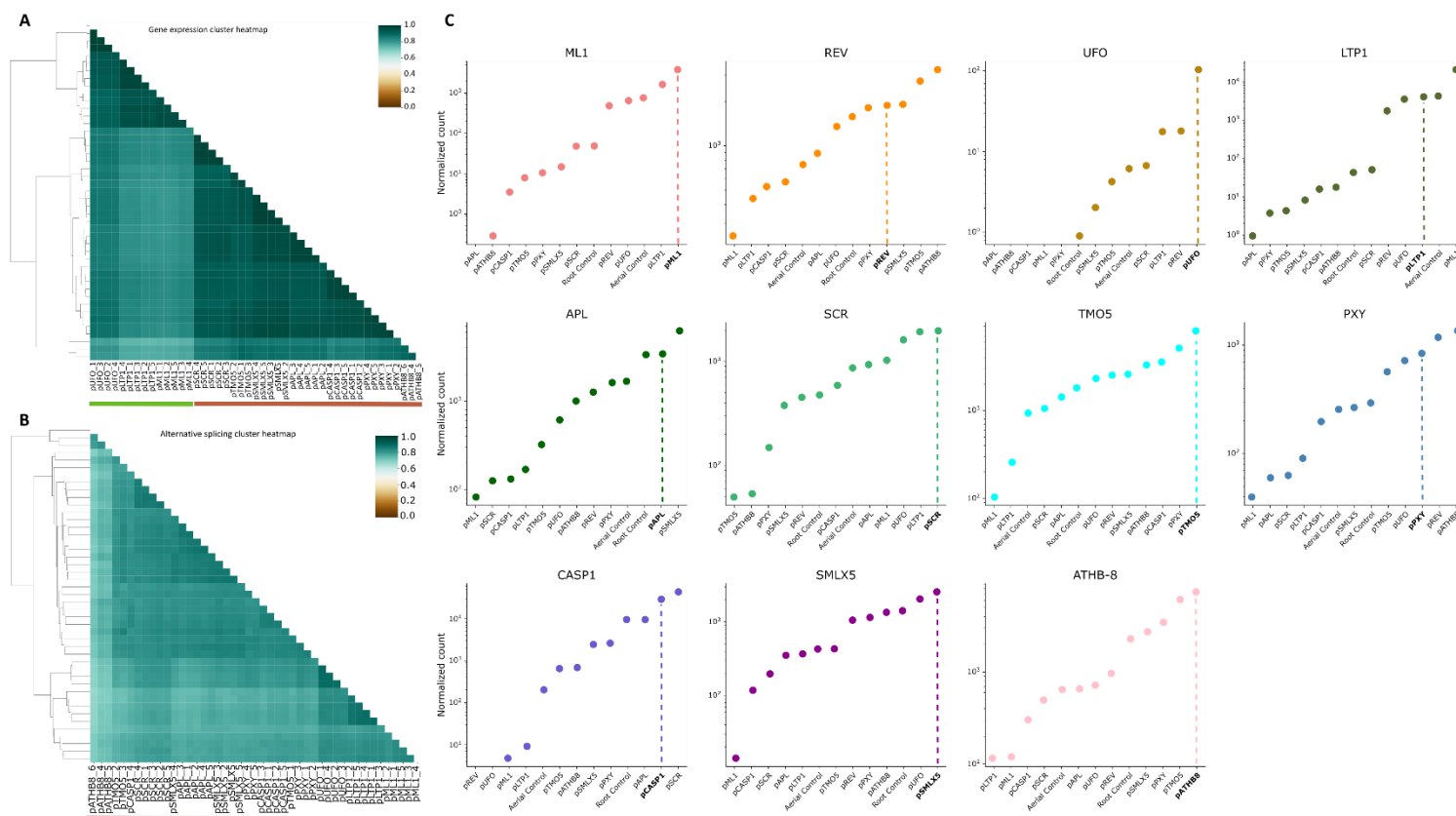
Confocal imaging of roots from transgenic plants dyed with PI (red) observed with Excitation/Emission wavelengths of 488 nm/590-660. mTurquoise expression (blue) is acquired with Excitation/Emission wavelengths of 405 nm/460-520 nm. Scale bar: 29.9 μm

ANNEXE B: TRIAGE DE PROTOPLASTES

**Supplementary Figure S2. Protoplast cell sorting.**

Confocal imaging of protoplasts after cell sorting. Protoplasts originating from *pSMLX5* transgenic plants collected as expressing mTurquoise2 (A) and protoplasts from the same sorting experiment collected as negative for mTurquoise2 expression (B). Scale bar: 50 μ m. FACS plotting of events obtained with a laser of 405 nm and a bandpass filter of 528/545 nm (mTurquoise-A) against events obtained with a laser of 488 nm and a bandpass of 527/532 nm (Autofluorescence-530nm-A) (C-H). Dot plot of protoplasts extracted from *pTMO5* plants grown on non-DEX medium, used to gate the mTurquoise2 negative events (C). Dot plot of protoplasts from *pTMO5* plants grown on DEX medium (D). Merge of the non-DEX grown plants (red dots) and DEX grown plants of *pTMO5* (blue dots)(E). Same plots are shown for *pCASP1* transgenic plants (F-H).

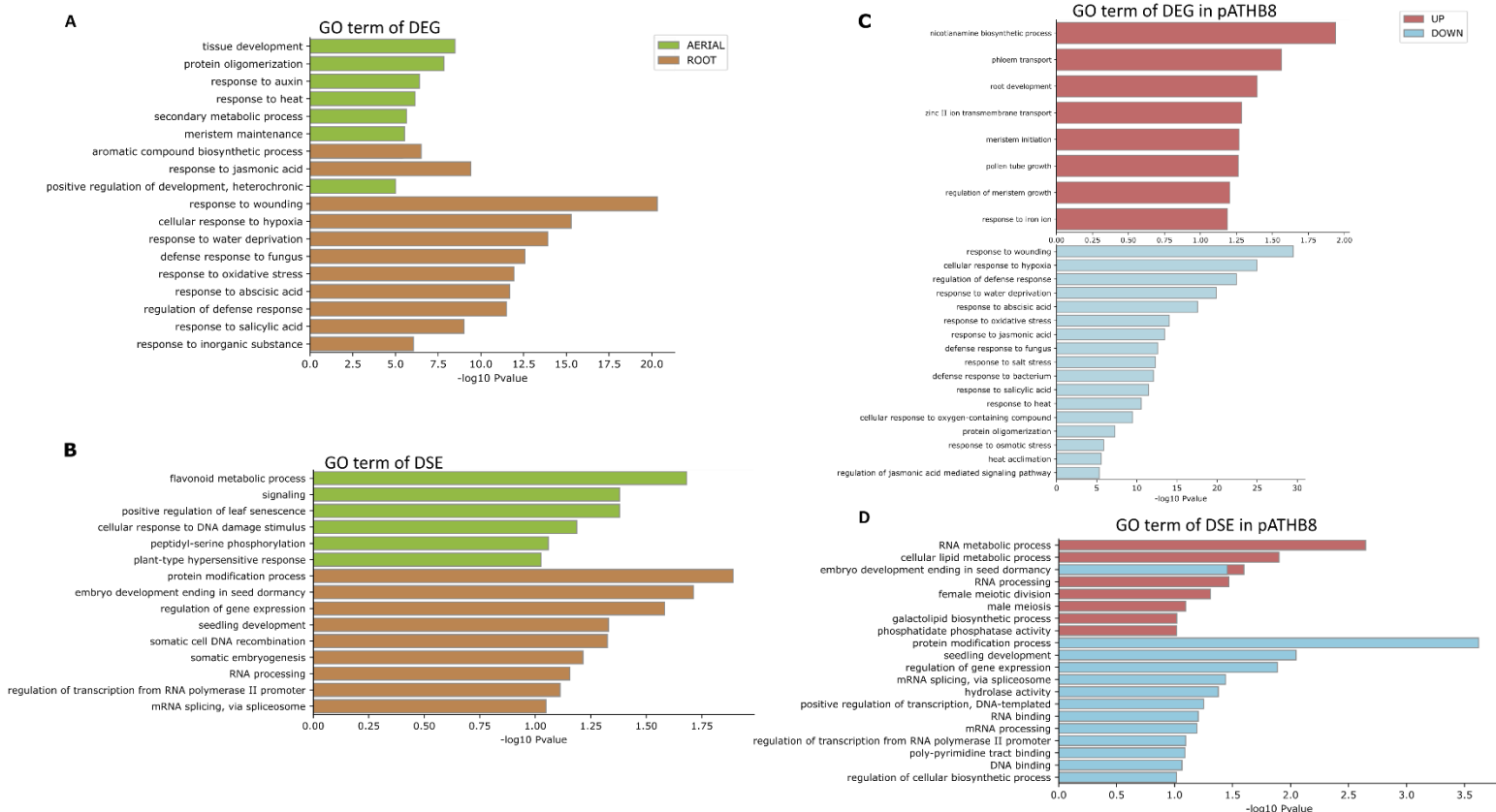
ANNEXE C : L'IDENTITÉ CELLULIÈRE EST CONSERVÉE



Supplementary Figure S3. Protoplast processing has minimal effect on their identity.

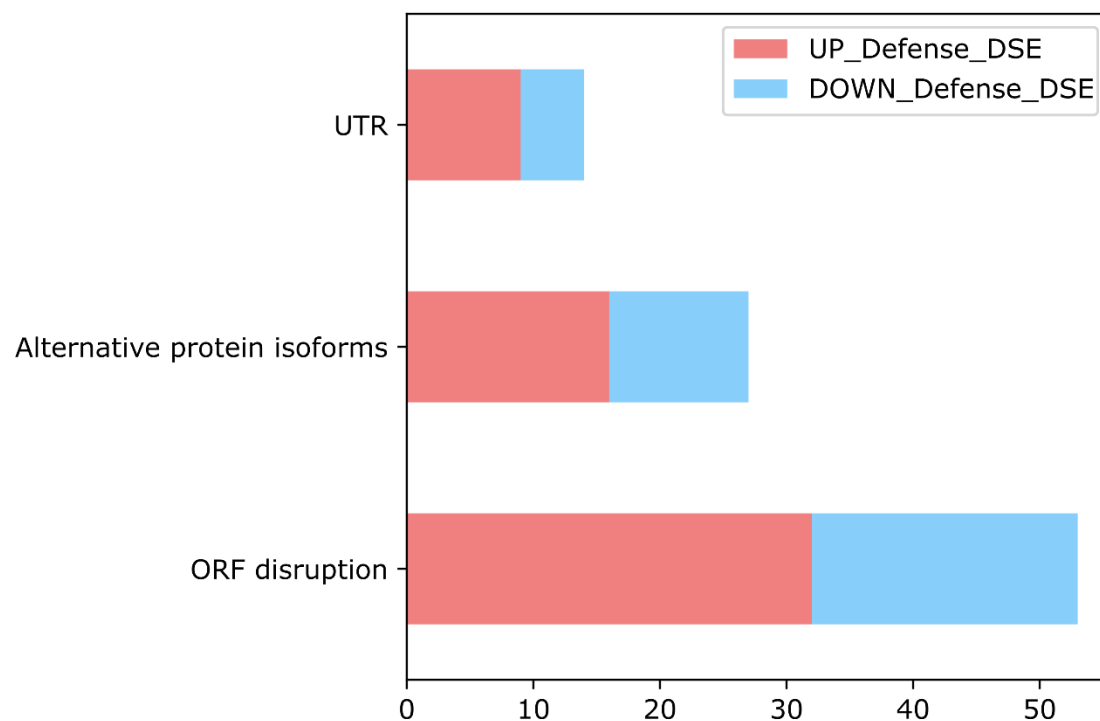
Spearman cluster heatmap of cRPKM (A) and PSI values (B) across replicates. Clustering method used is 'average'. Normalized read counts of the genes controlled by the cell type-specific promoters used in this study (C). Each panel corresponds to a specific gene. X-axis shows the transgenic plants expressing mTurquoise2 under different promoters. X-axis order is rearranged to show the promoter with the lowest to the highest count from left to right. Dotted line is used to highlight the corresponding promoter of the gene observed.

ANNEXE D : ANALYSE FONCTIONNELLE SUPPLÉMENTAIRE



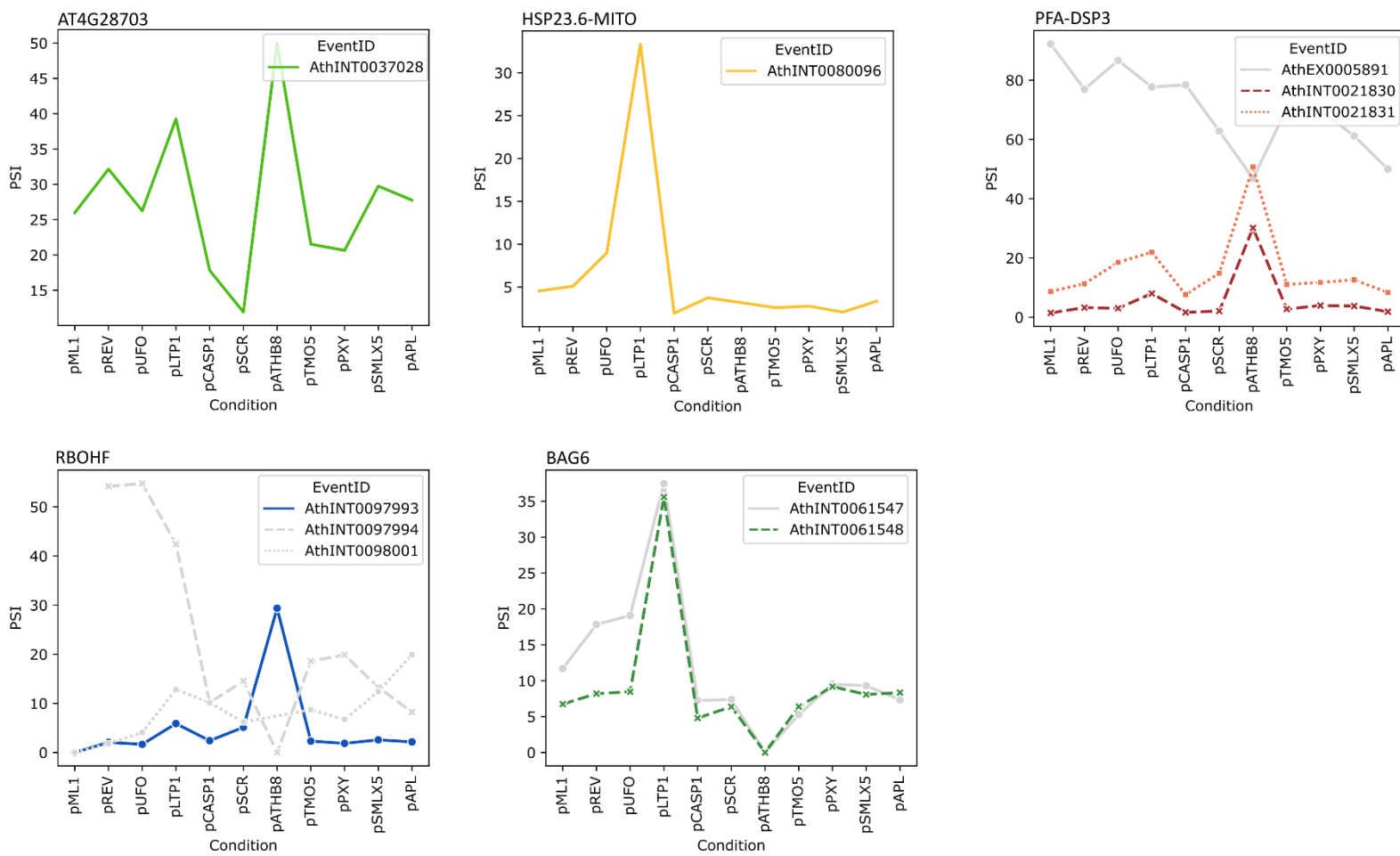
Supplementary Figure S4. Supplementary functional analysis.

Enriched GO term analysis of DEGs (A) and DSGs (B) in which aerial (green) and root (brown) promoters were separated. Enriched GO terms of DEGs (C) and DSGs (D) from *pATHB8*. down (blue) and up (red) regulated GO terms are represented. Bars indicate $-\log_{10}$ of the DAVID's EASE score modified *P*-value.

ANNEXE E : IMPACT SUR LES PROTÉINES

Supplementary Figure S5. Predicted protein impact of the immunity-related DSE separated in up- or down-regulation. Predicted impact of the immunity-DSEs on proteins. Bars represent the percentage of DSEs, which are predicted to cause either ORF disruption, generate an alternative isoform, or overlap UTRs. Red and blue represent up and downregulated DSE, respectively.

ANNEXE F: VARIANTS D'ÉPISSAGE LIÉS À L'IMMUNITÉ



Supplementary Figure S6. All splice variants from the immunity-related genes that are differentially spliced and differentially expressed. PSI variation across cell types of all the splicing variants from the immunity-related genes identified in Fig.6. Colored lines show the splice variants that are identified as significantly alternatively spliced. The variants that show a big variation of PSI but are colored in grey did not pass the quality filters described in methods to be identified as alternatively spliced.