# Université des Sciences et Technologies de Lille Université de Bucarest

N° d'ordre : 2432

# **THESE en CO-TUTELLE**

présentée par

# Mihai NITA-LAZAR

pour l'obtention du grade de

### Docteur des Universités de Lille I et de Bucarest

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

# Reconnaissance de signaux éliciteurs d'origine fongique impliqués dans les mécanismes de défense des plantes. Le modèle Fusarium - Rubus.

Présentée le 21 décembre 1998 devant la commission d'examen :

### **Président :**

Pr. Acad. Mihai SERBAN (Institut d'Agronomie, Bucarest)

### **Rapporteurs** :

Pr. Dana IORDACHESCU (Université de Bucarest) Pr. Acad. Mihai SERBAN (Institut d'Agronomie, Bucarest) Dr. Maud BRUNETEAU (Université de Lyon I) Pr. Henri MORVAN (Université de Limoges)

### Examinateurs :

Dr. Cecilia MOTAS (Institut de Biochimie de l'Académie Roumaine, Bucarest)
Dr. Yvette LIENART (CERMAV, Grenoble)
Pr. André VERBERT (Université des Sciences et Technologies de Lille I)
Pr. Emér. Jean MONTREUIL (Université des Sciences et Technologies de Lille I)



# SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
A. Interactions plante-pathogène	2
1. Définition	2
2. Résistance préexistante, et métabolites antifongiques préformés	3
2.1. Saponines	5
2.2. Glycosides cyanogéniques	7
2.3. Glucosinolates	9
2.4. Phototoxines	10
3. Résistance induite	12
3.1. La relation gène-pour-gène	13
3.1.1. Les gènes d'avirulence	14
3.1.2. Les gènes résistance	15
3.2. Réactions compatibles	16
3.3. Réactions incompatibles	17
4. Symbiose	19
4.1. Symbiose Légumineuses-Rhizobiacées	20
4.2. Autres exemples de symbiose plante-microorganisme	21
B. Généralités sur les champignons	23
1. Distribution taxonomique	23
2. Caractéristiques cytologiques et biochimiques	25
3. Pathologies induites par les champignons	28
3.1. Pathologies chez les animaux	28
3.2. Pathologies chez les végétaux	30
C. Objectifs de recherche	31

MATERIELS ET METHODES	34
A. Matériels	35
1. Matériel végétal	35
2. Matériel chimique	36
2.1. Préparation des fractions oligosaccharidiques, glycolipidiques et	
glycoprotéiques issues de Fusarium oxysporum sp.	36
2.2. Préparation des O-glycannes isolés de Fusarium sp M7-1	36
2.3. Substrats et effecteurs	37
2.4. Divers	37
B. Méthodes	38
1. Préparation des protoplastes	38
2. Expériences d'élicitation	39
2.1. Conditions expérimentales pour des protoplastes en suspension	39
2.2. Conditions expérimentales sur des cellules en suspension	40
2.3. Contrôles	40
3. Activité PAL (E.C: 4.3.15)	41
3.1. Extraction enzymatique	41
3.2 Dosage de l'activité PAL	41
3.3. Analyse des données	42
3.4. Extraction des produits réactionnels PAL	43
3.5 Analyse des produits réactionnels PAL	43
3.5.1. Par spectrophotométrie	43
3.5.2. Par chromatographie sur couche mince de silice	43
3.5.3. Par HLPC-PAD	44
4. Inhibiteurs de protéase	45
4.1. Extraction	45
4.2. Mesure de l'activité protéasique	45
4.2.1. Le milieu réactionnel de l'activité papaïne	46
4.2.2. Le milieu réactionnel de l'activité sérine-protéase	
(trypsine et α-chymotrypsine)	47
4.3. Analyse des données	47

5. Activités <u>D</u> -glycohydrolases	48
5.1 Extraction	48
5.2. Dosage d'activité glycohydrolase	48
5.3. Analyse des données	49
6. La réduction du Cyt c	50
6.1. Dosage du Cyt c réduit	50
6.2. Analyse des données	50
7. La consommation d'oxygène	51
7.1. Evaluation de la consommation d'oxygène	51
7.2. Analyse des données	52
8. La transition de la fluorescence	53
8.1. Conditions expérimentales	53
8.2. Analyse des données	53
9. Méthodes analytiques	54
9.1. Méthodes physiques	54
9.1.1. Résonance magnétique nucléaire	54
9.1.2. Spectrométrie de masse	55
9.2. Méthodes chimiques	56
9.2.1. Chromatographie par tamisage moléculaire	56
9.2.2. Chromatographie par échangeurs d'ions	56
9.2.3. Chromatographie liquide haute pression	56
9.2.4. Chromatographie liquide à performance rapide	57
9.2.5. Chromatographie sur couche mince	57
9.2.6. Chromatographie en phase gazeuse	58
9.2.7. Libération de O-glycannes par $\beta$ -élimination	61
9.2.8. Digestion pronasique	61
9.2.9. Chromatographie en Phase Gazeuse et Spectrométrie de Masse	61
9.2.10. Dosage colorimétrique des sucres	62
9.2.11. Dosage colorimétrique des protéines	62
9.2.12. Dosage colorimétrique des lipides	62

-

### **CHAPITRE 1**

EVALUATION DU POTENTIEL BIOLOGIQUE DE FRACTIONS ISOLEES DE	
FUSARIUM OXYSPORUM SP.	63
A. La signalisation chez les végétaux: Généralités	64
1. Définitions	64
2. Réponses physiologiques induites chez les végétaux par des signaux d'origine diverse	67
2.1. Oligo-, polysaccharides	67
2.2. Peptides, protéines	73
2.3. Lipides	74
2.4. Lipooligosaccharides	75
2.5. Glycopeptides, glycoprotéines	77
2.6. Phytohormones	78
2.7. Autres signaux	83
2.7.1. Les signaux à fonction hormonale	83
2.7.2. Toxines	84
3. Mode d'action d'une molécule signal	88
3.1. Perception du signal	88
3.2. Transduction de signal	90
3.3. Expression de réponses physiologiques	91
3.3.1. Réponses physiologiques de défense	91
3.3.2. Réponses impliquées dans le contrôle de la croissance et/ou de la	
différenciation cellulaire	93
4. Marqueurs biologiques de défense	94
B. Préparation de signaux éliciteurs de <i>Fusarium oxysporum</i> sp.	95
1. Préparations de fractions brutes	95
2. Caractérisation chimique (analyse préliminaire)	96
2.1. La fraction glycolipidique	96
2.2. La fraction insoluble dans l'acétone	96
C. Analyse de potentiel biologique de fractiones isolées du mycelium de Fusa	rium

oxysporum sp	102
1. Induction du métabolisme phénolique	102
1.1. Généralités	102

1.2. Métabolites phénoliques	103
1.2.1 Phytoalexines	103
1.2.2. Lignines	105
1.2.3 Acide salicylique	107
1.2.5. Actue sandy inque	108
1.3. Resultats: Identification du marqueur PAL	109
1.3.1. Generalites	109
1.3.2. Approche méthodologique	110
1.3.3. Réponse PAL induite par les fractions isolées de	
Fusarium oxysporum sp.	110
2. Induction d'inhibiteurs de protéases	111
2.1. Généralités	111
2.2. Résultats: identification de marqueurs inhibiteurs de thiol-protéase, et de	
sérine-protéase	115
2.2.1. Approche méthodologique	115
2.2.2. Réponse inhibiteur de papaïne ou de $\alpha$ -chymotrypsine induite par les	
fractions isolées de Fusarium oxysporum sp.	116
3. Induction de <u>D</u> -glycohydolases	117
3.1. Généralités	117
3.2. Résultats: identification du marqueur $(1,4)$ - $\alpha$ - <u>D</u> -galacturonase	121
3.2.1. Approche méthodologique	121
3.2.2. Réponse (1,4)- $\alpha$ - <u>D</u> -galacturonase : induction par les fractions fongique	S
isolées de Fusarium oxysporum sp. et modulation par des inhibiteurs	
de protéases	122
4. Induction de réponses précoces	125
4.1. Généralités	125
4.2. Résultats préliminaires	125
4.2.1. Changement de pH induit par un traitement éliciteur	126
4.2.2. Modification de consommation en $O_2$ induite par un traitement éliciteu	r 127

-

### CHAPITRE 2

IDENTIFICATION DE MOLECULES BIOLOGIQUEMENT ACTIVES	133
A. Caractérisation des glucides	134
1. Généralités	134
2. Identification de carbohydrates	136
2.1. Généralité	136
2.2. Libération de la partie glycosidique	137
2.2.1. Les N-glycannes	137
2.2.2. Les O-glycannes	137
2.3. Analyse structurale des glycannes	139
2.3.1. La technique Résonance Magnétique Nucléaire	139
2.3.2. Spectrométrie de Masse	143
3. Approche méthodologique	148
B. Caractérisation de la glycoprotéine B1 isolée de Fusarium oxysporum sp.	149
1. Caractérisation préliminaire	149
1.1. Chromatographie en phase gazeuse	149
1.2. Chromatographie d'échange d'ions dans un système FPLC	151
2. Analyse structurale	152
2.1. Libération de O-glycannes	152
2.2. Séparation et purification de composants glycosidiques	152
2.2.1. Composants neutres	152
2.2.2. Composants acides	154
2.2.3. Composants basiques	156
2.3. Etude de la structure de la fraction $N_{Ia}$	156
2.3.1. Analyse par SM	156
2.3.2. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse et Spectrométrie	
de Masse (CPG-SM)	158
2.3.3. Analyse par RMN	159
C. Caracterisation de la fraction oligosaccharidique B3 isolée de	161
Fusarium oxysporum sp.	101
1. Etude preliminaire	101
1.1. Chromatographie en couches minces	101

1.2. Chromatographie en phase gazeuse	162
2. Analyse structurale	163
2.1. Analyse par SM	163
2.2. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse et Spectrométrie de Masse	
(CPG-SM)	164
2.3. Analyse par RMN	165

# **D.** Discussions

171

# CHAPITRE 3

<b>REPONSES PRECOCES INDUITES PAR DES SIGNAUX ELICITEURS ISOLES</b>	5
DE FUSARIUM SP. M7-1 OU DE FUSARIUM OXYSPORUM SP.	174
A. Les réactions physiologiques précoces induites par un traitement éliciteur	175
1. Généralités	175
2. Approche méthodologique	178
B. Induction des éspèces activées d'oxygène	180
1. Généralités	180
2 Caractéristiques des EAO	181
2.1 L'oxygène moléculaire $O_2$	181
2.2 L'anion superoxyde( $O_2^{\bullet}$ )	182
2.3 Le radical hydroxyle (HO <sup>•</sup> ) et le radical perhydroxyle (HOO <sup>•</sup> )	183
2.4 Le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ou eau oxygénée	187
2.5 Autres radicaux libres centrés sur l'oxygène	189
3. "Burst oxydatif" induit par des O-glycannes isolés de glycoprotéines provenant	
de Fusarium sp. M7-1: détection et caractéristiques biochimiques	190
3.1. Génération d'anion superoxyde	191
3.1.1. Réduction du Cyt c exogène par les signaux Ja, Jb et Jc	191
3.1.2. Production d'O $_2$ : modulation de la réponse d'élicitation	192
3.2. Consommation d'oxygène	194
3.2.1. Consommation d'oxygène induite par les signaux Ja, Jb et Jc	194
3.2.2. Consommation d'oxygène : modulation de la réponse d'élicitation	195

3.3. Production de $H_2O_2$	197
3.3.1. L'oxydation de la pyranine	197
3.3.2. Production de $H_2O_2$ : modulation de la réponse d'élicitation	198
C. Réponse d'élicitation PAL	200
1. Généralité	200
2. Approche méthodologique	202
3. Induction de la PAL par des O-glycannes isolés de glycoprotéines provenant	
de Fusarium sp. M7-1	205
3.1. Détection	205
3.2. Caractérisation	206
3.3 Identification des produits réactionnels	207
3.3.1. Données préliminaires	207
3.3.2. Analyse par HPLC-PAD	209
4. Caractérisation de la réponse PAL induite par des signaux isolés de	
Fusarium oxysporum sp.	212
4.1. Caractérisation	212
4.2. Identification des produits réactionnels PAL	213
4.2.1. Données préliminaires	213
4.2.2. Analyse par HPLC-PAD	213
D. Discussion	215
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	220
A. Bilan des résultats expérimentaux	221
B. Perspectives et retombées biotechnologiques	227
LISTE DE PUBLICATIONS	228
REFERENCES	232

.

# **ABREVIATIONS**

$\Delta F_{512}$	:Variation de la fluorescence à 512 nm
ΔA <sub>290 (410, 500, 500)</sub>	:Variation de l'absorbance à 290 nm (à 410, 500 et 550 nm)
<sup>13</sup> C-RMN	:Résonance magnétique nucléaire du carbone 13 à une dimension
<sup>1</sup> H-RMN	:Résonance magnétique nucléaire de l'hydrogène 1 à une dimension
AB <sub>2</sub> H	:Acide benzoïque 2-hydroxylase
ADN	:Acide désoxyribonucléique
AlCl <sub>3</sub>	:Chlorure d'aluminium
ARNm	:Acide ribonucléique messager
ATP	:Adénosine triphosphate
Avr	: gène dávirulence
BAPNA	: <i>p</i> -nitroaniline D.L (N- $\alpha$ -benzovl) arginine
BSTFA	Bis Silvi TriFluoro Acétamide
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	:Ethylène
CaCl	:Chlorure de calcium
CAD	:Cinnamyl-alcool deshydrogenase
CAT	:Catalase
CCM	:Chromatographie sur couche mince
CERMAV	:Centre de recherche sur les macromolécules végétales
COMT	:3-O-méthyltransférase
CPG	:Chromatographie en phase gazeuse
CPG-SM	:Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de
	masse
Cvt c	:Cytochrome c
d	:déplacement chimique
DMSO	:Diméthylsulfoxide
DP	Degré de polymérisation
EAO	Espèces activées d'oxygène
EtOH	:Ethanol
FAB-SM	:Spectrométrie de masse par bombardement rapide d'atomes
FPLC	:Chromatographie liquide à performance rapide
Fuc	: L-fucopyranoside
a	$V \equiv -1 F$
8 Gal	: D gelactofiranoside
Gic	: <u>D</u> -glucopyranoside
GluA	:Acide β-D glucuronique
GTP	:Guanidine triphosphate
$H_2O_2$	:Peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée
HCl	:Acide chlorhydrique
HCN	:Acide cyanhydrique
HPLC	:Chromatographie liquide à haute performance
HR	:Réaction d'hypersensibilité
HRGP	:Glycoprotéines riches en hydroxyproline
Hz	:Hertz
IP	Inhibiteurs de protéases

J	:Constantes de couplage
KCl	:Chlorure de potassium
kDa	:Kilodalton
LOX	:Lipoxygénase
L-Phe	:L-phénylalanine
Man	: D-mannopyranoside
MeOH	:Méthanol
MgCl <sub>2</sub>	:Chlorure de magnésium
n.d.	:non-déterminé
NaBH4	:Borohydrure de sodium
NaOH	:Hydroxyde de sodium
NCBI	:Centre national de l'institut de biologie
02 <sup>•-</sup>	:Anion superoxyde
PAD	:Détecteur à barrettes de diode
PAL	:Phénylalanine ammoniac-lyase
PBS	:Tampon phosphate ("Phosphate-Buffered Saline")
PEG	:Polyéthylèneglycol
PLA <sub>2</sub>	:Phospholipase A <sub>2</sub>
ppm	:partie par million
PR-protéines	Protéines liées à la pathogénèse
PVPP	:Polyvinylpolypyrolidone
R	:gène de résistance
R•	<sup>i</sup> Radical alkyle
Rha	: <u>L</u> -rhamnofuranose
RO <sup>∙</sup>	:Radical alkoxyle
ROO	:Radical peroxyle
ROOH	:Hydroperoxyde
SA	:Acide salicylique
SAR	:Résistance systémique acquise
SHAM	:Acide salicylhydroxaminique
SOD	:Superoxide dismutase
Tr	:Temps de rétention
Tris	:Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane
UDP	:Uridine diphosphate
v/v	:Volume/volume
Xyl	: <u>D</u> -xylopyranoside

.

# INTRODUCTION

Dans le cadre de l'écosystème les plantes transforment l'énergie solaire en énergie stockable sous forme de molécules organiques par libération d'oxygène. Celles-ci sont utilisées, à leur tour, comme source d'énergie pour les niveaux supérieurs de la pyramide trophique et énergétique. Les conditions environnementales, atmosphériques, climatiques (forte chaleur ou luminosité, sécheresse, pollution des sols ou de l'atmosphère, attaque par des pathogènes ...) agissent négativement sur les plantes en provoquant de graves perturbations dans l'écosystème, ce qui affecte la vie des différentes espèces et de l'homme en particulier. Le cas des Irlandais qui, le siècle dernier, ont émigré vers les Etats-Unis pour échapper à la famine causée par l'infection de la pomme-de-terre par le champignon *Phythophthora infestans* en fournit un exemple.

# A. Interactions plante-pathogène

# 1. Définitions

Les récoltes de notre planète sont détruites chaque années sous l'action conjuguée des multiples agresseurs que sont les micro-organismes (champignons, bactéries, virus), les insectes, les nématodes et les acariens. Pour limiter les dégâts, l'homme dispose aujourd'hui d'un certain nombre de moyens dans le domaine phytosanitaire avec l'utilisation des pesticides ou bactéricides. Cependant malgré ce progrès technique, ces produits n'ont jamais le dernier mot face aux parasites qu'ils combattent. La protection des plantes sera-t-elle donc toujours un travail de Sisyphe? Peut-être pas, car d'autres alternatives existent. L'une d'entre- elles apparaît comme particulièrement intéressante. Elle consiste à ne plus considérer la plante

seule ou le parasite seul, mais à prendre en compte l'association "plante-pathogène". La pathogène "émet" plusieurs signaux qui sont reconnus par la cellule végétale, ensuite celle-ci déclenche des réactions en cascades qui aboutissent au développement d'un état de résistance de la plante entière. Donc dans un futur proche (des réalisations sont déjà en cours), on peut envisager la possibilité de mettre au point une stratégie de manipulations géniques résultant en l'augmentation de la résistance d'une plante à un agent pathogène donné, ce qui remplacerait le traitement chimique souvent inefficace à long terme, et toujours dévastateur pour l'environnement.

# 2. Résistance préexistante, et métabolites antifongique préformés

Dans leur lutte permanente pour la survie, les plantes, tous comme les animaux, ont développé une panoplie diversifiée de systèmes de protection et de défense, qui leur permettent de résister à des maladies infectieuses et aux parasites.

Parfois, les systèmes de protection préexistent avant tout contact de l'agent pathogène avec l'hôte mais le plus souvent, une résistance (résistance induite) se met en place après la rencontre de la plante avec son agresseur.

Pour un certain nombre des plantes, il y a des moyens défensifs qui préexistent l'attaque par un agent pathogène potentiel. Il peut s'agir de la présence d'une barrière morphologique qui empêche et/ou limite la pénétration ou le développement des microorganismes. Ainsi, la cuticule plus épaisse de certaines variétés de riz les protège de l'attaque de champignons. Dans le cas du blé, la tige de certaines variétés est plus riche en sclérenchyme qu'en collenchyme. Cette particularité leur assure une protection efficace contre les infections de rouille. Pour certaines variétés d'orge, c'est la présence d'une feuille paniculaire qui s'avère décisive pour empêcher la réussite des attaques du champignon *Ustilago nuda*. En effet, cette feuille empêche les spores du champignon d'atteindre les fleurs pendant toute la période qui précède la pollinisation et durant laquelle le pistil sera réceptif (Rajnchapel-Messai, 1988).

Il existe aussi chez des plantes saines des **métabolites biologiquement actifs** ou des précurseurs inertes qui se transforment en molécules actives pendant l'attaque fongique ou après une blessure. Souvent l'activation de ces précurseurs inactifs implique l'action d'enzymes libérées par la plante pendant la destruction des cellules.

La distribution de ces inhibiteurs préformés est souvent spécifique à un certain tissu et leur localisation, généralement périphérique, suggère un rôle dans la prévention. En général, les inhibiteurs sont "séquestrés" dans des organites spécifiques des plantes saines (vacuoles, lysosomes).

Ces inhibiteurs préformés diversifiés par leur nature et quantité dépendent de l'environnement, de l'âge ou du génotype de la plante, et ils ont souvent un spectre d'action assez large. La diffusion de certains inhibiteurs préformés peut influencer la croissance du champignon à la surface de la plante. C'est le cas des bulbes d'oignons pigmentés qui présentent une importante accumulation d'acide protocatéchique et de catéchol dans les cellules mortes de l'épiderme. Quand les conditions d'humidité sont favorables à une infection par le champignon *Colletotrichum circinans*, ces phénols diffusent dans les gouttes d'eau de l'épiderme au niveau duquel se réalise la contamination. Ils inhibent alors la germination des spores en lysant les parois des filaments germinatifs.

Parfois le pathogène peut présenter une résistance à ces inhibiteurs préformés quand il développe une tolérance ou acquiert un système de detoxification spécifique.

Ces métabolites antifongiques préformés sont de structure chimique très diverse: des phénols, des glycosides phénoliques, des lactones insaturées, des composés avec soufre, des saponines, des glycosides cyanogéniques, les glucosinolates en font partie.

# 2.1. Saponines

Les saponines sont largement distribuées dans le règne végétal, et elles sont toxiques pour de nombreux prédateurs (champignons, mollusques, acariens, poissons) (Osbourn, 1996). Ce sont des composés glycosylés présents dans des plantes saines qui diffèrent par la structure chimique de l'aglycone. On distingue:

(i) des triterpènes le plus souvent chez des Dicotylédones et parfois chez les Monocotylédones. L'avénacine (Figure 1a) est un exemple de composé triterpènoïdique localisé dans les racines de l'avoine (Maizel *et al.*, 1964) qui induit une résistance contre le pathogène *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*;

(ii) des stéroïdes, détectables généralement chez des Monocotylédones et parfois chez des Dicotylédones. L'avénacoside (Figure 1b), localisée dans les feuilles de l'avoine, induit une résistance contre le pathogène *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*;

(iii) des alcaloïdes stéroïdiques, trouvés chez les plantes des Solanaceae (pomme-deterre, tomate) et Lilliaceae, et représentés par l' $\alpha$ -tomatine (Figure 1c), la plus importante saponine chez la tomate. Cette saponine se trouve dans des plantes saines (Roddick, 1974), et elle offre une protection contre les pathogènes Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (Smith et MacHardy, 1982) et Verticilium albo-atrum (Pegg et Woodward, 1986). Il n'y a pas de différence d'accumulation de l' $\alpha$ -tomatine au cours d'interactions compatibles ou non, ce qui indique que ce composé n'a pas de rôle dans la résistance spécifique de la plante.



Figure 1. Structure chimique de l'avénacine  $A_1$  (a), de l'avénacoside A (b) et de l'atomatine (c). Glc:  $\beta$ -<u>D</u>-glucose; Ara:  $\alpha$ -<u>L</u>-arabinose; Rha:  $\alpha$ -<u>L</u>-rhamnose; Gal:  $\beta$ -<u>D</u>-galactose; Xyl:  $\alpha$ -<u>D</u>-xylose.

Les agents pathogènes arrivent à contourner la défense préexistante des plantes. Par exemple, contre les saponines certains champignons ont des mécanismes de résistance matérialisés par:

(i) une composition spéciale de leurs membranes. La toxicité des saponines se manifeste par une action lytique, dépendante du pH (Roddick et Drysdale, 1984), sur les stérols membranaires du pathogène (Fenwick *et al.*, 1992). La résistance contre la saponine est réalisée par certains champignons comme *Pythium* et *Phytophthora*, par une déficience en

stérols membranaires (Arneson et Durbin, 1968). Pour d'autres champignons comme *Alternaria solani* c'est une modification du pH au site d'infection qui neutralise l'effet de la saponine (Schönbeck et Schlösser, 1976);

(ii) des enzymes de detoxification. Certains champignons produisent des  $\underline{D}$ glycosylhydrolases qui clivent la chaîne glycosidique liée au C<sub>3</sub> du squelette saponinique. Des mutants, qui ne produisent pas les enzymes, ont perdu ainsi la capacité d'infecter les hôtes. Ainsi, *Gaeumannomyces graminis avenae* peut hydrolyser l'avenacine A-1 via l'enzyme avenacinase (Bowyer *et al.*, 1995) qui élimine les résidus terminaux  $\underline{D}$ -glucose liés  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 2) et  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Le pathogène *Avenae* produit aussi une avenacosidase capable d'hydrolyser toutes les chaînes saccharidiques liées au C<sub>3</sub> et C<sub>26</sub> des avenacosides A et B (Wubben *et al.*, 1996). Le pathogène *Septoria lycopersici* produit des tomatinases; certaines libèrent le résidu  $\underline{D}$ glucose terminal (Arneson et Durbin, 1967), alors que d'autres éliminent tout le squelette sucre (Lairin *et al.*, 1996)

# 2.2. Glycosides cyanogéniques

Environ 2000 plantes sont connues pour une activité cyanogénique liée à la défense contre des pathogènes. Les plus connus des glycosides cyanogéniques, sont les **amygdalines** des graines de lin (*Linum usitatissimum*) ou du haricot (*Phaseolus lunatus*).

La biosynthèse de glycosides cyanogéniques implique la formation d'hydroxinitriles, à partir de composés qui sont ensuite glycosylés (Hughes, 1991). Dans tous les cas, le résidu monosaccharidique lié à l'aglycone est un résidu  $\beta$ -D-glucose lié ou non à un autre monosaccharide par une liaison ester (Davis, 1991).

La toxicité est liée à la libération d'HCN par des  $\beta$ -glucosylhydrolases de la plante saine (qui ne presente pas d'HCN libre), le mécanisme de dégradation est présenté dans la figure 2.



Figure 2. Formation d'HCN à partir des glycosides cyanogéniques

L'HCN a un effet toxique direct contre le pathogène, ou bien il bloque une réponse de défense de la plante comme la production d'une phytoalexine (Lieberei *et al.*, 1989). Les plantes se protègent de l'effet toxique de l'HCN par l'activation de rhodanases, enzymes de type  $\beta$ -cyanoalanine-synthétase. Les champignons se protègent aussi contre l'HCN. Par exemple, la tolérance du pathogène *Microcyelus ulei* provient de l'acquisition d'une

respiration résistante à l'HCN (Lieberei *et al.*, 1989). Les champignons *Stemphylium loti* (Fry et Millar, 1972), *Gloeocercospora sorghi* (Fry et Myers, 1981) ou *Fusarium laterium* (Cluness, 1993) possèdent des enzymes qui transforment l'HCN en forme amide non toxique.

# 2.3. Glucosinolates

Les glucosinolates sont des thio-glucosides présents dans la famille des Crucifères incluant le type *Brassica* et répertoriés en trois classes en fonction des chaînes aliphatique, indolique et alkyle- $\alpha$ -acides aminés (Mithen, 1992). Parmi les champignons qui déclenchent chez *Brassica* une synthèse de glucosinolates on peut citer *Leptosphaeria maculans* (Mithen *et al.*, 1986), *Mycosphaerella brassicae* (Harthill et Sutton, 1980) et *Alternaria* sp. (Milford *et al.*, 1989).

Les glucosinolates sont localisés dans certains organes de la plante selon leur spécificité. Ainsi chez le colza, les glucosinolates aliphatiques sont localisés dans les feuilles, et les dérivés indole ou phényl-éthyle s'accumulent dans des racines ou dans les tiges (Mithen, 1992).

Dans des tissus agressés, les glucosinolates sont hydrolysés par des thioglucosidases en produits volatiles (isothiocyanates, nitriles, thiocyanates) sont très toxiques (Figure 3). La libération d'un produit donné dépend du glucosinolate initial, de la structure et des thioglucosidases présentes mais aussi de facteurs comme la température, le pH, la concentration en ions métalliques ou en cofacteurs enzymatiques (Chew, 1988). Les isothiocyanates accumulés dans des feuilles de *Brassica*, par exemple, peuvent avoir un rôle toxique contre l'agresseur (Mithen *et al.*, 1986), mais ils peuvent être utilisés comme précurseurs dans la synthèse d'auxine et de phytoalexines à noyau indol (Rouxel *et al.*, 1989).



Figure 3. Hydrolyse de glucosinolates aliphatiques. Glc: glucose.

### 2.4. Phototoxines

Certaines plantes tirent profit de l'énergie solaire pour améliorer leur arsenal chimique. Elles fabriquent des molécules qui, inoffensives dans l'obscurité, deviennent nocives sous l'action de la lumière pour l'agresseur. Ces substances, naturellement appelées **phototoxines**, sont hautement agressives, et elles sont dépourvues de toute sélectivité.

Actuellement, plusieurs centaines de phototoxines ont été isolées à partir de végétaux appartenant à trente familles. Comme la structure chimique de ces substances est très variable (Figure 4), il n'est pas surprenant de rencontrer différents mécanismes d'action. Mais la première étape est toujours la même: la molécule absorbe un photon et passe ainsi dans un état excité instable, et de haute énergie. Ensuite, cette molécule activée a le rôle soit d'une toxine, c'est le cas des **psoralènes** qui diffusent rapidement dans les cellules pour se fixer sur des brins d'ADN en les endommageant d'un façon irréversible, soit d'un catalyseur pour le processus de photosensibilisation (c'est le cas de l'hypéricine). Ces réactions de photosensibilisation génèrent des produits d'oxydation, notamment des formes activées d'oxygène qui finissent par altérer la fonction biologique normale des biomolécules et provoquer la mort cellulaire.

Face aux phytotoxines, l'organisme développe une adaptation. Des insectes, par exemple, s'abritent de la lumière pour manger en creusant des tunnels dans le végétal ou en s'enroulant dans une feuille ou ils s'alimentent seulement la nuit. D'autres développent des résistances dites physiologiques en formant une cuticule opaque ou réfléchissante.



(b)







# 3. Résistance induite

Sous ce terme on désigne les modifications métaboliques induites dans la plante en réponses à l'agression. Dans certains cas, on ne décèle que tardivement ou discrètement les réactions de défense, la plante présentant une sensibilité importante au parasite. Dans d'autres cas, au contraire, une défense active est rapidement induite. Des enzymes d'une voie métabolique spécifique et/ ou des gènes codant pour des protéines spécifiques sont activé(e)s et des substances défensives se détectent. Au cours d'une résistance induite, des produits à activité antibiotique, non décelables chez les plantes saines, s'accumulent rapidement (Grayer et Harborne, 1994). Cette forme de résistance diffère de la résistance préexistante au cours de laquelle, on le rappelle, les produits à activité antibiotique sont déjà présents dans des plantes saines ou leur production résulte d'une conversion à partir de précurseurs.

Les principaux mécanismes de défense activés par l'interaction plante-pathogène, sont dirigés vers le renforcement des parois cellulaires par des composés lignines, tannins..., le blocage du développement des parasites par la production de phytoalexines ou de PR-protéines, et vers la neutralisation ou la destruction des pathogènes par l'induction de glycohydrolases et d'IP. Les parasites établissent aussi des relations très étroites avec la plante hôte en déclenchant une réponse immune au cours d'une résistance systémique acquise.

Le plus souvent, l'attaque des champignons s'accompagne de:

(i) la **libération de toxines**. C'est le cas du champignon parasite et nécrotrophique *Cochliobolus heterostrophus* qui produit une toxine spécifique qui en tuant les cellules permet une invasion hyphale;

(ii) la sécrétion d'un **cocktail d'enzymes hydrolytique et protéolytique** dont la composition varie selon le type d'interaction, selon le pathogène ou la plante impliquée. Pendant la pénétration et/ou pendant les réponses de défense, des enzymes hydrolytiques

lysent les parois du champignon ou de la plante. Les produits libérés qui sont souvent des oligosaccharides peuvent induire, à leur tour, un très grand spectre de réponses de défense. Si la défense de l'hôte n'est plus efficace le pathogène arrive à pénétrer à l'intérieur de la cellule, et le métabolisme de la plante se trouve altéré.

# 3.1. La relation gène-pour-gène

C'est un modèle explicatif du déterminisme génique qui a conduit une plante attaquée par un agent pathogène soit à développer une résistance, soit à exprimer une sensibilité. Selon cette hypothèse, tous les agents pathogènes seraient susceptibles de porter des gènes d'avirulence et toutes les plantes des gènes de résistance (Tableau I), les interactions plantepathogène seraient alors de type incompatible ou compatible selon la capacité de la plante à développer ou non une résistance (Cf. Introduction, A 3.2 et A 3.3).

Tableau I	. La relation	gène-po	our-gène	(d'après	Zaccomer	1995).
		0	0	· · · ·		

	Plante	Plante
Pathogène	RR	rr
AA ou Aa	incompatibilité	compatibilité
aa	compatibilité	compatibilité

R, gène de résistance dominant; r, gène de résistance récessif; A, gène d'avirulence dominant; a, gène d'avirulence récessif; relation compatible, la plante est dans un état de sensibilité ou tolérance vis-à-vis d'agresseur, et l'invasion n'est suivie d'aucun symptôme; relation incompatible, la plante génère une réponse de résistance contre l'invasion parasitaire. Ce modèle de **relation gène-pour-gène** a été souvent utilisé pour décrire les phénomènes de résistance ou de sensibilité des plantes à un agent pathogène ou à différentes souches de cet agent. L'établissement d'une relation gène-pour-gène apparaît comme un système d'alarme particulièrement efficace car en induisant une expression rapide de gènes défensifs, il conditionne l'évolution des plantes vers la résistance.

**3.1.1. Les gènes d'avirulence** sont importants pour la santé et/ou pour la pathogénicité du parasite (Dangl, 1994), mais les fonctions biochimiques de leurs produits demeurent souvent mal connues à part quelques exceptions:

(i) le gène *avrD* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* est connu pour coder un glycolipide à fonction élicitrice;

(ii) des gènes d'avirulence sont impliqués dans la synthèse de signaux protéiques, signaux développant une interaction de type ligand-récepteur avec des produits codés par les gènes de résistance de la plante. Les interactions entre le pathogène, *Cladosporium fulvum*, et les tomates en fournissent un exemple: les gènes avr 4 ou avr 9 codent pour une protéine riche en cystéine reconnue par des récepteurs codés par les gènes de résistance Cf 4 ou 9 de l'hôte; (iii) par ailleurs, le gène *NIP1* de *Rhynchosporium secalis* code pour une protéine de 82 acides aminés se transformant en une protéine de 60 acides aminés qui devient un ligand pour un récepteur codé par le gène *rs1* de l'hôte, l'orge dans ce cas (Rohe *et al.*, 1995).

Le gène d'avirulence peut se transformer dans un gène de virulence par mutation ponctuelle, par délétion ou insertion de nucléotides. En plus, par des recombinaisons intraet intergèniques le pathogène acquiert des nouvelles spécificités pour d'autres hôtes (Yang et Gabriel, 1995). **3.1.2. Les gènes de résistance** occupent des sites différents, le plus souvent sur le même groupe de liaison. Tous les gènes de résistance, à l'exception du gène *Pto* de la tomate, présentent une structure conservée qui code des domaines riches en leucine. Les gènes R en fonction du type de domaine structural codés sont classés en 5 groupes majeurs:

(i) les domaines riches en leucine jouent un rôle dans des interactions protéineprotéine. Ces interactions sont de type enzyme-enzyme inhibiteur (cas de RNase-RNase inhibiteur) ou de type peptide-récepteur (cas de l'hormone gonadotrophine et de son récepteur, cas des produits codés par les gènes Cf 2 de la tomate et de ceux des gènes *avr 2* de *Cladosporium fulvum* (Bent, 1996);

(ii) les domaines Sérine-Thréonine kinases sont impliqués dans la transduction par phosphorylation/ dephosphoralytion d'un signal; les gènes *Pto* de la tomate et *avr Pto* de *Pseudomonas* (Song *et al.*, 1995) en sont des exemples. Pour tous les gènes appartenant à cette classe les domaines impliqués dans la transduction sont hautement conservés avec plusieurs résidus sérine ou thréonine (Hanks *et al.*, 1988);

(iii) les domaines NBS se trouvent dans des protéines qui ont une activité liée à la présence d'ATP ou de GTP; c'est le cas des ATP synthétases, de l'adénylate-kinases, des protéines *ras* (Traut, 1994). Comme exemple de gènes codant pour des protéines ayant des domaines NBS sont les gènes *RPS2* et *RPM1*R d'*Arabodopsis*, *N* de tabac et *C12* de tomate (Mindrinos *et al.*, 1994);

(iv) les domaines " Leucine zipper, LZ " facilitent l'interaction entre protéines; c'est le cas des sous unités  $\beta$  et  $\gamma$  de la protéine G (Hamm et Gilchrist, 1996), ou du gène *Prf* de la tomate qui, en codant pour ce domaine, induit une résistance contre le pathogène *Pseudomonas syringae* (Alber, 1992);

(v) les domaines "Drosophile Toll-Like, DTL". Certains gènes R codent pour un domaine d'acides aminés homologue à celui de la protéine Toll mais aussi à celui des

récepteurs de l'interleukine-1 des Mammifères (Whitham *et al.*, 1994). Certains protéines des plantes ont des homologies avec des peptides antifongiques produites par *Drosophila* (Lemaitre *et al.*, 1996). A ce groupe est rattaché le gène *RPP5R* d'*Arabodopsis* impliqué dans l'activation du facteur de transcription NF-kB. Ce facteur module par SA est connu pour produire des EAO au cours du "burst oxydatif" déclenché par les interactions gène-pour-gène (Dangl *et al.*, 1996).

# 3.2. Réactions compatibles

La relation compatible s'exprime quand le pathogène a contourné le système de défense et arrive à pénètrer dans la plante hôte. Le comportement de l'hôte devient celui d'une plante sensible ou tolérante à l'invasion. Aucune réaction de défense se développent, la plante présente alors les symptômes de certaines maladies. Par exemple, *Fusarium* sp. induit des brunissements au niveau des tissus ou provoque le pourrissement des racines de la plante hôte la pomme-de-terre (Cf. Introduction, B 3.2).

En s'appuyant sur l'hypothèse gène pour gène (Cf. Introduction, A 3.1) la compatibilité s'explique quand l'un, au moins des deux gènes de résistance ou d'avirulence sont **récessifs**, dans ce cas l'absence du signal génère une interaction peu efficace, l'alerte se déclenche plus lentement, l'induction des mécanismes de défense de la plante est retardée ou insuffisante, et l'agent pathogène envahit la plante.

Pendant l'infection le développement et la morphologie du pathogène subit des modifications métaboliques qui lui permet de modifier le flux nutritionnel et d'altérer la croissance et la morphologie de la plante en faveur de sa propre croissance et propagation. En fonction de la stratégie adoptée par des pathogènes, ils se divisent en biotrophiques et nécrotrophiques.

Les pathogènes fongiques, appelé biotrophiques, pénètrent et vivent dans la plante sans activer le système de surveillance. Apparemment, le pathogène produit un facteur de compatibilité (Briggs et Johal, 1994) qui (i) supprime la perception et la transduction du signal dans la plante hôte ou (ii) interfère avec un facteur de susceptibilité codé par un gène de résistance à l'état récessif. Par exemple, les gènes récessifs de résistance du locus *mlo* de l'orge codent un facteur de susceptibilité qui agit sur un facteur de compatibilité produit par *Erisyphe graminis* f. sp. *hordei*.

Les pathogènes nécrotrophiques colonisent seulement des hôtes morts. Pour cela, ils produisent des toxines qui ont des effets sur des protéines (récepteurs ou enzymes) de la plante ce qui perturbe d'une manière irréversible le métabolisme de la plante. *Cochliobolus carbonum* produit une toxine, appelé BZR, à l'aide de laquelle il colonise des hôtes comme le maïs et riz (Johal et Rahe, 1990).

Il y a aussi des pathogènes qui, dans un premier temps, sont biotrophiques et qui après la colonisation, passent à une mode de vie nécrotrophique; l'interaction de *Colletotrichum lindemuthianum* avec son hôte *Phaseolus vulgaris* en est un exemple (Johal et Rahe, 1990).

### 3.3. Réactions incompatibles

La résistance ou l'incompatibilité établie entre une plante et son agresseur se traduit par une réponse de résistance par défaut, appelée aussi résistance générale ou non-hôte. Des mécanismes de résistance limitant ou empêchant la pénétration du pathogène sont rapidement déclenchés en réaction aux tentatives d'infection.

Ces mécanismes se divisent en 2 catégories:

(i) la première ligne de défense est dite passive car elle repose sur des composés préformés;(ii) la deuxième ligne de défense est active car elle correspond à l'induction de réponses

spécifiques. Dans ce cas, il y a une chronologie dans l'apparition des manifestations: les réponses sont précoces et locales avant de devenir SAR et généralisées (Cf. Chapitre 3, A 1). Dans le cas particulier de l'interaction avec *Fusarium*, les réactions de défense rapides se traduisent par le dépôt de callose et d'autres composants de la paroi cellulaire de la plante (Rodriguez-Galvez et Mendgen, 1995), par l'augmentation de ARNm d'enzymes de la voie des phénylpropanoïdes (Ni *et al.*, 1996), ainsi que par la production de PR-protéines (Casacuberta *et al.*, 1992), ou celle de phytoalexines (Rouhier *et al.*, 1995) ou de chitinases (Koga *et al.*, 1992).

Les bases moléculaires de résistance dépendent du génotype du pathogène, mais le degré de virulence dépend du génotype de l'hôte. Ainsi l'interaction entre un gène de résistance dominant de la plante et un gène d'avirulence dominant du parasite génère une réponse de résistance.

Les interactions incompatibles reposant sur les propriétés génétiques du pathogène et de la plante peuvent être, classées en deux catégories:

(i) l'une est représentée par des interactions entre une paire de gènes. La résistance est alors le résultat des interactions entre une plante porteuse d'un gène R dominant et un agent pathogène porteur du gène avr également dominant (Flor, 1971). Dans ce cas, les produits, induits directement ou indirectement, peuvent développer des interactions de type ligand-récepteur et générer rapidement une cascade de signaux, ce qui déclenche des mécanismes de défense de la plante (Cf. Chapitre 3, A);

(ii) l'autre repose sur la capacité de la plante à inhiber l'activation de facteurs de compatibilité fabriqués par le pathogène. Ce facteur de compatibilité devient alors nécessaire au pathogène pour envahir la plante hôte.

Des variétés de maïs résistantes au champignon Helminthosporium carbonum race 1, agent de l'helminthosporiose du maïs-1, le sont grâce à la présence du gène HmI. Il codant

pour une enzyme qui inactive le facteur de compatibilité du champignon, à savoir une toxine (Johal et Briggs, 1992). De même, le gène *RPS3* (ou *RPM1*) d'*Arabidopsis thaliana* code pour un produit qui reconnaît des souches de *Pseudomonas syringae* porteuses des gènes d'avirulence *avrB* et *avrRpm1* (Bisgrove *et al.*, 1994).

# 4. Symbiose

Au cours de l'évolution, les organismes ont dû s'adapter non seulement à leur environnement non-vivant, mais encore aux autres organismes vivants les entourant. Ce défi biologique a été satisfait quelquefois par l'acquisition de propriétés particulières permettant à son possesseur d'occuper une "niche" physico-chimique particulière dans le milieu. C'est le phénomène biologique connu sous le nom de **symbiose**. Donc les pathogènes et les plantes qui ont mis en route des stratégies pour se combattre peuvent, à l'opposé, développer des stratégies bénéfiques pour tous les deux, et ce sont les interactions de type symbiotique.

Parmi les organismes qui se sont adaptés à l'existence en s'associant étroitement avec d'autres, on trouve des micro-organismes entrés en symbiose mutuelle avec les plantes ou avec les animaux. C'est le premier aspect de symbiose qui sera surtout développé ici mais les organismes supérieurs pratiquent eux aussi ce genre d'adaptation. Les ruminants, groupe de mammifères qui comprennent les bovidés, les moutons, les chèvres, les chameaux et les girafes, sont des animaux qui broutent de l'herbe ou d'autres fourrages verts, dont le principal constituant est la cellulose. Aucun mammifère ne disposant des enzymes capables de dégrader la cellulose, le ruminant a contourné ce désavantage qui le prive d'une source énergétique en s'associant avec des micro-organismes qui eux peuvent dégrader la cellulose. Parmi les interactions les plus étudiées de symbiose entre micro-organismes et plantes figurent celles développées entre les bactéries ou champignons et les plantes.

# 4.1. Symbiose Légumineuses-Rhizobiacées

La croissance de la plupart des plantes est strictement limitée par la quantité d'azote combiné du sol, ce qui n'est pas le cas des Légumineuses. Si les Légumineuses sont cultivées dans un sol pauvre en azote, l'analyse de l'azote total révèle qu'il se produit une augmentation de l'azote fixé. La famille des Légumineuses regroupe de nombreuses plantes d'intérêt économique parmi lesquelles, la luzerne, la vesce, le trèfle, le soja, le haricot, le pois des plantes qui ont la particularité de s'associer avec des bactéries fixatrices d'azote *Rhizobiaceae* (*Rhizobium, Azorhizobium, Bradyrhizobium* et *Sinorhizobium*).

Ces bactéries "Gram-négatif" et aérobies peuvent établir une symbiose avec des Légumineuses en induisant la formation, chez leur hôte, d'excroissances racinaires ou **nodules** à l'intérieur desquelles elles fixent l'azote. Cette interaction est spécifique car chaque bactérie a un spectre déterminé d'hôtes. Par exemple, *Rhizobium meliloti* n'infecte que la luzerne, alors que le pois, le soja ou le haricot sont infectés et nodulés respectivement par *Rhizobium leguminosorum* var viciae, Bradyrhizobium japonicum ou Rhizobium phaseolus (Dénarié et al., 1996).

Durant les étapes précoces de la symbiose, les deux partenaires échangent des signaux permettant aux bactéries, jusque là saprophytes du sol, de pénétrer dans les poils absorbants de la racine de la plante et de se différencier en bactérioles capables de fixer l'azote atmosphérique (Figure 5).

Les principaux signaux impliqués au cours de cette symbiose ont été identifiés à des flavonoïdes, à des lipooligosaccharides ou facteurs Nod et à des  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-<u>D</u>-glucanes (Cf.

Chapitre 1, A 2). Ainsi, au cours de la symbiose, divers composés phénoliques de type flavone, chalcone, isoflavonoïde issus de la voie des phénylpropanoïdes de la plante sont excrétés par les racines de la plante. Reconnus par les *Rhizobiaceae*, ils induisent l'activation de gènes *nod*. L'expression de ces gènes est contrôlée par un facteur de transcription la protéine Nod D qui, lorsqu'elle est activée par un flavonoïde spécifique, se fixe sur des promoteurs particuliers appelés "*nod-box*", ce qui entraîne la transcription d'autres gènes *nod*. Ainsi les gènes *nod A*, *nod B*, *nod C* codent pour des enzymes impliquées dans la construction du squelette chito-oligosaccharidique, et de chaînes aliphatiques (Mergaert *et al.*, 1995), tandis que les gènes *nod H*, *nodP* et *nod Q* déterminent la sulfatation du facteur Nod (Roche *et al.*, 1995).

### 4.2. Autres exemples de symbiose plantes-micro organismes

Il s'agit de symbioses (i) de type *Actinorhizale* développée entre les champignons actinomycètes de la famille *Frankia* et des plantes supérieures non-légumineuses (Benson, 1988), les plantes *Atriplex cordobensis* (Fabri *et al.*, 1996) et *Casuarina glauca* (Diouf *et al.*, 1995) en sont des exemples; (ii) de type *Mycorhizale* ou *Mycorrhizale* où par exemple, une interaction de type mycorrhizale est établie entre le champignon *Glomus versiforme* et les racines de *Medicago truncatula* (Harrison, 1996). La symbiose est de type endomycorrhizale quand le champignon pénètre dans les racines et migre vers les cellules corticales, les racines gardant un aspect normal. La symbiose est de type ectomycorrhizale quand les hyphes entourent les racines (Taylor et Bruns, 1997). Dans ce cas les parasites confèrent à la plante une protection contre d'autres parasites et lui permettent d'augmenter l'absorption des substances nutritives (Wei et Wang, 1991).



Figure 5. Communication chimique développée au cours de la symbiose de *Rhizobium* meliloti avec des légumineuses

# B. Généralités sur les champignons

# 1. Distribution taxonomique

Les champignons sont des Eucaryotes non photosynthétiques ayant plus de 80 000 espèces. La plupart sont des organismes coenocytiques possédant une structure végétative nommée mycelium. Celui-ci est un système ramifié de tubes rigides à parois constituées de polysaccharides (chitine, chitosane,  $\beta$ -glucanes etc...). La taille d'un mycelium n'est pas limitée: en effet, aussi longtemps que des aliments sont disponibles, la croissance périphérique peut se poursuivre par extension des hyphes, et chez certains Basidiomycètes, un seul mycelium peut même atteindre 15 mètres de diamètre.

Les champignons se classent en champignons primitifs (*Phycomycètes*), et en champignons supérieurs (*Ascomycètes*, *Basidiomycètes*, *Deuteromycètes*).

La taxonomie de *Fusarium* est confuse et sujette aux controverses (Nelson *et al.*, 1994). En effet, plusieurs espèces demandent des conditions particulières pour exprimer entièrement leur morphologie et d'autres tendent à muter rapidement. De plus, plusieurs des différences répertoriées entre les espèces sont subtiles car elles restent qualitatives. Le genre *Fusarium* est maintenant considéré comme un genre anamorphe qui se rapporte aux Hypocréales (Ascomycètes). La classification retenue dans le **tableau II** provient de la banque de données NCBI. Les formes sexuées (téléomorphes) du champignon *Fusarium* appartient au genre *Nectria* et elles se caractérisent par la production de conidies visqueuses, hyalines, cloisonnées, De plus, quelques espèces produisent des conidies manifestement différentes dans le mycelium aérien selon l'espèce et/ou l'environnement. La plupart des

espèces de *Fusarium* présentées ici sont considérées comme cosmopolites et peuvent être isolées à peu près n'importe ou dans le monde.

**Tableau II**. La taxonomie du genre Fusarium oxyporum, d'après la banque de donnéesNCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Eukariotes

Champignons supérieurs Deuteromycètes Ascomycètes Euascomycètes Pyrenomycètes Hypocerealis Nectriaceae Fusarium •Fusarium arthrosporioides •Fusarium bactridioides •Fusarium beomiforme •Fusarium buharicum •Fusarium camptoceras •Fusarium cerealis •Fusarium culmorum •Fusarium dimerum •Fusarium dlaminii •Fusarium equiseti •Fusarium flocciferum •Fusarium guttiforme •Fusarium heterosporum •Fusarium inflexum •Fusarium larvarum •Fusarium lateritium •Fusarium lunulosporum •Fusarium merismoides •Fusarium napiforme •Fusarium nivale •Fusarium nygamai •Fusarium oxysporum •Fusarium oxysporum f. sp. albedinis •Fusarium oxysporum f. sp. batatas •Fusarium oxysporum f. sp. canariensis •Fusarium oxysporum f. sp. ciceris •Fusarium oxysporum f. sp. cubense •Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum •Fusarium oxysporum f. sp. dianthi •Fusarium oxysporum f. sp. erythroxyli •Fusarium oxysporum f. sp. glycines •Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici •Fusarium oxysporum f. sp. melonis •Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae •Fusarium oxysporum f. sp. perniciosum •Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici •Fusarium oxysporum f. sp. tuberosi •Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum
(continuation du Tableau II)

•Fusarium phyllophilum •Fusarium poae •Fusarium polyphialidicum •Fusarium proliferatum •Fusarium pseudonygamai •Fusarium redolens •Fusarium robustum •Fusarium sacchari •Fusarium scirpi •Fusarium semitectum •Fusarium setosum •Fusarium sporotrichioides •Fusarium subglutinans •Fusarium succisae •Fusarium torulosum •Fusarium tricinctum •Fusarium tumidum •Fusarium udum •Fusarium venenatum •Fusarium verticillioides •Fusarium sp.

### 2. Caractéristiques cytologiques et biochimiques

Les parois cellulaires du champignon, situées entre la membrane plasmique et l'environnement externe, satisfont à un grand nombre de fonctions vitales. Ce sont des structures dynamiques qui jouent un rôle fonctionnel et structural important. En effet, la **paroi cellulaire** (i) constitue une barrière maintenant la forme cellulaire et empêchant la destruction de la cellule par une entrée incontrôlée d'eau; (ii) est une barrière physique en isolant la cellule du milieu extérieur et en lui offrant une protection contre les radiations UV,  $\gamma$  et X, contre les enzymes lytiques et les ions lourds. Les champignons se protègent contre des enzymes lytiques à l'aide de la mélanine (qui dissipe l'énergie des radiations en créant des radicaux libres) ou à l'aide d' $\alpha$ -glucanes (qui forment un complexe irréversible); (iii) intervient dans la migration des composés entre la cellule et le milieu extérieur ; (iv) possèdent des enzymes, qui transforment les substances nutritives en métabolites ainsi métabolises par la cellule; (v) est une structure dynamique. Le dynamisme de la paroi est conditionnée par différentes enzymes, par exemple les exo- ou endo- $\beta$ -<u>D</u>-glucanases aident à l'insertion de nouveaux polymères; (vi) est une source des macromolécules dont certaines sont à fonction signalitique (polysaccharides, glycoprotéines, oligosaccharides, etc...) (Cf. Chapitre 1, A 2).

En ce qui concerne leur **composition chimique**, les parois cellulaires des champignons renferment 80 à 90% de polysaccharides, le reste étant constitué de protéines, de lipides et de mélanines. Une grande partie des polysaccharides, homo- ou hétéropolymères, sont sous forme de microfibres s'enroulant les unes autour des autres pour constituer des fibres solides. Le réseau ainsi constitué est emprisonné dans des agrégats amorphes et granuleux composés par des polysaccharides moins longs, des protéines et des lipides. Cette organisation peut d'ailleurs expliquer la rigidité et la solidité des parois.

Les données connues sur la composition en polysaccharides des parois cellulaires des champignons ont été rassemblées par Bartnicki-Garcia (1968) et revu par Cabib *et al.* (1988). Leurs travaux indiquent que les champignons d'une même classe renferment les mêmes polysaccharides au sein de leurs parois, et que les composants macromoléculaires de la paroi des champignons se divisent, en général, en deux groupes:

(i) un groupe insoluble, formant le squelette de la paroi cellulaire, et ayant comme composants majeurs des polymères de chitine et de  $\beta$ -glucanes liés entre eux par des liaisons covalentes (Sietsma *et al.* 1979). La chitine, formée par des feuilles  $\beta$  antiparallèles, est un homopolymère de résidus *N*-acétyl glucosamine liés par des liaisons  $\beta$ -<u>D</u>-(1 $\rightarrow$ 4)-glycosidique (Figure 15 b) et dont la synthèse résulte d'une activité chitine-synthase liée au plasmalemme est admettant comme accepteur un UDP- $\beta$ -<u>D</u>-*N*-acétyl glucosamine. Le  $\beta$ -glucane est un homopolymère de résidus <u>D</u>-glucose liés par des liaisons  $\beta$ -<u>D</u>-(1 $\rightarrow$ 3) avec des ramifications  $\beta$ -<u>D</u>-(1 $\rightarrow$ 6) (Figure 15 a). Il y a trois types de  $\beta$ -<u>D</u>-glucanes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , les champignons renfermant le premier type. La réaction est catalysée par une (1,3)  $\beta$ -<u>D</u>-glucane synthase qui a l'UDP- $\beta$ -<u>D</u>-glucose comme accepteur. Le nombre de ramifications  $\beta$ -<u>D</u>-(1 $\rightarrow$ 6) est directement proportionnel au degré de la solubilité;

(ii) le groupe soluble, qui forme la matrice cellulaire, est représenté en grand partie par des glycoprotéines et des  $\alpha$ -glucanes et, en quantité plus faible, par des polyuronates, du chitosane, des lipides et des mélanines. Les mannoprotéines sont des protéines glycosylées par des glycannes de type oligomannosique (polymère de résidus <u>D</u>-mannose liés  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) avec des branchements  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) et  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3). Parmi les *N*- et *O*-glycannes, le type *N*glycanne est le plus répandu. Les résidus oligomannosides peuvent présenter des groupements phosphate, et ne sont pas tous en position terminale, des résidus glucose, Nacétyl- $\beta$ -<u>D</u>-glucosamine étant très souvent terminaux. Les  $\alpha$ -glucanes trouvés dans les parois de champignons sont de type S (soit un homopolymère de glucose  $\alpha$ -<u>D</u>-(1 $\rightarrow$ 3)), ou de type "nigerian" (soit un homopolymère de glucose lié  $\alpha$ -<u>D</u>-(1 $\rightarrow$ 3) et  $\alpha$ -<u>D</u>-(1 $\rightarrow$ 4)).

Dans le cas de *Fusarium oxysporum* sp., comme d'ailleurs dans la plupart des champignons, la composition des parois cellulaires, formée par polysaccharides, glycoprotéines, protéines, montre une grande diversité. Par exemple, *Fusarium* possède plusieurs types de carbohydrates neutres ou chargés (D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-rhamnose, acide D-glucuronique...) qui entrent dans la composition des oligo-, polysaccharides (Bruneteau, 1992), et/ou dans la partie glycannique de glycoprotéines (Jikibara *et al.*, 1992a). La plupart des *O*-glycannes dérivés de ces glycoprotéines présentent une structure très diversifiée (Jikibara *et al.* 1992b; Iwahara *et al.*, 1992; Iwahara *et al.*, 1995) car ils sont représentés par des polysaccharides, et par des oligosaccharides acides ou neutres (Cf. Chapitre 3, A 2).

### 3. Pathologies induites par les champignons

Puisque les Champignons sont toujours limités par une paroi rigide, ils sont capables d'englober de plus petits micro-organismes ou bien ils absorbent leurs aliments sous forme dissoute. La plupart vivent indépendants, dans le sol ou dans l'eau, en tirant leur énergie de la respiration ou de la fermentation de matériaux organiques présents dans leur milieu. Certains sont des parasites d'animaux ou de végétaux supérieurs, d'autres sont des prédateurs car ils ont réalisé des pièges ingénieux grâce à des hyphes spécialisées dans la capture de *Protozoaires* et de petits Invertébrés comme des Nématodes du sol. Après la mort de la proie, les champignons envahissent l'intérieur de leur prise et en absorbent les éléments nutritifs. La plupart des champignons attaquent et contrôlent leur hôte par des produits métaboliques appelé **mycotoxines** (Bruckner *et al.*, 1989).

### 3.1. Pathologies chez les animaux

La plupart des champignons saprophytes sont inoffensifs pour des individus sains, mais ils peuvent causer de sérieux problèmes chez ceux qui ont un système immunitaire affaibli. Souvent les spores ou les métabolites de champignons sont les principales causes des maladies.

Généralement, chez les mammifères, les champignons génèrent des **mycoses** qui ne sont pas contagieuses, mais elles deviennent mortelles quand elles sont répandues dans tout l'organisme. C'est le cas (i) des mycoses systémiques ou profondes atteignant les organes internes et dont les causes principales sont l'inhalation de spores; (ii) des mycoses souscutanées atteignant la peau, le tissu sous-cutané et l'os. Des spores ou des fragments du mycelium provenant de champignons du sol ou dans la végétation pénètrent via des blessures, ce qui facilite la dissémination de la mycose; (iii) des mycoses cutanées touchant l'épiderme, les cheveux et les ongles. Les dermatites développées chez l'homme sont générées par des champignons du sol comme *Microsporum gypseum*; (iv) des mycoses superficielles atteignant les cheveux et les couches supérieures de l'épiderme.

*Fusarium* est pathogénique pour les humains ou les animaux par à cause de ses métabolites (pigments, mycotoxines, phytotoxines, enzymes extracellulaires...) ingérés avec la nourriture. Certaines toxines de *Fusarium* génèrent des infections chez des patients neutropèniques (Walsh, 1996), ou ayant une déficience immunitaire (Summerbell, 1988) ou provoquent des complications à des patients transplantés de la moelle (Bleggi-Torres, 1996). En ce qui concerne *Fusarium*, il induit des kératites ophtalmiquesdes mycoses bronchopulmonaires (Backman *et al.*, 1995), des mycoses profondes (Poirot *et al.*, 1985), ou disséminées (Melcher *et al.*, 1993)...etc. Des cultures de *Fusarium oxysporum* induisent, chez les poules, mais aussi chez l'homme des dyschondroplasies (Chu, 1996). D'autres mycotoxines (moniliformine, acide fusarique, fusarine, fusariocine, fumonisine, zearaleone et trichothecènes...) sont carcinogènes et peuvent révéler, une toxicité très élevée. C'est le cas de la fumonisine, isolée de *Fusarium moniliforme* qui bloque le métabolisme sphingolipidique (Riley, 1996).

### 3.2. Pathologies chez les végétaux

Les pertes agricoles dues à des agents pathogènes bactéries, virus et champignons sont considérables. On a estimé que parmi les 50.000-200.000 espèces de champignons qui sont, pour la plupart, saprophytes, 10 % seulement peuvent coloniser les plantes et causer des maladies (Knogge, 1996). Les symptômes généraux à relier aux infections fongiques sont des chloroses, des nécroses, des fléchissements foliaires, des brunissements de tissus, des pourrissements de racines, donc des pathologies qui entraînent la mort de la plante à la fin. La plante meurt parce que ses cellules ont un métabolisme perturbé sous l'action d'enzymes lytiques et/ou des métabolites secondaires (caroténoides, bikavérines, mycotoxines, phytotoxines, and oestrogènes) (Bruckner *et al.*, 1989). Les interactions entre les plantes et les micro-organismes pathogènes peuvent, d'une manière indirecte, affecter la santé des hommes. Ainsi les toxines de la farine de seigle contaminée par le champignon *Claviceps purpurea*, provoquent chez l'homme des hallucinations, de la fièvre, de la gangrène, des fausses couches et finalement la mort (Jackson *et al.*, 1996).

*Fusarium* peut attaquer un large spectre de plantes car il a un mode de pénétration directe à travers la cuticule et/ou via les stomates (Parry et Pegg, 1985). La pénétration est réalisée souvent à l'aide d'hydrolases fongiques (pectinases, glucanases, et xylanases) qui lysent la cellule végétale (Benhamou *et al.*, 1990, Alconada *et al.*, 1995, Christakopoulos *et al.*, 1996).

*Fusarium oxysporum* induit des pertes importantes chez la plupart de céréales. Par exemple, *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* envahit la plante par le xylème en provoquant, ensuite l'affaiblissement de la croissance et de la production. Les champignons de la famille de *Fusarium* sp. provoquent, chez les céréales, des brunissements au niveau des racines, et des tiges ou ils provoquent le pourrissement des racines chez les pomme-de-terre (Vesonder et Hessltine, 1981).

### C. Objectifs de recherche. Plan de travail

Dans le cadre de cette thèse, la recherche a été centrée sur l'étude de signaux oligosaccharidiques à fonction élicitrice isolés du mycelium de Fusarium oxysporum sp.

Par signal éliciteur d'origine fongique, on désigne ici toute molécule ou mélange de molécules fongique(s) ayant un potentiel biologique qui aura été matérialisé par l'induction des réactions physiologiques chez une plante.

En ce qui concerne la partie expérimentale, il s'agissait d'isoler, à partir d'extraits bruts provenant du mycelium fongique, des fractions renfermant des signaux éliciteurs donc vecteurs d'information biologique pour le végétal.

Pour ce faire, une approche pluridisciplinaire a été développée car il a fallu, à la fois, résoudre des problèmes liés à l'identification de structures chimiques et analyser le potentiel biologique de produits isolés.

En ce qui concerne le potentiel biologique, on a retenu, parmi plusieurs marqueurs de réactions de défense des plantes qui avaient été détectés, celui qui était le meilleur pour sa spécificité et/ ou pour l'intensité de la réponse physiologique déclenchée.

La caractérisation biochimique de ce marqueur et/ou l'étude de certaines étapes de transduction du signal éliciteur impliquées dans son expression ont été abordées.

Dans le **chapitre 1**, nous rapportons **le travail préparatoire** suivant: nous avons isolé, d'une poudre acétonique issue du mycelium de *Fusarium oxysporum* sp., plusieurs fractions en retenant l'hypothèse que l'éliciteur serait lié à la présence d'un oligosaccharide ou d'un polysaccharide ou d'une glycoprotéine. Des fractions fongiques ont été préparées, et purifiées, et elles ont été testées pour leur capacité biologique sur des suspensions de cellules et/ou protoplastes provenant de ronce (*Rubus fruticosus* L.). Des réponses physiologiques précoces relevant d'un traitement éliciteur de courte durée (quelques minutes, moins d'une heure) ont été recherchées. Des marqueurs de défense ont été retenus comme des enzymes  $\beta$ -<u>D</u>-glycanases ou des enzymes du métabolisme phénolique, ainsi que des changement d'activité d'IP ou des variations du potentiel rédox du plasmalemme.

On a ainsi sélectionné des fractions biologiquement actives, c'est à dire des fractions qui, utilisées à une échelle micro-analytique pendant des temps courts (le plus souvent de l'ordre de 30 min) étaient capables d'activer des marqueurs de défense dans les cellules ou des protoplastes.

Dans le chapitre 2, nous rapportons le travail d'analyse structurale suivant: nous avons centré notre intérêt sur des fractions biologiquement actives, soit des fractions glycoprotéiniques, soit des fractions oligosaccharidiques. Le but du travail a été d'identifier, sur un plan structural, certains des composants glycanniques de ces fractions. L'analyse d'oligosaccharides, ou d'O- ou N-glycannes a reposé sur l'utilisation des techniques de chromatographie liquide à haute performance, de résonance magnétique nucléaire du carbone 13 et de l'hydrogène 1, de la spectrométrie de masse par bombardement rapide d'atomes, ainsi que de la chromatographie en phase gazeuse couplée ou non à la spectrométrie de masse.

#### Ce travail a conduit à l'identification structurale

(i) d'oligomères de résidus  $\alpha$ -<u>D</u>-mannose et  $\alpha/\beta$ -<u>D</u>-glucose liés (1 $\rightarrow$ 2) ou (1 $\rightarrow$ 4), soit le disaccharide,  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha/\beta$ -<u>D</u>-Glcp, soit le trisaccharide,  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (1 $\rightarrow$ 4)  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha/\beta$ -<u>D</u>-Glcp;

(ii) d'O-glycannes (DP 8-10) d'une glycoprotéine B1 qui majoritairement présentent des résidus de  $\alpha$ -D-Glcp,  $\alpha$ -D-GlcA,  $\beta$ -D-Galf ou  $\alpha$ -D-Manp liés (1 $\rightarrow$ 2), (1 $\rightarrow$ 4) ou (1 $\rightarrow$ 6).

Dans le chapitre 3, nous rapportons le travail de biochimie focalisé sur deux marqueurs de réactions précoces, à savoir l'induction d'une activité PAL, et celle d'un "burst" oxydatif. Ces marqueurs sont les réponses induites soit par des fractions préparées à partir de glycoprotéines isolées de *Fusarium* sp. *M*7-1 fournies par le Professeur Shojiro Iwahara (Kagawa University, Faculty of Agriculture, Miki-Cho, Kagawa-Ken Japan), soit par des fractions isolées de *Fusarium oxysporum* sp.

En particulier, nous avons analysé et caractérisé la production d'EAO, et l'induction des activités PAL et acide caféique: COMT.

Dans le premier cas, la production d'anion superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène, la consommation d'oxygène ont été quantifiées au cours du traitement éliciteur. Dans le deuxième cas, notre intérêt a porté sur la caractérisation de la réponse PAL et sur l'identification des produits réactionnels d'un complexe PAL. Cette identification a reposé sur l'utilisation de la technique HPLC couplée à une détection via un détecteur PAD.

Dans la partie Conclusions et Perspectives se dégagé le développement du travail sur 3 directions majeures.

(i) analyse des structures chimiques de composants de signaux présentants une activité biologique; (ii) caractériser l'étape de reconnaissance du signal éliciteur par des protoplastes végétaux ainsi qu'envisage des (iii) retombées biotechnologiques.

En effet, la plupart des recherches portent sur l'identification des structures chimiques actives ou sur l'étude de l'expression des gènes impliqués dans les réponses d'élicitation, et les mécanismes moléculaire à la base de la reconnaissance et de la transmission intracellulaire des signaux éliciteurs.

# **MATERIELS ET METHODES**

### A. Matériels

### 1. Matériel végétal

Les suspensions cellulaires utilisées sont des cellules de *Rubus fruticosus L*. obtenues à partir de cals selon la technique mise au point par Hustache *et al.* (1975); elles sont actuellement entretenues au CERMAV par M.F. Marais. Des milieux de culture (Heller, 1953) sont ensemencés avec 20 mL de suspension cellulaire (3 g de matière fraîche) et des inocula sont prélevés en fin de phase exponentielle de croissance. Les fioles de culture, placées sur une table d'agitation (AS 850 Biolafitte) tournant à 75 rpm dans une pièce à 25°C, sont exposés à la lumière (2000 lux pendant 12 h, par intervalles de 24 h). Pour les expériences d'élicitation, les cellules sont prélevées en phase exponentielle de croissance, soit 18-22 jours après la mise en culture de l'inoculum (Figure 6).



Figure 6. Courbe de croissance de la souche *Rubus fruticosus* L. cultivée en suspension cellulaire.

## 2.1. Préparation des fractions oligosaccharidiques, glycolipidiques et glycoprotéiques issues de *Fusarium* oxysporum sp.

Par broyage du mycelium de *Fusarium oxysporum* sp. on a obtenu une poudre. Après déshydratation, elle a fait l'objet d'extractions successives à froid en présence d'acétone réalisées jusqu'à la décoloration totale du surnageant récupéré par centrifugation (10 min à 4000 g). On a obtenu (i) une **fraction insoluble** à l'acétone, appelée "**fraction protéique**", qui a été séchée à l'air à la température ambiante et qui a été soumise à d'autres expériences de fractionnement et purification (pour des détails, voir Chapitre 1, B 2.2) et (ii) d'autre part, une **fraction soluble** dans l'acétone, appelée "**fractions glycolipidique**" qui a été fractionnée en 3 temps selon la technique de Folch *et al.* (1957) (pour des détails voir Chapitre 1, B 2.1).

Des composants glycoprotéiques et oligosaccharidiques de ces fractions ont été utilisées à différentes concentrations comme signaux dans des processus d'élicitation.

### 2.2. Préparation des O-glycannes isolés de Fusarium sp M7-1

Des fractions des O-glycannes isolées de Fusarium sp M7-1 et préparées dans le groupe de Dr. Iwahara Shojiro (Faculté d'Agriculture, Université Kagawa, Japon) ont été utilisées comme signaux éliciteurs. En bref, des glycoprotéines isolées à partir du mycelium de Fusarium sp M7-1 (Jikibara *et al.* 1992a) ont été soumises à un traitement alcalin en présence de NaBH<sub>4</sub>. Les O-glycannes libérés ont été séparés, en fonction de leur charge, par chromatographie d'échanges ions sur des colonnes de Dowex 1 x 2 ( $CO_3^{2-}$ ) et Dowex 50 (H<sup>+</sup>), ils ont été ensuite analysés en spectrométrie de masse (SM-FAB) et RMN.

Des polysaccharides acides appelés (**Ja**), des oligosaccharides neutres appelés (**Jb**) et des oligosaccharides acides appelés (**Jc**) issus de *Fusarium* sp M7-1 (pour plus des détails voir Chapitre 3, A 2) ont été utilisés comme signaux d'élicitation.

#### 2.3. Substrats et effecteurs

<u>L</u>-Phe et BAPNA (Sigma, St. Quentin-les-Yvelines, France) sont les substrats respectifs de la PAL et de protéases, trypsine,  $\alpha$ -chymotrypsine ou papaïne. Les substrats pour les activités glycohydrolases sont la laminarine, l'amidon soluble et l'acide polygalacturonique (Sigma, St. Quentin-les-Yvelines, France). Cycloheximide (Sigma, St. Quentin-les-Yvelines, France) a été utilisée comme inhibiteur de traduction.

Pour l'étude du burst oxydatif on a utilisé la pyranine (8-hydroxypyrène-1,3,6acide trisulfonique), la CAT, le Cyt c, le tampon PBS, la SOD, l'acide linoléique, l'acide stéarique, la PLA<sub>2</sub> et le SHAM (Sigma, St. Quentin-les-Yvelines, France).

#### 2.4. Divers

Les enzymes (Caylase 345, Caylase M3) utilisées pour la dégradation des parois des cellules de *Rubus* en vue d'obtenir des protoplastes proviennent de Cayla (Toulouse, France). Le Ficoll type 400 entrant dans la composition du milieu de suspension des protoplastes vient de Sigma. Les résines de type Dowex ( $H^+$ ,  $CO_3^2$ ) provenant de Fluka ont été utilisées dans l'extraction de la PAL et dans des processus de séparation.

Le réactif BSTFA (Fluka) a été utilisé dans l'analyse de produits triméthylsylilés par CPG.

Les standards phénoliques chromatographiques sont les composés aldéhyde salicylique (Sigma), vanilline (Fluka) et l'acide *t*-cinnamique (Sigma) et l'acide férulique (Fluka).

### **B. MÉTHODES**

### 1. Préparation des protoplastes

Les protoplastes sont préparés à partir de 40 g de cellules fraîches de *Rubus* âgées de 18 jours temps qui correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance. Les cellules (100-200  $\mu$ m) sont filtrées sur toile à bluter de 100  $\mu$ m, rincées avec du milieu de Heller, reprises dans 300 mL de milieu de culture enrichi en mannitol (0,56 M) et en saccharose (0,06 M), renfermant 0,25% (p/v) de Caylase 345 (provenant de *Trichoderma* et possédant des activités cellulasique et hémicellulasique) et 0,01% (p/v) de Caylase M3 (mélange de pectinases extrait de *Penicillium occitanis*). Elles sont incubées pendant une nuit à température ambiante et les protoplastes libérés sont recueillis par filtration sur toile à bluter de 100  $\mu$ m et centrifugés à 4°C (100 g, 8 min). Le culot est repris dans le milieu précédent sans Caylase et enrichi par 6% (p/v) de Ficoll type 400 (Sigma). Après centrifugation à 4°C (100 g, 8 min), les protoplastes repris dans le même milieu sans Ficoll, sont récupérés par centrifugation à 4°C (100 g, 8 min) (Figure 7).



Figure 7. Protoplastes obtenus à partir de cellules de *Rubus fruticosus* L. âgées de 18 jours (Cliché thèse Patier, CERMAV 1990).

### 2. Expériences d'élicitation

# 2.1. Conditions expérimentales pour des protoplastes en suspension

 $2.10^{6}$  protoplastes sont incubés pendant des temps variables (de 0 à 30 h) à température ambiant, sous agitation circulaire, dans 25 mL de tampon Bis-Tris-HCl (25 mM, pH 4,8) renfermant 0,06M de saccharose, 0,56 M de mannitol, 10 mM de CaCl<sub>2</sub> et 10 mM de KCl, en présence ou non d'un signal éliciteur, soit une fraction isolée de *Fusarium oxysporum* sp. (Cf. Chapitre 1, B 2.2), soit une fraction isolée de *Fusarium* sp. M7-1 (Cf. Materials et Methodes, A 2.2). Le signal a été utilisé à différentes concentrations en présence ou non d'un effecteurs. A la fin de l'expérience, les protoplastes recueillis par centrifugation (150 g, 10

min) sont repris dans un tampon spécifique en fonction du marqueur biologique que l'on veut extraire et analyser.

### 2.2. Conditions expérimentales pour des cellules en suspension

 $4.10^{6}$  cellules sont incubées en présence de l'éliciteur dans les conditions détaillées cidessus à l'exception du tampon d'élicitation remplaçé par un tampon citrate de sodium (0,1 M, pH 5,9) contenant du saccharose (0,06 M) et du MgCl<sub>2</sub> (3 mM).

### 2.3. Contrôles

Le comptage des protoplastes (cellules) est effectué dans une cellule de Neubauer (Bioblock) à l'aide d'un microscope photonique.

La viabilité des protoplastes (cellules) est contrôlée au cours des expériences d'élicitation selon Kanai et Edwards (1973): 20 µL de Bleu d'Evans à 1% (p/v) sont additionnés à 200 µL d'une suspension de protoplastes (cellules) et le pourcentage de protoplastes (cellules) vivant(e)s est donné par le nombre de protoplastes (cellules) non coloré(e)s pour 100 protoplastes (cellules) compté(e)s. Pour chaque contrôle de viabilité, 2000 protoplastes sont comptés. Toutes les expériences d'élicitation sont effectuées avec des suspensions renfermant au moins 85-90% de protoplastes vivants ou 90-95% de cellules vivantes.

### 3. Activité PAL (E.C: 4.3.15)

### 3.1. Extraction enzymatique

L'extraction de PAL à partir de cellules ou de protoplastes élicité(e)s se fait selon le protocole de Hagendoorn *et al.* (1991) modifié. En bref, après le traitement éliciteur, l'extrait enzymatique est préparé à 4°C par sonication [Vibracell<sup>TM</sup> (Bioblock), puissance 70 W, 2 × 60 sec] des protoplastes (cellules) élicité(e)s ou non dans un tampon Tris-HCl (0,1 M, pH 8,8) renfermant du dithriotréitol (2 mM). L'homogénat est centrifugé à 5 000 g pendant 15 min à 4°C, puis le surnageant est mélangé avec 100 mg de Dowex 50 x 8 (25/50 mesh, Fluka) à 4°C avant d'être centrifugé à 5 000 g pendant 15 min à 4°C. Le dernier surnageant collecté est mélangé avec 100 mg de PVPP (Fluka) pendant 5 min à 4°C et ensuite dialysé sur unités Ultrafree<sup>TM</sup> (Millipore) dont les membranes ont un seuil de coupure de 10 kDa. Le dialysat constitue l'extrait brut PAL.

### 3.2. Dosage de l'activité PAL

Le dosage des extraits PAL, réalisé selon Zucker *et al.* (1965), repose sur la quantification à 290 nm de l'acide *t*-cinnamique formé après désamination de <u>L</u>-Phe. Les cinétiques ont été suivies pendant 30 min à 40°C (Figure 8 A), à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU 640, dans un milieu de réaction tamponné par du borate (0,1 M, pH 8,8) renfermant l'extrait enzymatique (équivalent à 6  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> protéine) et le substrat <u>L</u>-Phe à une concentration optimale de 2,25 mM (Figure 8 B).

Des témoins sans substrat, sans enzyme ou avec des enzymes dénaturées par choc thermique ont été aussi réalisés.



Figure 8. Cinétique PAL. En A, exemples de cinétique d'extraits PAL isolés de  $4.10^6$  cellules ou  $2.10^6$  protoplastes de *Rubus* élicité(e)s (courbe b) ou non traité(e)s (courbe a) par un signal fongique. Les cinétiques sont suivies à 290 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU 640, pendant 30 min à 40°C en présence de 2,25 mM <u>L</u>-Phe. En B, courbe de dose-dépendance de l'activité Pal en fonction de la concentration en substrat <u>L</u>-Phe (1 à 3 mM). Une valeur sur un graphe correspond au traitement des données relatives à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets indépendants d'élicitation.

### 3.3. Analyse des données

La vitesse de la réaction enzymatique ( $\Delta A_{290}$ min<sup>-1</sup>) correspondant à la pente à l'origine de la courbe de cinétique, déduite par régression linéaire des données expérimentales à partir du logiciel Excel, quantifie l'activité PAL. L'activité PAL est exprimée en µkat (kg protéine)<sup>-1</sup>, 1 µkat représentant 1 µmole de produit réactionnel formé en 1 seconde. La réponse d'élicitation est ainsi mesurée par l'activation PAL exprimée par R qui est le rapport de l'activité dans les protoplastes (cellules) élicité(e)s sur l'activité dans le témoin (cellules ou protoplastes non traité(e)s). 4 courbes de cinétique, au moins, ont été développées par échantillon provenant de 3 sets indépendants d'élicitation.

### 3.4. Extraction des produits réactionnels PAL

Des cinétiques enzymatiques sont développées pendant 4 heures en présence de l'extrait PAL (équivalent à 6  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de protéines) provenant de protoplastes (cellules) élicité(e)s et du substrat <u>L</u>-Phe (2,25 mM). La cinétique est arrêtée en ajoutant 30  $\mu$ L d'HCl 2M, puis les produits réactionnels sont extraits quantitativement par 500 $\mu$ L d'acétate d'éthyle (Khan et Vaidyanathan, 1986), puis séchés sous azote et stockés dans 100  $\mu$ L d'EtOH absolu.

### 3.5. Analyse des produits réactionnels PAL

#### 3.5.1. Par spectrophotométrie

Les spectres (de 240 à 340 nm) des produits réactionnels PAL sont effectués en milieu éthanolique en présence ou non de NaOH (0,5 N) et d'AlCl<sub>3</sub> (30  $\mu$ M). Ils sont obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU 640.

#### 3.5.2. Par chromatographie sur couche mince de silice

Les produits réactionnels PAL sont analysés, selon El-Basyouni *et al.* (1964), sur couche mince de silice (Kieselgel 60  $F_{254}$ , Merck) et par référence à des témoins (vanilline, acide *t*-cinnamique, acide férulique, aldéhyde salicylique). Le solvant de migration est un mélange du toluène/ MeOH/ acétate d'éthyle (10: 1: 1, v/v).

La détection des produits sous U.V. à 254 nm est effectuée avant et après révélation à l'iode.

#### 3.5.3. Par HLPC-PAD

L'analyse par HPLC a été réalisée selon le protocole de Chevolot *et al.* (1997), mais en utilisant un chromatographe liquide Kontron (Kontron Instruments, Milano, Italie) à la place d'un chromatographe Waters (Millipore-Waters). L'appareil se compose d'un injecteur manuel (Rheodyne model 9125 injector), d'une pompe HPLC (HPLC 325 pump system) et d'un détecteur U.V./visible à barrette de diodes (modèle 440). Tous ces modules sont contrôlés par un équipement KromaSystem 2000 software (Kontron Instruments, Milano, Italie).

La colonne analytique de type  $C_{18}$  en phase inverse (Lichrospher 100 RP-18; 125 × 4 mm; taille des particules: 5 µm; Merk, Darmstadt, Germany) est précédée d'une colonne de garde (LichroCART 4-4, RP-18, Merck; Darmstadt, Germany). La phase mobile est composée d'un système de 2 solvants: solvant I, 5% (v/v) d'acide acétique dans H<sub>2</sub>O Milli-Q et solvant II, MeOH (Merk). Les conditions d'élution choisies sont un gradient isocratique de 15% du solvant II dans le solvant I, pendant 5 min, puis de 5 à 35 min, un gradient linéaire allant de 15% du solvant II dans le solvant I à 80% du solvant II dans le solvant I, et enfin, de 35-45 min, un gradient isocratique de 80% du solvant II dans le solvant I. L'élution des produits injectés (100 µL) est réalisée avec un débit fixé à 1 mL min<sup>-1</sup> et la détection est réalisée à des longueurs d'onde de 230 à 350 nm.

Pour l'identification des produits, le  $T_r$  et les caractéristiques spectrales ("purity angle" et "purity threshold", "match angle" et "match threshold") sont analysés par référence aux paramètres répertoriés de standards. La quantification des composés, réalisée à une longueur d'onde de 310 nm optimale, est exprimée en nmoles par référence à des standards externes.

### 4. Inhibiteurs de protéase

### 4.1. Extraction

Des extraits d'IP bruts sont préparés selon le protocole de Walker-Simmons et Ryan (1977). Les cellules élicitées ou non sont broyés à 4°C dans du tampon Tris-HCl (0,5 M, pH 8,5), contenant 0,5% de PEG et 3% de PVPP (25 kDa) à l'aide d'un sonicateur [Vibracell<sup>TM</sup> (Bioblock), 70 W (4 à 5 fois pendant 30 sec)]. Les broyats sont centrifugés (4°C, 12 000 g, 15 min) et les surnageants ont été chauffés à 65°C pendant 10 min, puis dialysés sur unités d'ultrafiltration (Ultrafree<sup>TM</sup> Millipore, seuil de coupure à 10 kDa). Le dialysat repris par 200  $\mu$ L d'eau distillée constitue l'extrait brut IP.

### 4.2. Mesure de l'activité protéasique

Les cinétiques d'activité protéasique sont développées dans des milieux réactionnels renfermant une protéase et son substrat, en présence ou non d'un extrait IP. Des contrôles ont été effectués (témoins avec le substrat seul ou en présence d'extrait IP, témoins avec l'effecteur seul) (Figure 9).

Les cinétiques sont enregistrées pendant 4 h à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU 640, et la vitesse initiale de la réaction ( $\Delta A_{410}$ . min<sup>-1</sup>) est exprimée par référence au contrôle qui est l'activité protéasique sans IP (soit la valeur 100% pour ce contrôle).



Figure 9. Cinétique d'activité protéase. En A, l'activité protéase ( $\alpha$ -chymotrypsine par exemple) est suivie à 410 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU 640, pendant 4 h à 40°C en l'absence (courbe d) ou en présence d'un extrait IP (équivalent à 1 µg mL<sup>-1</sup> protéine) isolé de 4.10<sup>6</sup> cellules de *Rubus* élicitées (courbe b) ou non (courbe c) par un signal fongique. Des contrôles sans enzyme et sans substrat ont été réalisés (courbe a). En **B**, courbe de dose-dépendance: les cinétiques d'activité protéase ( $\alpha$ -chymotrypsine) ont été développées en présence d'un extrait IP provenant de cellules élicitées (courbe b) ou de cellules non traitées (courbe a) dont la teneur en protéines a varié de 0 et 2 µg mL<sup>-1</sup>. La vitesse initiale de la réaction ( $\Delta A_{410}$ min<sup>-1</sup>) est exprimée en % de l'activité de contrôle (activité protéase en l'absence d'extrait IP). Une valeur sur un graphe correspond au traitement des données relatives à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon (extrait IP) provenant de 3 sets indépendants d'élicitation.

### 4.2.1. Le milieu réactionnel de l'activité papaïne

Ce milieu (500  $\mu$ L) tamponné par du citrate phosphate de sodium (0,1 M, pH 6) renferme de la cystéine-HCl (5 mM), de la papaïne (0,56 unités), du substrat BAPNA (0,27 mM) avec ou non une aliquote d'extrait IP (équivalent à 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> protéines) provenant de cellules élicitées ou non-traitées.

### 4.2.2. Le milieu réactionnel de l'activité sérine-protéase (trypsine et $\alpha$ chymotrypsine)

Le milieu (500 $\mu$ L) tamponné par du Tris-HCl (50 mM, pH 8) renferme 20 mM de CaCl<sub>2</sub>, de la trypsine (0,03 unités) ou de l' $\alpha$ -chymotrypsine (0,0075 unités), le substrat BAPNA (92  $\mu$ M) avec ou non une aliquote d'extrait IP (équivalent 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> protéines) provenant de cellules élicitées ou non-traitées.

### 4.3. Analyse des données

La mesure de la modulation de l'activité protéase par un extrait IP induit par un traitement éliciteur a été réalisée en plusieurs étapes: (i) une cinétique protéase est développée en présence ou non de l'extrait IP. Au moins 4 courbes de cinétique sont développées à partir d'extraits IP isolés de 3 sets différents d'élicitation; (ii) la vitesse de la réaction enzymatique  $(\Delta A_{410} \text{ min}^{-1})$  est déterminée d'après la pente à l'origine d'une courbe. Plusieurs courbes de cinétique étant obtenues, la vitesse initiale de l'activité protéase est déduite par régression linéaire (à partir du logiciel Excel); (iii) la modulation de l'activité protéase par un extrait IP est exprimée en % du contrôle qui est l'activité protéase sans effecteur.

### 5. Activité D-glycohydrolase

### 5.1. Extraction

Les extraits enzymatiques sont préparés à partir des cellules élicitées ou non. Les cellules sont broyées à 4°C dans du tampon 50 mM Tris-HCl de pH 7,5, additionné de 1 M de NaCl, et de 1 mM CaCl<sub>2</sub> (dans le cas d'extraction d'amylase) à l'aide d'un sonicateur [(Vibracell<sup>TM</sup> (Bioblock)) 70 W, 30 sec]. Les broyats sont centrifugés à 4°C (12 000 g, 15 min) et les surnageants sont dialysés contre de l'eau distillée sur unités d'ultrafiltration (Ultrafree<sup>TM</sup> Millipore, seuil de coupure à 10 kDa). Le dialysat constitue l'extrait brut glycohydrolase.

### 5.2. Dosage d'activité glycohydrolase

Le dosage repose sur la quantification des sucres réducteurs libérés (Somogyi, 1952). Les activités (1,3)- $\beta$ - $\underline{D}$ -glucanase (laminarinase, EC: 3.2.1.39, (1,4)- $\alpha$ - $\underline{D}$ -polygalacturonase; EC: 3.2.1.15) sont dosées après incubation de l'extrait enzymatique (équivalent à 2 µg mL<sup>-1</sup> de protéines) à 40°C pendant des temps variables (de 1h à 4h) dans 100 µL de tampon acétate de sodium (0,1 M, pH 5) en présence de 30 µg de substrat (laminarine ou acide polygalacturonique) (Figure 10). L'activité amylase totale ( $\alpha$  et  $\beta$ -amylase; EC : 3.2.1.1 et 3.2.1.2) est dosée dans 100 µL de tampon PBS (0,1 M, pH 7) enrichi en CaCl<sub>2</sub> (1 mM) et en NaCl (6 mM) en présence de 25 µg d'amidon soluble.

L'activité glycohydrolase a été modulée en présence ou non d'un extrait IP (équivalent à 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> protéines). Des contrôles ont été effectués à partir des milieux réactionnels sans extrait enzymatique, sans substrat, avec un extrait enzymatique porté à 100°C pendant 5 min et avec l'extrait IP seul.



Figure 10. Cinétique d'activité  $(1,4)-\alpha$ -<u>D</u>-galacturonase. Exemples de cinétiques développées, pendant 4h en présence du substrat (30 µg acide polygalacturonique), à partir d'un extrait enzymatique provenant de 4.10<sup>6</sup> cellules de *Rubus* élicitées (courbe b) ou non (courbe a) pendant 30 min par un signal; le dosage des sucres libérés se fait à 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU 640. Des contrôles (milieu réactionnel sans enzyme, sans substrat) (courbe c) ont été suivis parallèlement avec des échantillons élicités. Une valeur expérimentale sur le graphe correspond au traitement des données relatives à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 2 sets indépendants d'élicitation.

### 5.3. Analyse des données

Dans des conditions expérimentales identiques, 2 à 4 extraits enzymatiques bruts provenant de 2 sets indépendants d'élicitation ont été analysés. 2 cinétiques d'activité glycohydrolase au moins ont été développées par extrait. La vitesse de la réaction enzymatique ( $\Delta A_{500}$  min<sup>-1</sup>) est donnée par la pente à l'origine d'une courbe de cinétique. Plusieurs courbes de cinétique étant obtenues, la vitesse initiale de la réaction est déduite par régression linéaire (à partir du logiciel Excel). Elle quantifie l'activité glycohydrolase. La réponse d'élicitation est mesurée par R qui est le rapport de l'activité dans des cellules élicitées sur l'activité dans des cellules non traitées (témoin) en présence ou non de IP.

### 6. La réduction du Cyt c

### 6.1. Dosage du Cyt c réduit

Le dosage se fait selon le protocole Nakanishi *et al.* (1991). 2.10<sup>6</sup> protoplastes de *Rubus* suspendus dans 1 mL de tampon Tris-HCl (pH 4,8) contenant 100  $\mu$ M du Cyt c sont préincubés à 25°C pendant 1 minute dans les cuves d'un spectrophotomètre Beckman DU 640. L'éliciteur fongique (1 pM à 100 nM) est ajouté en présence ou non d'un effecteur: acide linoléique (40  $\mu$ M), SHAM (20  $\mu$ M), antimycine A (150  $\mu$ M), SOD (0,16 mg mL<sup>-1</sup>), CAT (0,15 mg mL<sup>-1</sup>) ou acide caféique (400  $\mu$ M). La réduction du Cyt c est mesurée à une longueur d'onde de 550 nm (Figure 11).

### 6.2. Analyse des données

Données des conditions expérimentales, donnée à 3-4 courbes de cinétique ont été tracées à partir de protoplastes provenant de 2 à 3 sets indépendants d'élicitation. La vitesse de réduction du Cyt c ( $\Delta A_{550}$ min<sup>-1</sup>) est donnée par la pente d'une courbe de cinétique. Plusieurs courbes de cinétique étant obtenues, la vitesse initiale de la réduction du Cyt c est déduite par régression linéaire (donnée par le logiciel Excel). La réduction du Cyt c dans des protoplastes élicités en présence ou non d'un effecteur est exprimée en % du contrôle qui est la vitesse de réduction dans des protoplastes non-élicités en l'absence d'effecteur.



Figure 11. Cinétique de réduction du Cyt c dans des protoplastes de *Rubus*.  $2.10^6$  protoplastes de *Rubus* sont élicités (courbe b) ou non (courbe a) pendant 10 minutes par un signal fongique en présence du Cyt c (100 $\mu$ M). La réduction du Cyt c est suivie à 550 nm pendant 8-10 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU 640. Des contrôles sans protoplastes ont été suivis parallèlement (courbe c). Une valeur sur le graphe correspond au traitement des données relatives à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets indépendants d'élicitation.

### 7. La consommation d'oxygène

### 7.1. Evaluation de la consommation d'oxygène

La consommation d'oxygène a été suivie selon la méthode décrite de Dwyner *et al.* (1996). 2.10<sup>6</sup> protoplastes de *Rubus* suspendus dans 1 mL de tampon Tris-HCl (pH 4,8) sont élicités ou non par un signal fongique (1 pM à 100 nM) en présence ou non d'un effecteur: acide linoléique (40  $\mu$ M), SHAM (20  $\mu$ M), antimycine A (150  $\mu$ M), PLA<sub>2</sub> (8  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) plus CaCl<sub>2</sub> (40  $\mu$ M), acide stéarique (40  $\mu$ M) ou acide caféique (400  $\mu$ M). La consommation d'oxygène est suivi à 25°C à l'abri de la lumière dans une électrode de Clark calibrée à 100% pour 240 nmoles O<sub>2</sub> (Figure 12).



Figure 12. Variation de la teneur en oxygène induite dans des suspensions de protoplastes de *Rubus*.  $2.10^6$  protoplastes sont élicités (courbe b) ou non (courbe a) par un signal fongique, en présence ou non d'un effecteur. La consommation d'oxygène a été suivie à  $25^{\circ}$ C à l'abri de la lumière dans une électrode de Clark. Une valeur sur le graphe correspond au traitement des données relatives à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets indépendants d'élicitation.

### 7.2. Analyse des données

Pour une condition expérimentale donnée, 3-4 courbes de cinétique ont été tracées à partir de protoplastes provenant de 3 sets indépendants d'élicitation. La vitesse de consommation d'oxygène (x nmoles  $O_2 \min^{-1}$ ) est donnée par la pente d'une courbe de cinétique. Plusieurs courbes de cinétique étant tracées, la vitesse initiale de consommation d'oxygène est déduite par régression linéaire (donnée par le logiciel Excel). La consommation d'oxygène dans des protoplastes élicités en présence ou non d'un effecteur est exprimée en % du contrôle qui est la vitesse de consommation dans des protoplastes non-élicités en l'absence d'effecteur.

### 8. La transition de la fluorescence

### 8.1. Conditions expérimentales

La transition de la fluorescence de la pyranine ( $\lambda$ ex 405nm,  $\lambda$ em 512nm) est suivie selon le protocole d'Apostol *et al.* (1989). 2.10<sup>6</sup> protoplastes de *Rubus* suspendus dans 1 mL de tampon Tris-HCl (pH 7,4) contenant du Tween (0.1%), de la catalase (0,15 mg mL<sup>-1</sup>) et de la pyranine (2µM) sont agités dans des puits de 250 µL (plaques Perkin Elmer) pendant 2 minutes avant d'être élicités ou non par un signal fongique (1 pM à 100 nM) en présence ou non d'un effecteur: acide linoléique (40 µM), acide stéarique (40 µM), acide caféique (400 µM) ou SOD (0,16 mg mL<sup>-1</sup>). La réaction d'élicitation est suivie à l'aide d'un spectrofluorimètre Perkin Elmer MPF 44A (Buckinghamshire, Angleterre).

### 8.2. Analyse des données

Pour une condition expérimentale donnée, 3-4 courbes de cinétique ont été tracées à partir de protoplastes provenant de 3 sets indépendants d'élicitation. La vitesse de transition de la fluorescence ( $\Delta F_{512}$ min<sup>-1</sup>) est donnée par la pente d'une courbe de cinétique. Plusieurs courbes de cinétique étant tracées, la vitesse initiale de la baise de la fluorescence est déduite par régression linéaire (donnée par le logiciel Excel). La vitesse de transition de la fluorescence dans des protoplastes élicités en présence ou non d'un effecteur est exprimée en % du contrôle qui est la vitesse dans des protoplastes non-élicités en l'absence d'effecteur.



Figure 13. Variation de fluorescence dans des suspensions de protoplastes de *Rubus* en réponse à un signal fongique: exemple d'enregistrement en présence de pyranine.  $2.10^6$  protoplastes de *Rubus* sont élicités (courbe b) ou non (courbe a) par un signal fongique en présence de pyranine (2  $\mu$ M) pendant un temps court de 8-10 min. Des contrôles sans protoplastes ont été suivis parallèlement (courbe c). La cinétique est suivie à l'aide d'un spectrofluorimètre Perkin Elmer MPF 44A (longueur d'onde d'émission de 512 nm). Une valeur sur le graphe correspond au traitement des données relatives à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets indépendants d'élicitation.

### 9. Méthodes analytiques

### 9.1. Méthodes physiques

### 9.1.1. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil Varian Unity Plus 500 ou Brukner AC 300 (Laboratoire de Grenoble) ou sur un appareil Brukner ASX 400 WB (Laboratoire de Lille) équipé avec une sonde de 5 mm. Les produits sont solubilisés dans  $D_2O$ à une concentration de 10 mg mL<sup>-1</sup> pour l'analyse <sup>1</sup>H-RMN et à une concentration de 20 à 50 mg mL<sup>-1</sup> pour <sup>13</sup>C-RMN. Les glissements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au standard 4,4'diméthyl-4-silapentane-1-sulfonate de sodium, dont le déplacement chimique est de 2,225 ppm, dont le déplacement chimique est de 2,10 ppm en <sup>1</sup>H à 323 K et 31,0 ppm en <sup>13</sup>C à 303 K. Les constantes de couplage sont exprimées en hertz.

Les spectres <sup>1</sup>H-RMN (1D) sont réalisés à l'aide d'un Varian Unity Plus 500 utilisant des pulses (45° et 8 µs) sur une fenêtre de 2400 Hz pendant un temps d'acquisition de 2,7 ses.

Les spectres <sup>1</sup>H-RMN (2D) COSY, NOESY, HMQC et HMBC sont réalisés à l'aide d'un Varian Unity Plus 500 dans une matrice de 1000 Hz selon 2 directions F1 et F2 ou F1 entre 0 à 1024 points. Les expériences 2D phasées COSY et NOESY ont été réalisées avec les séquences (90°)-(t1)-(90°)-(acquisition, t2)

Les spectres <sup>13</sup>C-RMN (1D) sont réalisés à l'aide d'un Brukner AC 300 utilisant des pulses (30° et 2  $\mu$ s) sur une fenêtre de 10000 Hz pendant un temps d'acquisition de 0,5 ses.

#### 9.1.2. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse **FAB-SM** (Laboratoire du Grenoble) sont effectués à faible concentration de produit dans la matrice de glycérol bombardée par Xe (9kV). On a utilisé un spectomètre Nermag R 1010C modèle 2000 (Nermag, Rueil-Malmaison, France) équipé d'un canon FAB de (8KV, 20 mA).

Les analyses par la **méthode MALDI** (Laboratoire de Lille) sont réalisées sur un appareil Vision 2000 (Finnigan MAT, Hemmel). Les échantillons ont été dissous dans l'eau à la concentration de 50-100 pmol  $\mu$ L<sup>-1</sup> puis 1  $\mu$ L a été mélangé avec 1  $\mu$ L de matrice (acide 2,5-dihydroxybenzoïque: 10 mg mL<sup>-1</sup> dans méthanol/ eau, 70:30; v/v). La cristallisation a été effectuée à la température ambiante. Ensuite elles ont été irradiées par un faisceau laser d'azote (337 nm) pendant 3 nsec.

### 9.2. Méthodes chimiques

#### 9.2.1. Chromatographie par tamisage moléculaire

On a utilisé une colonne Bio-Gel P<sub>4</sub> (Bio-Rad; 108 x 2,3 cm) et l'élution a été réalisée avec de l'eau distillée à un débit de 15 mL h<sup>-1</sup>. La détection des sucres collectés se fait à l'aide d'un réactif à l'orcinol sulfurique.

#### 9.2.2. Chromatographie par échangeurs d'ions

Dans le cas de la chromatographie par échange de cations, on a utilisé une colonne  $(35 \times 2 \text{ cm})$  de Dowex 50 x 2 (H<sup>+</sup>, 200-400 mesh, Bio-Rad). Les composants positifs retenus sur la colonne sont élués avec une solution d'acétate de pyridine (500 mM) à un débit de 25 mL h<sup>-1</sup>.

Dans le cas de la **chromatographie par échange d'anions**, les fractionnements ont été réalisés à l'aide d'une colonne ( $35 \times 2 \text{ cm}$ ) de Dowex 1 x 2 (HO<sup>-</sup>, HCOO<sup>-</sup> ou CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>; 200-400 mesh; Bio-Rad). Les composants négatifs retenus sur la colonne sont élués avec un gradient isocratique d'une solution d'acétate de pyridine (10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM, 1 M et 2 M) à un débit de 25 mL h<sup>-1</sup>.

#### 9.2.3. Chromatographie liquide à haute performance

Les séparations par HPLC ont été réalisées avec un appareil Waters 590, équipé soit d'une colonne analytique remplie d'une phase inverse  $C_{18}$  (Zorbax, 250 x 4,6 mm; Life Science International), soit d'une colonne analytique remplie d'une phase normale HW 40F/50F (50 x 2,5 cm). Les produits sont détectés par réfractométrie à l'aide d'un réfractomètre différentiel (Differential Refractometer Waters 410) ou avec un détecteur UV 280 nm ou 206 nm (Waters Associates, Model 40). L'éluant de la colonne en phase normale est une solution de NaNO<sub>3</sub> (0,1 M) à un débit de 2 mL min<sup>-1</sup> et, en phase inverse, du l'eau Milli Q à un débit de 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

### 9.2.4. Chromatographie liquide à performance rapide

Les séparations sur colonne analytique Mono Q (5 x 50 mm) ont été réalisées avec le système FPLC (Pharmacia, Uppsala, Sweden), équipé d'un moniteur (LCC-500), de deux pompes (P-500), d'un enregistreur (REC-482) et d'un détecteur (UV-M). La colonne est stabilisée dans un tampon Tris-HCl (0,2 M; pH 8) et les conditions d'élution choisies sont un gradient linéaire de 0 à 0,5 M NaCl dans le tampon Tris-HCl à un débit de 1 mL min<sup>-1</sup>.

#### 9.2.5. Chromatographie sur couche mince

L'analyse des sucres ou de produits phénoliques se fait par chromatographie sur plaque  $(20 \times 20 \text{ cm})$  de gel de silice (Merck-F<sub>254</sub>, épaisseur 0,25 mm, Merck, Darmstadt, Allemagne). La phase mobile utilisée varie en fonction des produits analysés: (i) **pour les sucres** c'est le mélange alcool *n*-butilique/ acide acétique/ l'eau (2: 1: 1,5, v/v); (ii) **pour les phénols** c'est le mélange toluène/ MeOH/ acétate d'éthyle (10: 1: 1, v/v). Après migration les sucres sont révélés sous UV (254 nm) et/ou par vaporisation d'iode ou par trempage dans une solution à l'orcinol sulfurique suivi d'un chauffage à 300°C. Les produits phénoliques sont révélés en UV (254 nm).

#### 9.2.6. Chromatographie en phase gazeuse

#### Analyse des produits acétates d'alditols.

L'échantillon à analyser (200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) et le standard interne méso-inositol (2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) sont hydrolysés par du TFA (2 M, 4 h à 100°C en reflux ) (Albersheim *et al.*, 1967). Le TFA est éliminé par évaporations successives sous vide jusqu'à neutralité après addition d'eau.

Après l'hydrolyse, les substances avant réduction par NaBH<sub>4</sub> (3 h à la température ambiante ou 1 heure à 60°C), puis la solution est neutralisée par une solution aqueuse d'acide acétique à 50%. Après trois évaporations successives dans du MeOH contenant 1% de HCl (pour éliminer les borates), les alditols sont acétylés par le mélange pyridine/ anhydre acétique (1: 1, v/v) pendant une heure à 100°C sous reflux. Le mélange est dilué dans de l'eau et concentré à séché trois fois. Une dernière évaporation est effectuée dans EtOH pour éliminer les traces d'eau.

Le résidu sec est ensuite repris par le chloroforme (0,3 à 0,5 mL) pour être analysé avec un chromatographe Hewlett-Packard 5890 à ionisation de flamme couplé à un intégrateur (Hewlett-Packard, modèle 3380-A). La colonne utilisée, en silice fondue, est de type macrobore (25 m x 0,53 mm) remplie de la phase SP-2380; le gaz vecteur est l'azote (débit 3 mL min<sup>-1</sup>), la température du four est de 200°C avec une programmation de température de 1,5°C min<sup>-1</sup>.

Les oses sous forme de dérivés acétates d'alditols sont caractérisés en CPG par leur temps de rétention (Figure 14 A). Pour les analyses quantitatives, les pourcentages molaires et pondéraux de chaque ose présents sont établis par référence au standard interne, le mésoinositol.

#### Analyse de produits triméthylsylilés

Elle se fait selon la méthode de Kamerling *et al.* (1989). Le produit à analyser (200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) est lyophilisé avec le standard interne, une solution de méso-inositol (2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Au produit (très sec) on ajoute 250  $\mu$ L d'une solution de MeOH/ HCl à 0,5 N et la méthanolyse est effectuée pendant 24 h à 80°C dans des tubes hermétiquement fermés. La solution est neutralisée par du carbonate d'argent ajouté grain par grain, puis elle fait l'objet d'une *N*-acétylation par apport de 20  $\mu$ L d'anhydride acétique. Après une nuit de repos à température ambiante et à l'obscurité, le tube est centrifugé. Le surnageant introduit dans une pipette Pasteur scellée à une extrémité est délipidé 3 fois par 200  $\mu$ L d'heptane, puis évaporé sous azote. Le résidu sec est repris par 25  $\mu$ L de pyridine et 25  $\mu$ L de BSTFA.

Après 3 h de réaction à température ambiante, les monosaccharides silylés sont analysés en CPG sur colonne capillaire (0,2 mm x 25 m) remplie de Silicone OV 201. Le gradient de température est programmé de 120° à 240° à raison de 2°C min<sup>-1</sup>; le débit du gaz vecteur (He) est de 1 mL min<sup>-1</sup> avec une pression d'entrée de 0,6 bars. La température est à 240°C pour le détecteur à ionisation de flamme et pour l'injecteur.

Par cette méthode on identifie la présence des sucres sous leur forme pyranosique ou furanosique (Figure 14 B). Le pourcentage molaires et pondéraux de chaque oses présent sont établis par référence au standard interne de méso-inositol.



Figure 14. Chromatogramme en phase gazeuse des dérivés méthylglycosil trifluoroacetates (A) et méthylglycosil triméthylsililés (B).
#### 9.2.7. Libération de O-glycannes par $\beta$ -élimination

Le matériel biologique, la glycoprotéine B3 (1 g), a été repris par 50 mL de NaBH<sub>4</sub> (1 M) en solution dans NaOH (0,1 M). Le pH est porté à 12,5 avec une solution de NaOH (2 M). Le milieu de réaction est ensuite incubé sous agitation magnétique pendant 48 h à 37°C. La réaction de  $\beta$ -élimination est arrêtée en ajoutant de l'acide acétique à 50 % jusqu'à pH 6. La séparation des *O*-glycannes est réalisée par chromatographie sur une colonne de Bio-Gel P<sub>4</sub> (Bio-Rad; 108 x 2,3 cm). L'élution est réalisée avec de l'eau distillée à un débit de 15 mL h<sup>-1</sup> et la présence des sucres dans les fractions collectées est effectuée avec un réactif à l'orcinol sulfurique.

#### 9.2.8. Digestion pronasique

Une quantité de 10 mg de glycoprotéine a été dissoute dans 10 mL d'une solution d'acétate de calcium (0,02 M) dans du tampon Tris-HCl (0,04 M, pH 8,2) à laquelle on ajoute 0,2 mg de Pronase E (Merck, Darmstadt). Le mélange est incubé pendant 24 h à 40°C. A 4h, 8h et 20 h, on ajoute la même quantité de Pronase E. L'hydrolyse enzymatique est arrêtée après 24 h en ajoutant jusqu'à pH 4,5 de l'acide acétique dilué. La solution finale est concentrée à 1 ml avec un évaporateur rotatif, puis on ajoute 10 mL de MeOH refroidi à 20°C. On laisse la solution 2 h à la température du laboratoire, puis pendant 15 h à 2°C. Le précipité recueilli par centrifugation et séché sous courant d'azote.

### 9.2.9. Chromatographie en Phase Gazeuse et Spectrométrie de Masse des oses méthylés

Des oligosaccharides lyophilisés (50  $\mu$ g) ont été dissous par 100  $\mu$ L de DMSO, puis incubés dans un bain d'ultrasonication pendant 30 min. En suite, on a ajouté 200  $\mu$ L d'iodure de méthyle et le mélange est "soniqué" pendant 2 h sous argon ou azote. La réaction de méthylation est arrêtée en ajoutant 1,5 mL d'eau distillée. L'excès d'iode est éliminé à l'aide de thiosulfate de sodium. L'extraction des oligosaccharides est réalisée par du chloroforme (500  $\mu$ L). L'oligosaccharide perméthylé est soumis à une réaction de méthanolyse en ajoutant 0,5 mL du mélange MeOH/ HCl (0,5 N); en suite la solution est incubée à 80 °C pendant 24 h. Les méthylglycosides obtenus sont acétylés en présence de pyridine (50  $\mu$ L) et d'anhydride acétique (200  $\mu$ L) pendant une nuit à la température ambiante.

L'identification des éthers méthyliques est réalisée CPG couplée à un spectromètre de masse.

#### 9.2.10. Dosage colorimétrique des sucres

Les glucides totaux sont dosés selon la méthode de Montreuil *et al.* (1972), plus précisément ils sont révélés à l'orcinol (solution d'orcinol à 0,2% dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20%) et chauffés à 110°C.

#### 9.2.11. Dosage colorimétrique des protéines

Le dosage des protéines se fait à l'aide d'une solution de Bleu de Coomassie selon Bradford (1976), pour des concentrations de l à 10  $\mu$ g en protéine.

#### 9.2.12. Dosage colorimétrique des lipides

Les lipides sont identifiés selon Mangold *et al.* (1955) par immersion dans une solution à 30 % de MeOH contenant une solution à 1 % d' $\alpha$ -cyclodextrine. La révélation se fait par vaporisation d'iode.

## **CHAPITRE 1**

## Evaluation du potentiel biologique de fractions

isolées de FUSARIUM OXYSPORUM SP.

#### A. La signalisation chez les végétaux: Généralités

#### 1. Définitions

La matière vivante possède une extraordinaire variété de composés organiques de structure complexe qui sont polyvalents car ils peuvent avoir plusieurs fonctions. En particulier, ils contrôlent le métabolisme des cellules en leur permettant de s'adapter à l'environnement. Les systèmes permettant aux cellules d'un organisme vivant de communiquer entre elles ou avec l'environnement sont apparus très tôt au cours de l'évolution. La communication est réalisée grâce à des molécules "messagers" ou signaux d'origine exo- ou endogène, qui sont vecteurs d'information biologique En fonction de l'information reçue, la matière vivante adopte différentes stratégies de réponses aux stimuli. Cette adaptation concerne aussi bien de simples cellules isolées (bactéries) que des organismes très différenciés. De plus, elle se traduit par des réponses cellulaires intervenant aussi bien dans la défense de la plante vis à vis de pathogènes qu'au cours des phases de multiplication, ou de différenciation cellulaire se déroulant à différents stades de développement de la plante. Si pour des cellules simples et isolées la plupart des signaux sont exogènes, on trouve les deux types de signaux soit d'origine exo- ou endogène chez les organismes supérieurs (plantes, insectes, mammifères).

Les signaux permettent aux cellules animales de (i) s'identifier (cas des molécules d'histocompatibilité); (ii) de déclencher et d'assurer une défense immunitaire (cas des antigènes, des interleukines, des sélectines...); (iii) d'assurer la croissance et le développement de l'ensemble de l'organisme comme le font les hormones, les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs. Les signaux peuvent être immobilisés sur des cellules (cas des molécules d'histocompatibilité) ou ils peuvent être véhiculés dans l'organisme (cas des hormones, des stéroïdes, des neurotransmetteurs). Dans ce cas, ils agissent sur des cellules cibles parfois dispersées qui sont glandulaires, musculaires, ou neurales en régulant un grand nombre d'activités physiologiques et métaboliques. Leur transport peut être actif (avec une consommation d'énergie) en mettant en jeu des échanges ioniques qui impliquent des pompes ioniques Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> par exemple. Ou bien les échanges sont passifs en se produisant par simple diffusion au travers des membranes.

Darvill et Albersheim (1984) ont montré que des fragments oligosaccharidiques des parois fongiques intervenaient au cours d'interactions plante-pathogène en induisant la formation de métabolites secondaires à fonction antibiotique, les phytoalexines. Par la suite, il a été prouvé que des oligosaccharides issus des parois des cellules végétales (cas des oligogalacturonanes, du xyloglucane...) pouvaient induire des réactions physiologiques impliquées dans la croissance, la rhizogenèse, ou la fructification. Dans des mécanismes de reconnaissance cellulaire les oligosaccharides sont aussi des ligands pour des lectines (Sharon, 1993).

Ainsi, chez les végétaux, la résistance des plantes face à un pathogène apparaît comme la résultante d'une série de mécanismes spécifiques et complexes déclenchés par la reconnaissance d'un oligosaccharide. Ces molécules nommées **oligosaccharines** (Albersheim, 1985) seraient, comme les phytohormones, des signaux de communication inter- et intracellulaires capables d'assurer la défense de la plante face à une agression environnementale mais aussi de contrôler la croissance et le développement. La différence entre ces oligosaccharides et les phyhormones (auxines, cytokinines, gibbérellines, acide abscissique, éthylène...) provient du fait que ces dernières exercent des effets pléiotropiques plutôt que spécifiques en étant capables d'un grand nombre simultané d'actions sur la croissance et le développement, actions bénéfiques ou néfastes pour la plante (Promé et Demont, 1993).

65

Si dans sa définition d'origine, une oligosaccharine est un oligosaccharide qui induit la synthèse et l'accumulation de phytoalexines, on désigne maintenant comme éliciteur tout signal de structure chimique diverse (sucre, peptide (Yu, 1995), glycoprotéine (Hahlbrock *et al.*, 1995), glycolipide (Carlson *et al.*, 1993)...) d'origine biotique ou non, ou bien un agent physique ou chimique (UV, radiation  $\gamma$ , sécheresse, froid...), apte à induire chez les plantes des réactions de défense mais aussi d'adaptation à l'environnement, *et/* ou capable de contrôler le développement cellulaire (Boller, 1989). Par référence au mode d'action, et à la connaissance de la signalisation dans les cellules animales, le terme de signal se substitue de plus en plus chez les végétaux au terme d'éliciteur.

DANS CETTE THESE, TOUTE MOLECULE OU MELANGE DE MOLECULES AYANT UN POTENTIEL BIOLOGIQUE, QUELLE QUE SOIT SON ORIGINE, ET QUELLE QUE SOIT LA NATURE DE LA REACTION PHYSIOLOGIQUE INDUITE, SERA QUALIFIEE DE SIGNAL.

# 2. Réponses physiologiques induites chez les végétaux par des signaux d'origine diverse

Comme cela a été souligné ci-dessus, les cellules reçoivent donc et émettent des signaux qui codent certaines informations biologiques permettant aux plantes de s'adapter à l'environnement, de réguler les différentes phases de leur développement. Ces signaux peuvent être des oligo-, polysaccharides, des lipides, des lipooligosaccharides, des protéines.

#### 2.1. Oligo-, polysaccharides

Comme oligo-, polysaccharides, on trouve:

1) Les oligo- $\beta$ -<u>D</u>-glucanes, comme l'hepta- $\beta$ -<u>D</u>-glucoside (Figure 15a), isolés des parois du champignon *Phytophthora megasperma* (Sharp *et al.*, 1984a) sont des fragments libérés par le pathogène dans les premières phases de l'infection, de façon spontanée ou sous l'action de <u>D</u>-glycanases de la plante hôte. La structure minimale active, le heptasaccharide (Cheong *et al.*, 1991), est constituée d'une chaîne de 5 résidus  $\beta$ -<u>D</u>-(1 $\rightarrow$ 6) glucose, dont le deuxième et le quatrième sont liés (1 $\rightarrow$ 3) à un autre résidu de  $\beta$ -<u>D</u>-glucose. Ces oligoglucosides induisent la synthèse de phytoalexines (Sharp *et al.*, 1984b), l'induction d'arabinosyl transférases (Bolwell, 1986), des prolylhydroxylases (Bolwell et Dixon, 1986) et/ou de "burst oxydatif" (Funk *et al.*, 1987);

(2) des oligomères de chitine sont aussi actifs (Figure 15b); un DP supérieur ou égal à 4 semble requis pour éliciter l'accumulation de phytoalexines (Walker-Simmons *et al.*, 1983).
La chitine est un polymère linéaire constitué de résidus N-acétyl-<u>D</u>-glucosamine qui est un composant majeur des parois des champignons;

(3) des oligomères de chitosane induisent différentes réponses de défense comme l'accumulation d'IP (Peña-Cortes *et al.*, 1988), la synthèse de (1,3)- $\beta$ - $\underline{D}$ -glucanases, la formation de callose (Kauss *et al.*, 1989) ou la lignification (Lesney, 1989). De plus, leur activité biologique dépend du DP et du degré d'acétylation (Kauss *et al.*, 1989; Liénart *et al.*, 1993). Le chitosane est une chitine dont le degré de *N*-acétylation résiduel est inférieur à 30%; lorsque la désacétylation est complète, c'est un polymère constitué d'unités  $\beta$ - $\underline{D}$ -glucosamine (Figure 15c). Il se trouve dans les parois fongiques mais aussi dans les cuticules des arthropodes (crustacés et insectes);

(4) des oligogalacturonanes peuvent induire des réactions de défense (Tableau III A) par leur capacité à induire des IP. Ils contrôlent aussi certaines étapes de développement des plantes (Tableau III B) (croissance, rhizogenèse, fructification...) (Marfà *et al.*, 1991). De plus, ils sont connus pour déclencher en quelques minutes la production d'EAO (Cf. Chapitre 3, B 3). Les oligogalacturonanes sont des oligomères d'acide  $\alpha$ -<u>D</u>-(1→4) polygalacturonique (Figure 15d) libérés à partir de la pectine, composant majeur de parois végétales, sous l'action d'endopolygalacturonases et/ou de pectine-lyases.

<b>n</b>	

Induction de	DP	Concentration (M)	Plante	Références
phytoalexines	8-13	10-5	soja	Hahn <i>et al</i> ., 1981
	20	nd	pois	Walker-Simmons et al.,
				1983
PAL	>9	nd	carotte	Messiaen et al., 1993
(1,3)-β- <u>D</u> -glucanase	≥ 3	nd	carotte	Davies et Hahlbrock,
				1987
chitinase	nd	nd	tabac	Broekaert et Peumans,
				1988
lignines	8-15	nd	ricin	Bruce et West, 1989
IP	jusqu'à	≤10 <sup>-4</sup>	tomate	Bishop <i>et al.</i> , 1984
	2-6 et 20			

Β

Contrôle de	DP	Concentration (M)	Plante	Références
la floraison	10-14	10-7	tabac	Marfà <i>et al</i> ., 1991
la rhizogènese	12-14	10-7	tabac	Bellicampi et al., 1993
l'élongation auxinique	>8	<10 <sup>-4</sup>	pois	Branca <i>et al.</i> , 1988
la synthèse d'éthylène	5-19	nd	poire	Campbell et al, 1991

69

(5) des oligomères du **xyloglucane** (Figure 15e) ont été très étudiés pour leur effets auxiniques ou anti-auxiniques au cours de la croissance des coléoptiles de pois. Ces effets dépendent de la structure et de la concentration en oligosaccharides mais aussi de celles de l'auxine (Tableau IV). Les oligomères de xyloglucane résultent de l'hydrolyse acide ou enzymatique d'un polymère qui est associé aux parois des végétaux ou à l'endosperme de graines;

**Tableau IV.** Effets auxiniques ou anti-auxiniques d'oligomères de xyloglucane XXFG,FG, XXXG, XXLG (désignés selon la nomenclature de Fry et al. 1993)

Oligomère	Activité anti-auxinique	Activité auxinique	Références
(origine)			
XXFG	(+)	(+)	York et al., 1984
(sycomore)	(10 <sup>-9</sup> à 10 <sup>-8</sup> M)	(10 <sup>-7</sup> à 10 <sup>-6</sup> M)	
FG	(+)	(-)	Mc Dougall et Fry,
(rose)	(10 <sup>-8</sup> M)	(10 <sup>-7</sup> à 10 <sup>-6</sup> M)	1989;
XXXG	(-)	(+)	York et al., 1984;
(sycomore, rose)	(10-9)	(10 <sup>-7</sup> à 10 <sup>-5</sup> M)	Mc Dougall et Fry, 1990
XXLG	(-)	(+)	Mc Dougall et Fry, 1990
(sycomore, rose)	(10 <sup>-9</sup> à 10 <sup>-7</sup> M)	(10 <sup>-7</sup> à 10 <sup>-5</sup> M)	
XXLGol	(-)	(+)	Vargas-Rechia et al.,
(blé)	(10 <sup>-9</sup> M)	(10 <sup>-9</sup> à 10 <sup>-10</sup> M)	1998

(6) des laminarines ou oligomères de  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3) glucanes avec ou non des ramifications (1 $\rightarrow$ 6) (Figure 15f) ont été signalées pour leur activité antimitotique et/ou pour leur action sur la rhizogénèse. Certains proviens d'algues (Natsume *et al.*, 1994), d'autres sont fongique sont d'origine algale;

(7) des  $\beta$ -<u>D</u>-(1 $\rightarrow$ 2) glucanes cycliques présents presque exclusivement chez les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae*. Ils intervienraient dans l'adaptation osmotique de la bactérie ainsi que dans le processus d'infection de la plante, mais ils ne semblent pas impliqués dans la nodulation (Breedveld *et al.*, 1994);

(8) des  $\beta$ -<u>D</u>-(1- $\rightarrow$ 2) glucanes linéaires (Figure 15h) non ramifiés de DP 6 à 9. Ils sont présents chez certaines souches tropicales de *Rhizobium*. Ils possèdent des similarités structurales avec des glucanes à squelette linéaire  $\beta$  (1- $\rightarrow$ 2) et à ramifications  $\beta$  (1- $\rightarrow$ 6) qui sont associés aux membranes d'*Echerichia coli*. Intervenant dans l'adaptation osmotique de cette bactérie, leur fonction biologique n'est pas encore élucidée.

(a) 
$$\beta - \underline{D} - \text{Glc} (1 \rightarrow 6) \beta - \underline{D} - \text{Glc} (1 \rightarrow 7) \beta - \underline{D} - \underline{D} - \text{Glc} (1 \rightarrow 7) \beta - \underline{D} - \underline$$

(g) 
$$\beta$$
-D-Glc (1→2)  $\beta$ -D-Glc [(1→2)  $\beta$ -D-Glc]<sub>n</sub> (1→2)  $\beta$ -D-Glc (1→2)

Figure 15. Structure chimique de signaux oligo-, polysaccharidiques: (a), hepta  $\beta$ -<u>D</u>-glucoside; (b), chitine; (c), chitosane; (d), acide  $\alpha$ -<u>D</u>-(1 $\rightarrow$ 4) polygalacturonique; (e), xyloglucane (structure du nonasaccharide XXFG); (f), laminarine; (g),  $\beta$ -<u>D</u>-(1 $\rightarrow$ 2) glucane linéaire.

· ...

#### 2.2. Peptides, protéines

Comme peptides, protéines, on trouve:

(1) un signal peptidique nommé systémine, identifié chez la tomate soumise à un stress. Composé de 18 acides aminés, c'est un précurseur d'inhibiteur de sérine-protéases (Pearce *et al.*, 1991) et il serait impliqué dans la production d'acide jasmonique (Enyedi *et al.*, 1992);

(2) un oligopeptide, dérivé d'une glycoprotéine de *Phytophthora megasperma f.*sp. *glycinea*. Il induit, chez le persil, des réactions précoces comme un changement du flux ionique, la phosphorylation de protéines membranaires, la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et il active des gènes de défense codant pour des PR-protéines (Hahlbrock *et al.*, 1995);

(3) un polypeptide de 8 kDa (monilicolin A) isolé de Monilinia fructicola (Ebel et
 Cosio, 1994). Il induit une synthèse de phytoalexines chez Phaseolus vulgaris;

(4) des protéines ou des peptides de bas poids moléculaire d'origine fongique, comme un peptide de 3,1 kDa isolé de *Cladosporium fulvum* (Scholtens-Toma et de Wit., 1988), comme des protéines de 10,1 kDa isolée de *Phytophthora capsici*, de 10,3 kDa isolée de *Phytophthora cryptogea* (Ricci et al., 1989), et de 44 kDa isolée de *Erwinia amylovora* (Wei et al., 1992). Ces protéines, peptides peuvent être virales comme la protéine de 17,5 kDa isolée du virus de la mosaïque du tabac (Culver et al., 1989) et elle induisent des nécroses liées à la réponse d'hypersensibilité;

(5) des **protéines** de poids moléculaire plus élevé sont également actives. On a isolé du champignon *Phytophthora* plusieurs protéines nommées élicitines (Huet *et al.*, 1992), qui contrôlent les interactions compatibles ou incompatibles entre les diverses espèces de *Phythophthora* et la plante-hôte, le tabac. Elles peuvent être aussi toxiques, mais à des doses plus faibles, pour d'autres espèces végétales. Elles induisent la formation de nécroses et stimulent en même temps les défenses des plantes contaminées. Ces protéines, de 98 acides aminés, appartiennent à deux classes physico-chimique, dites  $\alpha$  et  $\beta$ . L'originalité des élicitines repose sur le fait quelles ne subissent pas des modifications après leur synthèse, telle que l'addition de chaînes glucidiques, donc leur activité ne dépend que de la structure protéique. Les élicitines  $\beta$  sont connues pour être plus toxiques que les  $\alpha$  dans la mesure où elles induisent des nécroses à des doses de l'ordre de la picomole (Yu, 1995). Leur séquensage a permis d'identifier une région qui régule l'activité nécrotique.

#### 2.3. Lipides

A partir du champignon *Phytophthora infestans* on a isolé des signaux lipidiques comme des acides gras (les acides 5, 8, 11, 14, 17 *cis*-eicosapentaènoïque et 5, 8, 11, 14 *cis*-eicosatétraènoïque), comme des glycolipides, des triglycérides (Figure 16a) et des phospholipides. Ils induisent la production des phytoalexines chez la pomme de terre (Kurantz *et al.*, 1981). Des sphingophospholipides à inositol (Figure 16b) ou à phosphatidyl choline (Figure 16 c) isolés de *Phytophthora capsici* permettent au piment de développer une résistance (Lhomme *et al.* 1990).

(a)  $CH_2$ -O-CO-R |  $CH_2$ -O-CO-R |  $CH_2$ -O-CO-R R-CO = acide gras insaturé en C<sub>20</sub>

(b) 
$$CH_3-(CH_2)_{10}-CH=CH-CH-CH-CH_2-O-P-O$$
  
HO NH OH  
 $CH_3-(CH_2)_{20}-C$   
O

(c) 
$$CH_2OCO-(CH2)_{14}-CH_3$$
  
|  
 $CH_3-(CH_2)_{14}-COOCH O$   
| ||  
 $CH_2-O-P-O-CH_2-CH_2-N^{+}(CH_3)_3$   
|  
 $OH$ 

Figure 16. Signaux lipidiques: (a), triglycéride; (b), sphingophospholipide à inositol; (c), sphingophospholipide à phosphatidylcholine.

#### 2.4. Lipooligosaccharides

Les lipooligosaccharides (Figure 17), nommés aussi facteurs Nod contrôlent la spécificité des interactions des bactéries Rhizobiacées avec les hôtes Légumineuses (Lerouge *et al.*, 1990). Ils jouent un rôle dans le processus d'infection de la plante, ainsi que dans la stimulation des divisions cellulaires donc dans l'apparition de **nodules racinaires** (Cf. Introduction, A 4.1). A des concentrations de  $10^{-12}$  à  $10^{-9}$  M, ils provoquent la formation des poils absorbants à partir des cellules épidermiques racinaires. A plus forte concentration ( $10^{-9}$ 

à 10<sup>-7</sup> M) ils induisent la division des cellules du cortex interne et la différenciation de nodules (Promé 1993).

Les facteurs Nod possèdent, en commun, un squelette constitué d'une séquence de quatre ou cinq résidus *N*-acétyl- $\beta$ - $\underline{D}$ - $(1\rightarrow 4)$  glucosamine et le groupement amine de l'extrémité non réductrice est substitué par un acide gras. Selon l'espèce de *Rhizobium* concernée, ce squelette sera "décoré" par des groupes chimiques variés (sulfate, acétate, carbamate, méthylfucose ou arabinose), fixés sur les résidus *N*-acétyl- $\beta$ - $\underline{D}$ - $(1\rightarrow 4)$  glucosamine et la nature de l'acide gras variera ( $\Delta^{11}C18$ ,  $\Delta^{2,4,6,11}C18$  et  $\Delta^{2,9}C16$ ) (Long, 1996); ces variantes structurales déterminent la spécificité de l'hôte.

Différentes étapes de la biosynthèse des facteurs Nod ont été identifiées. Elles font intervenir des gènes régulateurs de transcription, des gènes communs impliqués dans la synthèse du squelette chitooligosaccharidique, chito-oligosaccharidique, et des gènes spécifiques codant pour des enzymes effectuant des substitutions sur le squelette (Cf. Introduction, A 4.1).



Figure 17. Structure chimique des facteurs Nod (selon Promé (1996)). Les flèches indiquent les changements structuraux des différents facteurs. Les gènes *nod* impliqués dans la biosynthèse sont entre parenthèses.

#### 2.5. Glycopeptides, glycoprotéines

De très nombreux peptides glycosylés ont été identifiés pour leur fonction signalitique:

(1) des glycopeptides, N- et O-glycosylés, isolés de la paroi de Puccinia graminis f.
 sp. titici qui élicitent des lignines; le résidu oligogalactosidique est le motif efficace (Kogel et al., 1988);

(2) un glycopeptide de 2,5 kDa extrait de la levure *Sacharomyces cerevisiae*, induit chez la tomate, la synthèse d'éthylène ainsi qu'une réponse PAL (Basse et Boller, 1993). La partie glycosylée identifiée à un résidu oligomannosidique (Man<sub>10</sub>GlcNAc<sub>2</sub> et Man<sub>11</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) (Basse *et al.*, 1992), interviendrait dans la fonction signalitique. En effet, si seule la protéine est active la partie glycosylée (non active seule) serait un inhibiteur de l'activité de liaison du glycopeptide;

(3) le pathogène Mycosphaerella pinodes produit deux glycopeptides, la supprescine
A et la supprescine B (Figure 18). A des concentrations micromolaires, ils inhibent la synthèse de pisatine (Shiraishi et al., 1992).

En ce qui concerne les glycoprotéines actives, elles sont représentées par des molécules isolées de champignons ou de cultures cellulaires. On trouve:

(4) des glycopeptides de synthèse ayant une séquence peptidique <u>L</u>-Ser ou L-Ser-LPro et qui peuvent être tri- (Takeda *et al.*, 1994), hexa- ou nonaglycosylés (Takeda *et al.*, 1996). Ils induisent des phytoalexines chez le pois;

(5) une glycoprotéine de 28 kDa de Colletotrichum lindemuthianum. Elle élicitent la production d'une flavone chez le haricot (Tepper et al., 1986);

77

(6) une glycoprotéine de 42 KDa, isolée de *Phytophthora megaspeerma* f. sp. glycinea, qui induit, par sa partie protéique, des furanocoumarines chez le persil (Parker et al, 1991);

(7) des glycoprotéines présentes dans le milieu de culture et dans les parois du champignon *Cladosporum fluvum* (De Wit *et al.*, 1981) qui provoquent des nécroses chez la tomates.



Figure 18. Exemples des signaux glycopeptidiques: les supprescines A et B du champignon Mycosphaerella pinodes

#### 2.6. Phytohormones

Les phytohormones désignent des composés comme les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'acide abscissique et l'éthylène. Ce sont des composés organiques synthétisés dans une partie de la plante et transportés à un autre endroit où ils peuvent induire une réponse physiologique à des concentrations le plus souvent micromolaires. La réponse induite par l'hormone dépend de sa nature et de sa concentration, mais aussi de l'espèce végétale, de l'état de développement de celle-ci, de sa localisation dans la plante, ainsi que des interactions avec d'autres hormones. Les phytohormones ont des effets caractéristiques sur des phénomènes aussi différents que la croissance, la maturation, la différenciation et la sénescence.

Les auxines (Figure 19a), caractérisées par un noyau aromatique et une chaîne latérale avec un groupe polaire (un acide ou un composé facilement transformable en acide: sel, ester, nitrile ou amide) sont représentées par 3 groupes: les composés naturels indoliques comme l'acide indole acétique et les composés de synthèse, l'acide naphtalène acétique et l'acide 2,4dichlorophénoxyacétique.

Elle sont connues pour leur capacité à réguler le développement des fruits, à stimuler l'élongation cellulaire des coléoptiles, des tiges, des pétioles et des feuilles ou inhiber l'élongation des racines (Eliasson *et al.*, 1989). Elles sont aussi impliquées dans la division et la différenciation cellulaire. Ainsi elles induisent la formation de racines latérales et favorisent la dominance apicale.

En ce qui concerne le mode d'action des auxines, on retient la présence de récepteurs, protéines du plasmalemme ou du reticulum endoplasmique, ayant été clonées pour certaines d'entre-elles. On a associé la perception d'un signal auxinique à la production d'EAO, au déclenchement d'échanges ioniques, et à l'activation de protéines G. Ces modifications peuvent provoquer l'acidification de la paroi, le remaniement des composants pariétaux (extensines, HRGP) l'activation d'enzymes (glycanases, glycosidases et ou endotransglycosylases) impliquées dans l'extension de la paroi. Des gènes spécifiques (comme PSIAA4 et PSIAA6 régulateurs de la transcription) sont activés par un signal auxinique.

Les cytokinines (Figure 19 b), qui possèdent un noyau adénine (6-aminopurine) substitué ou non ont comme fonction majeure la stimulation de la division cellulaire (Binns, 1994), et elles ont le plus souvent un rôle complémentaire des auxines en ce qui concerne le contrôle de la morphogenèse. Aussi quand le rapport cytokinine/ auxine est bas, la formation

des racines est favorisée; à l'inverse, quand le rapport est haut, on observe un développement important des tiges et des feuilles. De même elles favorisent la néoformation de bourgeons et la levée de la dominance apicale. De plus, elles retardent la sénescence en protégeant la membrane contre la dégradation.

L'acide abscissique (Figure 19c) appartient au groupe des sesquiterpènes. Elle inhibe la croissance, mais elle contrôle l'abscission des feuilles, des fruits et des fleurs (Giraudat, 1995). En plus, elle exerce des effets antagonistes aux gibbérellines. Cette phytohormone devient inactive sous forme oxydée ou glucosylée (formation d'un ester glucosylé).

Les gibbérellines (Figure 19d) sont des composés terpenoïdes résultant de la cyclisation d'unités géranylgéranyl diphosphate en kaurène qui, sous l'action de monooxygenases, conduit à des précurseurs aldéhydiques, lesquels sont convertis en composés gibbérelliques actifs via des étapes oxydatives. Les gibbérellines interviennent dans l'allongement des entre-noeuds et dans la floraison, et elles favorisent la croissance des feuilles et de certains fruits dans lesquels les auxines peuvent être inactives. En stimulant l'activité amylase, donc en contrôlant les réserves dans l'endosperme des graines (Gilroy et Jones, 1994), elles jouent un rôle majeur dans la levée de la dormance des graines et des bourgeons.

L'éthylène est synthétisé *de novo* par la plante, en réponse à une agression microbienne au cours de réactions d'hypersensibilité, ou encore à la suite d'un stress ce qui lui vaut le nom "d'hormone du stress". Intervenant donc dans des réactions de défense des plantes,  $C_2H_4$  élicite des phytoalexines, induit la synthèse de chitinases, de HRGP et stimule des IP.

La  $C_2H_4$  est aussi un régulateur de croissance et l'augmentation de sa production est fortement associée à l'initiation de la maturation des fruits. L'application de  $C_2H_4$  à des graines de céréales lève la dormance et initie la germination (Ecker, 1995). Durant la phase d'induction de l'abscission des feuilles, le niveau de  $C_2H_4$  augmente et il semble diminuer l'activité de l'auxine en réduisant à la fois sa synthèse et son transport et en augmentant sa dégradation.

La production de  $C_2H_4$  est contrôlée par des auxines qui sont capables d'induire la conversion du précurseur de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique et  $C_2H_4$  en augmentant la quantité d'ARNm codant pour l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique synthase (Sato et Théologis, 1989).







Acide Naphtalène Acétique

Acide Indole-3-Acétique



Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétque



(c)

(e)









ČH<sub>3</sub>

Benzyl-Adénine

HŅ - CH2

Acide Gibbérellique

соон

OH

соон

Acide Abscissique

Acide Jasmonique

Acide Salicylique

Figure 19. Structure chimique de phytohormones: auxines, (a); cytokinines, (b); acide abscissique, (c); acide gibbérellique (GA3), (d) et de composés à fonction hormonale: acide jasmonique, (e) et acide salicylique, (f).

(f)

#### 2.7. Autres signaux

On regroupe dans ce paragraphe des molécules de structure chimique très diverse mais qui ont la propriété, en commun, de porter une information biologique. Certaines sont issues du métabolisme des acides gras (cas des jasmonates) ou du métabolisme des phénols (cas de SA). D'autres sont des toxines d'origine fongique ou bactérienne.

#### 2.7.1. Les signaux à fonction hormonale

Les produits désignés ci-dessous ne sont pas des phytohormones au sens strict mais des molécules à fonction hormonale; elles ont été aussi décrites comme **messagers secondaires**. En effet, par leurs effets hormonaux et leur mode d'action, ce sont des signaux primaires ou secondaires capables de réguler des séquences enzymatiques comme le font les messagers secondaires des cellules animales.

Les jasmonates (Figure 19e) (acides jasmonique, méthyljasmonate) caractérisés par un cyclopentanone avec deux substituants variables en C<sub>3</sub> et C<sub>6</sub>, sont issus de la voie octadécanoïdique; leurs précurseurs étant les acides linolénique, 13(S)hydroperoxylinolénique et phytodiènoïque. Largement distribués chez les végétaux (sous une forme glycosylée ou non) ils sont présents dans tous les organes et leur concentration varie à chaque stade du développement de la plante. Ils inhibent la germination des graines et du pollen, la croissance des tiges et des racines, la rhizogénèse ainsi que la division mitotique induite par des cytokinines (Parthier, 1990). Ils provoquent la sénescence et l'abscission des feuilles (Ueda *et al.*, 1981), et ils stimulent la synthèse du  $\beta$ -carotène ou la production de l'C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> dans les fruits.

Les jasmonates sont peuvent réguler plusieurs séquences enzymatiques. En particulier ces molécules libérées dans la plante via une peroxydation lipidique en réponse à différents stress environnementaux, (blessures, pathogènes...) activent l'expression de gènes codant pour des protéines spécifiques, "jasmonate-induced proteins". Parmi ces protéines se regroupent des enzymes du métabolisme flavonoïdique (Creelman *et al.*, 1992), ou terpènique (Gundlach *et al.*, 1992), ainsi que des PR-protéines comme des IP (Farmer *et al.*, 1990), des osmotines, ou des protéines de type thionine (Creelman *et al.*, 1995).

L'acide salicylique (acide o-hydroxybenzoïque) (Figure 19f) est issu de la voie des phénylpropanoïdes via l'acide o-cinnamique (Cf. Chapitre 1, C 1). Il est impliqué dans différents stades de différenciation cellulaire, notamment dans la régulation de la floraison (Kim et al., 1993) et dans la maturation des fruits. Il inhibe la consommation du phosphate et potassium (Lee et al., 1995) ou il bloque la synthèse d'éthylène (Li et al., 1992). Au cours des interactions plante-pathogène la production de SA est augmentée. Elle est corrélée à l'induction de la SAR, ce phénol intervenant comme une molécule messager contrôlant des étapes de transduction (Lee et al., 1995) (Cf. Chapitre 1, C 1.2.3).

#### **2.7.2.** Toxines

Les toxines sont des petites molécules de structure diverse (polypeptides, terpènoïdes...) regroupées en deux catégories selon leur spécificité. Les toxines spécifiques "Host Selective Toxins" sont des agents de pathogénicité alors que les autres, au plus large spectre d'action, ne sont pas sélectives; elles sont designer par les terme de "Host NonSelective Toxins".

Les toxines spécifiques à l'exception du polypeptide ribosomal de Pyrenophora tritici-repentis, sont des métabolites secondaires actifs à des concentrations de l'ordre de 10 pM à 1  $\mu$ M. Les toxines spécifiques sont surtout représentées par les produits des champignons Cochliobolus et Alternaria.

(1) la toxine-T (Figure 20a), isolée de *Cochliobolus heterostrophus*, modifie l'activité d'une protéine chimérique ancrée à la membrane interne mitochondriale (Levings *et al.*, 1995). En perturbant le fonctionnement des mitochondries, elle inhibe certaines étapes de fécondation et de pollinisation (Dewey *et al.*, 1987);

(2) la toxine HC (Figure 20b), isolée de *Cochliobolus carbonum*, inhibe la croissance des racines chez le maïs, mais elle est sans effet chez les Dicotylédones. En régulant l'activité d'une histone-deacétylase nucléaire, elle contrôlerait la transcription des gènes chez les plantes hôtes, comme ceux codant pour des protéines liées à la pathogénèse. Cette toxine a un spectre d'action très large en inhibant *in vivo* et *in vitro* les enzymes histone-deacétylase de maïs, de lévure, de *Physarium*, de poulet (Brosch *et al.*, 1995) et de mammifères (Kijima *et al.*, 1993).

(3) la toxine victorin (Figure 20c) isolée de Cochloibolus heterostrophus, est efficace à des concentrations de l'ordre de 10 pM. Elle provoque la rouille chez de nombreuses Monocotylédones. Elle a été à l'origine de destructions massives de récoltes d'avoine en Amérique de Nord dans les années 1930. Elle se lie d'un façon irréversible à une sous-unité de 100 kDa de l'enzyme mitochondriale glycine-décarboxylase intervenant dans la photorespiration.

Les toxines spécifiques isolées d'*Alternaria* (Figure 20 d...i) présentent (ou non) dans leur structure des acides gras. Elles agissent au niveau du plasmalemme (cas des toxines AF, ACT, ACTG) ou au niveau de la mitochondrie (cas de la toxine AT). Généralement elles sont toxiques car elles inhibent la transcription et/ou la traduction (cas des toxines AAL, AK et AM (Walton *et al.*, 1993; Gilchrist *et al.*, 1995). Certaines, comme la toxine AAL, sont toxiques non seulement pour les plantes mais aussi pour les cellules des mammifères car elles inhibent l'enzyme céramide-synthase impliquée dans la voie de synthèse des cérébrosides et des gangliosides.

Parmi les toxines spécifiques isolées d'autres pathogènes que *Cochliobolus et Alternaria*, on trouve la **fumonisine** (Figure 20j) isolée de *Fusarium moniliforme*, et la **péritoxine** isolée de *Periconia circinata* (Figure 20k) qui bloque la céramide-synthase des mammifères.

Les toxines non spécifiques, comme la fusicoccine (Tognoli *et al.*, 1986), le trichothecène (Zamir, 1990), la coronatine (Weiler *et al.*, 1994), la phaséolotoxine, la syringomycine, la tabatoxine (Ballio *et al.*, 1970) ont un large spectre d'action. Elles sont impliquées dans l'expression de la virulence du pathogène ainsi que dans le développement de symptômes mais sont impliques dans différentes voies métaboliques.

La fusicoccine (Figure 20 l), isolée de *Fusicoccum amygdali* (Tognoli *et al.*, 1986) active une H<sup>+</sup>-ATP-ase membranaire en provoquant la mort cellulaire. Elle est introduite dans la cellule hôte à l'aide d'un récepteur membranaire (Marra *et al.*, 1994).

La tentoxine (Figure 20 m) est un tétrapeptide cyclique isolé d'Alternaria alternata qui bloque le transport d'énergie au cours de la photophosphorylation et qui induit des chloroses (Halloin *et al.*, 1975).

La phytotoxine **coronatine**, isolée de *Pseudomonas syringae*, mime des signaux de la voie des octadécanoïdes. Les activités biologiques induites dépendent de sa structure. Par méthylation ou réduction, la molécule devient inactive; par hydrolyse, on obtient un analogue structural de l'acide 12-oxo-phytodiénoïque, précurseur de l'acide jasmonique (Weiler *et al.*, 1994).



Figure 20 A. Structure chimique en (A) des toxines sélectives: toxine T, (a); toxine HC, (b); victorin, (c); toxine AK, (d); toxine ACT, (e); toxine AF (f); toxine ACTG (g); toxine AM, (h); toxine AAL, (i); fumonisine B1, (j); péritoxine, (k), et en (B) des toxines non sélectives: (l), fusicoccine; (m), tentoxine.

87

#### 3. Mode d'action d'une molécule signal

Nous axons principalement ce paragraphe sur les signaux oligosaccharidiques, et nous portons notre intérêt sur les phases de perception et de transduction du signal. En ce qui concerne la phase d'expression d'une réaction physiologique, nous nous limiterons à la caractérisation de réponses sans détailler ici les bases moléculaires du processus.

#### 3.1. Perception du signal

La première étape est la reconnaissance de signal par les cellules végétales. Cette phase relève d'interactions spécifiques ou non spécifiques.

La reconnaissance spécifique d'un signal au niveau du plasmalemme des cellules végétales a été démontrée. Par exemple, un oligosaccharide comportant un nombre défini d'unités de répétition comme l'hepta- $\beta$ - $\underline{D}$ -glucoside se lie à des protéines plasmalemmiques (Cosio *et al.*, 1992). De même, des récepteurs membranaires d'un glycopeptide de levure et d'un oligomère de chitine ont été identifiés (Shibuya *et al.*, 1993). Des travaux réalisés dans le laboratoire sur un trisaccharide abiotique, éliciteur de  $\underline{D}$ -glycanases chez les végétaux, ont conduit à la séparation, par chromatographie d'affinité, de protéines plasmalemmiques capables d'établir avec ce trisaccharide et/ou avec ses précurseurs des interactions de type ligand-récepteur (Liénart *et al.*, 1992). De même, des sites spécifiques de liaison ont été découverts pour une glycoprotéine d'origine fongique induisant la lignification (Kogel *et al.*, 1991), et pour des toxines bactériennes parmi eux la fusicoccine (Marra *et al.*, 1994). En ce qui concerne le facteur Nod, on a identifié des sites associés au plasmalemme de haut affinité; ces sites sont distincts de ceux reconnaissant le squelette chitooligosaccharidique (Umemoto *et al.*, 1997).

Des données de biologie moléculaire montre, via l'hypothèse gène pour gène (Cf. Introduction, A 3.1), que les gènes R codent pour des produits ayant un domaine extracellulaire riche en leucine impliqué dans l'interaction avec le signal (codé par des gènes *avr*). Par exemple, des gènes de résistance contre le pathogène *Cladosporium fulvum Cf2* et *Cf9* codent pour une glycoprotéine qui a un domaine extracellulaire riche en leucine et des domaines transmembranaire et cytoplasmique (Dixon *et al.*, 1996). Les signaux codés par les gènes *avr4* et *avr9* du pathogène *Cladosporium fulvum interagissent* spécifiquement avec les régions riches en leucine déclenchant des réponses de résistance.

La reconnaissance non spécifique d'un signal par des cellules végétales est principalement à relier à des interactions ioniques. Elle se traduit par des changements de perméabilité du plasmalemme, à une dépolarisation, ainsi qu'à la génération d'EAO. Par exemple, des oligogalacturonates de DP 10 à 16 modifient transitoirement les flux ioniques (extrusion d'ions K<sup>+</sup>, entrée d'ions Ca<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup>...) (Mathieu *et al.*, 1991) et entraînent la dépolarisation de la membrane plasmique (Thain *et al.*, 1990). Des chitosanes induisent un flux électrolytique à travers le plasmalemme (Kauss *et al.*, 1989), et des chitines génèrent la dépolarisation membranaire, l'alcanisation du milieu extracellulaire (Felix *et al.*, 1993).

#### 3.2. Transduction du signal

La reconnaissance du signal éliciteur déclenche une cascade de séquences enzymatiques mettant en jeu des messagers secondaires; cette étape de transmission d'information biologique aboutissant à son amplification se nomme transduction. Des cibles (enzymes, gènes...) sont ainsi activées, ce qui résulte en l'expression de réponses physiologiques.

Chez les végétaux, la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la transduction d'un signal éliciteur est encore limitée. Cependant des données se basant sur la connaissance des cellules animales ont été répertoriées, et des cascades de transduction ont été partiellement reconstituées.

Ainsi, la participation de plusieurs types de messagers secondaires tels que calcium (Stäb et Ebel, 1987), phosphoinositides (Drobak, 1992), nucléotides AMPc (Kurosaki *et al.*, 1987), GTP (Hiroshi et Ohashi, 1995), et diacylglycerols (Shi *et al.*, 1995) à une réponse d'élicitation a été rapportée. De même, des séquences enzymatiques libérant des radicaux libres ( $O_2^{\bullet-}$  et HO<sup>•</sup>) (Mehdy, 1994) ou impliquant des protéine-kinases et des phosphatases (Trewavas *et al.*, 1991) ont été détectées dans la transduction de certains signaux.

On a signalé, ci-dessus, que des métabolites spécifiques auraient une fonction d'hormone et/ou de messager secondaire. Par exemple, l'augmentation de SA dans la cellule est associée avec une activation des réponses de défense, par exemple à l'expression des gènes de défense (Malamy *et al.*, 1996). Les jasmonates peuvent être considérés comme des messagers secondaires (Gundlach *et al.*, 1992) car ils sont capables de réguler la transcription des gènes codant pour un IP (Reinbothe *et al.*, 1994).

Des données de Biologie Moléculaire indiquent qu'un motif structural protéique peut jouer un rôle important dans la transduction d'un signal (Tang *et al.*, 1996). Les gènes de résistance qui codent pour des régions Ser/Thr kinasiques sont impliqués dans la transduction

90

du signal. Ce domaine kinasique est nécessaire, mais pas suffisant dans la transduction car il doit être couplé à (ou être en liaison avec) un domaine riche en leucine.

Par exemple, dans le cas de l'interaction *avrPto (Pseudommonas syringae* pv *tomato)*-*Pto* (tomate), le gène *Pto* (codant seulement un domaine kinasique) doit se coupler avec le gène *Prf* (codant des régions riche en leucine) pour activer la transduction du signal Avr*Pto* (Salmeron *et al.*, 1996). Un cas intéressant est aussi représenté par le gène de résistance *Xa21* du riz qui active seul la transduction car il code les domaines riches en leucine et kinasique (Song *et al.*, 1995).

#### 3.3. Expression de réponses physiologiques

L'interaction de la cellule végétale avec un pathogène ou un signal résulte généralement en l'expression d'une réponse physiologique. Cette réponse qui repose sur l'activation d'enzymes ou de gènes spécifiques permet à la plante de résister aux pathogènes ou de contrôler son développement.

#### 3.3.1. Réponses physiologiques de défense

Après une interaction **plante-pathogène** on peut observer plusieurs réponses physiologiques, comme la dépolarisation du plasmalemme, la nécrose cellulaire, le dépôt de callose (Kauss *et al.*, 1989) et de lignines (Kogel *et al.*, 1991), la synthèse des phytoalexines (Dixon *et al.*, 1986) et la synthèse *de novo* des PR-protéines, protéines liées à la défense (Stintzi *et al.*, 1993).

Ces mécanismes de défense sont déclenchés selon une chronologie définie et ils varient selon le type de plante ou de pathogène impliqué. L'activation des mécanismes de défense implique des cascades de transduction se déclenchant après l'interaction du signal avec des protéines plasmalemmiques, ou après l'internalisation du signal soit directement (Lawton et Lamb, 1987), soit après complexation à un récepteur (Horn *et al.*, 1989).

La HR est l'une des premières réponses de défense chez les plantes (Klement, 1992). Cette réponse se traduit par l'apparition d'une nécrose des tissus végétaux autour du site d'infection; la mort de quelques cellules végétales au profit des nombreuses cellules infectées restreint ainsi le développement du pathogène (virus, champignons, bactéries, nématodes), incapable alors d'envahir les tissus sains. En quelque sorte, la plante résiste à l'envahisseur en pratiquant la méthode de la terre brûlée, les tissus morts n'étant plus exploitables par le microorganisme pour son propre développement. Cette réponse s'accompagnera de toute une cascade d'événements précoces (Cf. Chapitre 3, A)

La phase d'hypersensibilité est prolongée par SAR de la plante au pathogène, non seulement au niveau de la zone infectée mais aussi au niveau de tissus éloignés: une résistance se développe en conférant ainsi à la plante une immunité (Ryals *et al.*, 1995). Les signaux impliqués entre la HR et la mise en place de la SAR ne sont pas clairement identifiés, mais des molécules comme la systémine (Schaller *et al.*, 1996), les acides jasmonique et salicylique (Sharma *et al.*, 1996) sont reconnus comme messagers secondaires. Cette protection, dite SAR (Hunt *et al.*, 1996), apparaît être largement non-spécifique et protège toute la plante. Une des réactions physiologiques qui lui est associée est la biosynthèse de PRproteines. Par exemple, dans le cas de l'infection du tabac par le virus de la mosaïque du tabac, on a identifié des PR-protéines répertoriées selon Ward *et al.* (1991) en 9 classes au moins parmi lesquelles se situent des glycohydrolases (des (1,3)  $\beta$ -<u>D</u>-glucanases sous forme acide (PR-2a PR-2b et PR-2c) ou extracellulaire (PR-Q)), des chitinases sous forme acide (PR-3a, PR-3b et PR-Q) ou basique (chitinases de classe III ) ainsi que des protéines de type heveine (PR-4a et PR-4b) ou de type thaumatine (PR-5a et PR-5b).

## 3.3.2. Réponses impliquées dans le contrôle de la croissance et/ou de la différenciation cellulaire

Les oligosaccharides n'ont pas uniquement un rôle dans les réactions de défense, certains signaux éliciteurs régulant différentes phases du développement des végétaux (Darvill *et al.*, 1992). En effet, Albersheim et Darvill (1985) ont mis en évidence le rôle joué par des oligosaccharides d'origine végétale dans la régulation du développement et la reproduction des plantes. Des oligogalacturonates ont des effets sur la morphogenèse des feuilles, des racines (Tran Thanh Van *et al.*, 1985; Bellincampi *et al.*, 1993) ou bien dans la formation de fleurs (Marfà *et al.*, 1991). Ils peuvent contrôler l'élongation des cellules et la maturation des fruits (Melotto *et al.*, 1994) ou bien induire la production d'éthylène (Brecht et Huber, 1988).

Il existe également des glycoprotéines pouvant jouer un rôle dans l'embryogenèse (De Vries et al., 1988) ou induisant une division cellulaire (Howard et al., 1977).

Par ailleurs, des lipooligosaccharides, comme les facteurs Nod, induisent la formation de nodules au niveau des racines de la plante en stimulant la division des cellules corticales (Lerouge *et al.*, 1990).

De même, des oligomères de xyloglucane sont connus pour leurs effets auxiniques ou anti-auxiniques (Cf. Chapitre 1, A 2.1).

#### 4. Marqueurs biologiques de défense

Au cours des interactions plante-pathogène, plusieurs réactions de défense sont déclenchées, chaque modification physiologique exprimée peut être considérée comme un marqueur de stress. Toute modification relevant de l'activation d'enzymes ou de gènes spécifiques, ou bien de la génération d'ions ou de métabolites à relier au traitement éliciteur peut être considérée comme un marqueur de défense.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons analysé le **potentiel éliciteur** des **fractions** isolées de *Fusarium oxysporum* sp. et de *Fusarium* sp. M7-1 en recherchant leur capacité à induire des réactions de défense chez des plantes. Pour cela, nous avons suivi une activation enzymatique ou évalué l'intensité d'une réponse relevant de l'induction d'un marqueur de défense et qui a été induite par une fraction donnée.

Les principaux marqueurs retenus ont été l'activation de l'enzyme PAL, la variation du potentiel redox du plasmalemme, l'induction de glycohydrolases ou d'IP.

Seules les réponses physiologiques significatives dans leur intensité, leur spécificité et leur reproductibilité ont été prises en compte et rapportées dans ce mémoire. L'aspect descriptif a été rapporté dans ce chapitre 1 alors que les réponses les plus significatives ont fait l'objet d'une étude approfondie dans le chapitre 3. Les conditions d'expression, les caractéristiques physiologiques des réponses détectées ont été bien définies afin de valider la fonction signalitique des molécules testées. Le caractère précoce des réponses, et la capacité d'une fraction oligosaccharidique (d'un éliciteur potentiel) à être efficace à de très faibles concentrations (concentrations pico-, nanomolaires) ont été étudiés en priorité.
## B. PREPARATION DE SIGNAUX ELICITEURS DE *FUSARIUM OXYSPORUM* SP.

## 1. Préparation de fractions brutes

Ce travail a été réalisé à partir du mycelium de *Fusarium oxysporum* sp. Différents auteurs ont rapporté l'existence de protéines, de lipides et de sucres comme composants majeurs du mycelium des champignons du genre *Fusarium* (Cf. Introduction, B 2).

Dans notre cas, le mycelium de *Fusarium oxysporum* sp. déshydraté (100g) a fait l'objet d'un traitement acétonique (Cf. Matériels et Méthodes, A 2.1) et 2 fractions brutes ont été retenues, soit une **fraction soluble** enrichie en glycolipides et en lipides, et soit une **fraction insoluble** enrichie en glycoprotéines/peptides, en protéines/peptides, et en oligo-, polysaccharides. La fraction soluble a été caractérisée sur un plan structural (Cf. Chapitre 2), mais seuls des composants oligo-, polysaccharidiques de la fraction insoluble ont été évalués pour leur potentiel biologique (Cf. Chapitre 3, C 4).

On a préparé une poudre déshydratée par broyage du mycelium de *Fusarium* oxysporum sp. La poudre déshydratée a fait l'objet des extractions successives à froid en présence d'acétone réalisées jusqu'à la décoloration totale du surnageant récupérée par centrifugation (10 min à 4000 g). A la fin de cette séparation on a obtenu (i) une fraction insoluble à l'acétone, appelée **fraction protéique**, qui a été séchée à l'air à la température ambiante et qui sera soumise à d'autres expériences de fractionnement et de purification (pour des détails voir Chapitre 1, B 2.2), et (ii) une fraction soluble dans l'acétone, appelée **fraction glycolipidique** (pour des détails voir Chapitre 1, B 2.1).

## 2. Caractérisation chimique (analyse préliminaire)

2.1. La fraction glycolipidique (après élimination de l'acétone sous l'azote) est fractionnée par la méthode de Folch en 3 sous-fractions: GL1, GL2, et GL3. La présence de lipides a été confirmée par révélation à la  $\alpha$ -cyclodextrine et aux vapeurs d'iode, et celle des sucres a été effectuée par détection au réactif à l'orcinol sulfurique. L'analyse en CPG des produits acétates d'alditols dérivés de la fraction glycolipidique a permis d'identifier les monosaccharides (Tableau V).

Tableau V. Le rapport molaire en hexoses isolées des fractions GL1, GL2 et GL3

	Gal	Man	Glc	Xyl	Ara	Sucres (%)
GL1	2	6	6	0	1	10,4
GL2	2	11	8	1	9	40
GL3	1	5	5	0	0	12

## 2.2. La fraction insoluble dans l'acétone

La poudre acétonique a été soumise à un traitement alcalin; elle a conduit aux 2 fractions **B** et **C** (Figure 21). La poudre reprise dans l'eau, a été chauffée pendant 2 h à 70°C et le précipité, collecté par centrifugation (15 min à 12000 g), a été solubilisé dans NaOH 0.1 M (2 h à 60°C). Le surnageant recueilli par centrifugation (15 min à 15000 g) a été dialysé et concentré sur unités d'ultrafiltration Ultrafree <sup>TM</sup> Millipore (seuil de coupure de 10 kDa). Le rétentat est nommé fraction **C** et le dialysat est la fraction **B**.



Figure. 21. Séparation des fractions brutes B et C d'une poudre acétonique préparée à partir du mycelium de *Fusarium oxysporum* sp.

L'étude structurale préliminaire des fractions brutes B et C a conduit aux résultats suivants:

#### (1) Données de l'analyse par CPG

L'analyse a porté sur des monosaccharides triméthylsilylés, et les résultats sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI. Composition centésimale et molaire en hexoses des fractions B et C.

	Gal	Man	Glc	GlcNAc	GalNAc	GlcUA	GalUA	Sucre (%)
В	2	4	1	0.5	0.2	traces	0	12
С	2	3	1.5	0.02	0.07	traces	0	16

#### (2) Données de l'analyse par <sup>1</sup>H-RMN

En vue d'élargir les données sur la structure des fractions B et C, nous avons fait des analyses par <sup>1</sup>H-RMN (1D) dans les conditions précisées ci-dessus (Cf. Matériels et Méthodes, B 9.1.1).

D'après la Figure 22, les spectres des fractions B et C révèlent l'existence de plusieurs signaux anomères dans la région 4,4 ppm à 5,6 ppm. On observe les formes anomériques  $\beta$  et  $\alpha$  (en fonction de leur constante de couplage) pour des H-1 appartenant à des unités carbohydrates différentes ou identiques (car les fractions analysées n'ont pas été réduites par le NaBH<sub>4</sub>). Le profil des spectres RMN dans la région 2,5 ppm à 0,5 ppm, montre la complexité de l'enchaînement et de la ramification. Les fractions brutes B et C présentent donc une grande hétérogénéité avec des "contaminants" protéiques, glycoprotéiques en plus de composants oligosaccharidiques.



**Figure 22**. Spectres <sup>1</sup>H-RMN (1D à 500 MHz) des fractions brutes B et C solubilisées dans l'eau lourde à 50°C.

(3) Composants glycoprotéiques, et oligosaccharidiques: séparation par tamisag moléculaire et analyse par HPLC.

Les fractions obtenues ont été analysées par chromatographie sur Bio-Gel P<sub>4</sub> (élution  $H_2O$ , débit 15 mL h<sup>-1</sup>) et des détections par réfractométrie et par spectrométrie à 280 nm ont été réalisées (Figure 23 A). Ensuite, les fractions collectées ont été analysées par HPLC sur une colonne HW 40F/50F (50 cm x 2.5 cm) (élution NaNO<sub>3</sub> 0.1 M, débit 2 mL min<sup>-1</sup>, détection réfractométrique). Les fractions B et C ont été séparées, chacune en trois composants selon le Tr, soit: B1 (Tr: 35 min), B2 (Tr: 43 min), B3 (Tr: 48 min) et C1 (Tr: 24 min), C2 (Tr: 31 min) et C3 (Tr: 33 min) (Figure 23 B).

Une détection à 280 nm des protéines à l'aide du spectrophotomètre Beckman DU 640, permet de distinguer, pour la fraction B, les composants glycoprotéiques B1 et B2 du composant oligosaccharidique B3 et pour la fraction C un composant glycoprotéique C1 des composants oligosaccharidiques C2 et C3.



Figure 23 A. Analyse chromatographique des fractions brutes B et C isolées de *Fusarium oxysporum* sp.: séparation sur Bio-Gel P<sub>4</sub>; en (B) analyse HPLC sur colonne HW 40F/50F.







#### (4) Analyse des composants glycoprotéiques

Les composants glycoprotéiques (B1, B2, C1 et C2) des fractions B et C ont été soumis à **une digestion pronasique** afin de séparer les parties glycannique et protéique. Après l'hydrolyse enzymatique, les protéines sont précipitées par du méthanol refroidi à (- $20^{\circ}$ C). Le surnageant collecté par centrifugation (10 000 g pendant 10 min), séché sous courant d'azote, est analysé sur Bio-Gel P<sub>4</sub>; la présence de sucres dans les éluats a été révélée par le réactif à l'orcinol sulfurique.

L'analyse a conduit aux composants Bgp (7 mg) et Cgp (8,2 mg) issus des fractions B et C respectivement. Le rendement de la digestion pronasique pour ces glycoprotéines est de 14 % pour la fraction B et de 16,4 % pour la fraction C, ce qui confirme les résultats obtenus par CPG (tableau VI).

A l'issue de ce travail **d'étude structurale préliminaire et d'analyse** chromatographique portant sur des fractions brutes isolées du mycelium, nous disposons de plusieurs fractions à tester pour leur potentiel biologique.

Ces fractions sont de nature glycoprotéique (B1, B2, C1, C2), glycopeptidique (Bgp et Cgp) et oligosaccharidiques (B3, C3 et C4). Les données relatives aux réponses de signalisation qu'elles induisent figurent dans ce chapitre 1: celles du paragraphe C 1.3 correspondent aux réponses en rapport avec le métabolisme phénolique, celles du paragraphe C 3.2 et C 3.3 sont en rapport avec l'induction de glycohydrolases et d'IP respectivement. Dans le paragraphe C 4.2 sont développées des données préliminaires sur le "burst oxydatif".

Pour évaluer le potentiel biologique de ces fractions, nous avons recherché l'induction des marqueurs de réactions de défense cités dans des suspensions de cellules et de protoplastes de *Rubus fruticosus* L. Nous avons sélectionné les fractions actives selon les critères des marqueurs biologiques définis dans ce chapitre au paragraphe A 1.

#### On précisera:

-que nous avons recherché l'induction d'un grand nombre de marqueurs, mais nous rapportons dans ce chapitre les résultats significatifs uniquement;

-qu'un travail approfondi d'analyse structurale développé dans le chapitre 2 a été poursuivi à partir de fractions sélectionnées en fonction de leur potentiel biologique et/ou de leur homogénéité, soit les fractions B1 et B3.

## C. ANALYSE DU POTENTIEL BIOLOGIQUE DES FRACTIONS ISOLEES DU MYCELIUM DE *FUSARIUM OXYSPORUM* SP.

## 1. Induction du métabolisme phénolique

## 1.1 Généralités

En réponse à une agression par des pathogènes, les végétaux disposent de moyens de défense variés, et leur résistance à l'infection dépendra de la régulation de différentes voies métaboliques, notamment du métabolisme phénolique. A la suite d'une agression ou par suite d'un traitement éliciteur, les enzymes clefs de ce métabolisme (PAL, cinnamate-4hydroxylase, 4-coumarate-CoA-ligase...) sont activées et leur synthèse de *novo* est induite. A part les pathogènes et les oligosaccharides éliciteurs, de nombreux stimuli d'origine physique (U.V., sécheresse...) déclenchent cette réponse (Dixon et Paiva, 1995).

De l'activation de ces enzymes de la voie des phénylpropanoïdes (Figure 24) résulte la production de phytoalexines, de lignines et de SA, composés phénoliques impliqués à différents niveaux dans la protection de la plante.



Figure 24. Voies de biosynthèse des phytoalexines de structure isoflavonoïdique, de lignines et d'acide salicylique. phénylalanine ammoniac-lyase, (PAL); cinnamate-4-hydroxylase, (C<sub>4</sub>H); 4-coumarate-CoA ligase, (4CL); chalcone-synthase, (CHS); chalcone-isomerase, (CHI); 4-coumaroyl-CoA reductase, (CCR); alcool cinnamoyl-deshydrogenase, (CAD); acide benzoïque 2-hydroxylase, (BA<sub>2</sub>H).

## 1.2. Métabolites phénoliques

#### 1.2.1. Phytoalexines

Les phytoalexines (Figure 25) sont des composés lipophiles antimicrobiens de faible poids moléculaire qui sont produits par le métabolisme secondaire des plantes suite à l'interaction avec le pathogène et qui s'accumulent aux sites d'infection à des concentrations qui sont inhibitrices pour le développement des champignons et des bactéries. Ces produits,

103

généralement non décelables dans les plantes saines s'accumulent rapidement dans les plantes parasitées (Grayer et Harborne, 1994).

Ces métabolites secondaires **phytoalexines**, sont de structure chimique très diversifiée et elles diffèrent aussi par leur origine et par leur fonction. Les phytoalexines présentent des structures extrêmement variées que l'on peut répartir selon Whitehead *et al.* (1992) en plusieurs groupes: les isoflavonoïdes, les sesquiterpènes, les polyacétylènes, les dihydrophénanthrènes, les furanoterpénoïdes, les flavonoïdes, les coumarines...(Figure 25).



Figure 25. Structure chimique des phytoalexines: (a), isoflavonoïdes; (b), sesquiterpènes; (c), polyacétylènes; (d), dihydrophénanthrènes; (e), furanoterpénoïdes; (f), flavonoïdes et (g), coumarines.

Les trois principales voies de biosynthèse (shikimate, acétate-malonate et acétatemévalonate) (Figure 26) qui fournissent les précurseurs des phytoalexines sont communes à toutes les plantes, car elles sont responsables de la synthèse des composés vitaux du métabolisme primaire (Ebel., 1986). Les systèmes de régulation pour la production des métabolites secondaires sont complexes car lors de la production des phytoalexines, le flux des métabolites primaires demeure constant mais la transcription et la traduction des ARNm codant pour les enzymes spécifiques du métabolisme phénolique sont amplifiées.

Le shikimate est nécessaire à la biosynthèse des anthraquinones et de la <u>L</u>-Phe. Celleci est convertie, via l'acide *p*-coumarique, en coumarines, en isoflavonoïdes et stilbènes. L'acétyl-CoA, produit par le cycle Krebs, conduit à la fois au malonyl-CoA et à l'acide mévalonique. Le malonyl-CoA intervient dans la voie de biosynthèse des dihydrocoumarins, des polyacétylènes et des isoflavonoïdes, alors que l'acide mévalonique sert de précurseur aux sesquiterpénoïdes, aux triterpénoïdes et à quelques isoflavonoïdes.



Figure 26. Biosynthèse de phytoalexines à partir des voies shikimate, acétate-malonate et acétate-mévalonate (d'après Ebel, 1986).

Les rôles physiologiques des phytoalexines sont très diversifiés car elles présentent un très large spectre de toxicité, en fonction de leur structure et de leur cible. Elles inhibent la germination des spores, la croissance du tube germinatif ou la croissance radiale du mycelium. Elles peuvent aussi détruire l'intégrité membranaire du pathogène. Elles ont un effet antibactérien, les bactéries gram-positives étant plus vulnérables que les bactéries gram-négatives. En outre, leur toxicité pour les cellules animales est bien connue: chez les mammifères et insectes la phaséolline, la glycéolline et la médiacarpine causent la lyse des érythrocytes de bœuf. D'autres phytoalexines, c'est le cas de l'ipoméamarone et de ses dérivés, induisent des oedèmes pulmonaires, et même la mort de certains animaux. Le coumestrol et des dérivés isoflavonoïques ont une activité oestrogénique, insecticide, pesticide. Le gossypol est, lui, toxique pour les larves d'insectes mais aussi pour des mammifères non-ruminants.

Pour neutraliser ou diminuer la toxicité des plantes le pathogène se protège de la façon suivante: (i) en supprimant la biosynthèse des phytoalexines par des suppresseurs (Kato *et al.*, 1993); (ii) en utilisant des systèmes de détoxication qui transforment les phytoalexines en produits non-toxiques en mettant en jeu des réactions de monooxygénation (époxydation, oxydation d'hétéroatomes ou encore déalkylation) (Woggon *et al.*, 1992), de réduction (Hargreaves *et al.*, 1976), d'hydratation et d'oxydation (Li *et al.*, 1995); (iii) en développant une tolérance, soit par exclusion de la phytoalexine de son site d'action, soit par modification de la composition en stérols des membranes; ceci afin d'éviter le passage de la phytoalexine dans la cellule.

#### 1.2.2. Lignines

Souvent dans le cas d'infection pathogénique la plante se protège par accumulation de lignines en renforçant les parois cellulaires. Les lignines sont issus du métabolisme des phénylpropanoïdes: les unités  $C_6$ - $C_3$  issus de l'acide *t*-cinnamique, sont transformées en précurseurs de lignines par des réactions d'hydroxylation, de méthoxylation et de déshydratation. L'enzyme CAD (EC 1.1.1.195) de la voie des phénylpropanoïdes est considérée comme un marqueur spécifique pour la biosynthèse de lignines. Elle réduit l'aldéhyde hydroxycinnamate en alcool hydroxycinnamylique. L'expression de l'enzyme CAD augmente en réponse au stress, au pathogène et aux blessures (Campbell *et al.*, 1991). Par un mécanisme oxidatif les précurseurs sont polymérisés en lignine. Dans ce mécanisme sont impliqués les radicaux libres et les enzymes peroxydase et laccase. Les **peroxydases** (EC 1.11.1.7) sont des hémoprotéines dépendantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **les laccases** (EC 1.10.3.2) sont dépendantes de l'oxygène et contiennent 4 atomes de cuivre. Les deux enzymes sont capables d'oxyder *in vitro* les précurseurs de lignines en libérant des radicaux libres.

La structure des lignines est très variée car la nature des composants monomères diffère selon l'espèce végétale, et selon le stage de développement de la plante (Figure 27). Parfois les précurseurs de type alcool *p*-hydroxycinnamylique, coniférylique et sinapylique sont toxiques et instables. Par une glycosylation, à l'aide d'une UDP-glucose: alcool coniféryle glucosyle transferase (EC 2.4.1.111), ils sont convertis en conjugués non toxiques de stockage ou de transport.



Figure 27. Précurseurs des lignines.

### 1.2.3. Acide salicylique

Le schéma de la figure 24 montre que la conversion de l'acide *t*-cinnamique en SA via l'acide benzoïque repose sur un mécanisme oxydatif ou non. On ne connaît pas les différentes étapes de mécanisme oxydatif, mais le processus doit avoir des analogies avec le mécanisme de  $\beta$ -oxydation des acides gras. Par exemple, chez *Quercus pedunculata* l'acide *t*-cinnamique est converti en acide benzoïque sous l'influence d'ATP et d'acétyl-CoA (Alibert *et* 

108

*al.*, 1971). L'acide benzoïque, forme prédominante chez les plantes saines, est transformé en SA à l'aide de l'enzyme acide benzoïque 2 hydroxylase (Yalpani *et al.*, 1993).

Le SA joue un rôle de signal endogène qui est produit au cours de la phase de résistance nommée SAR (Cf. Chapitre 3, A 1). Sa synthèse résulte de l'activation de séquences de transduction impliquant des EAO (Neuenschwander *et al.*, 1995b). Il contrôle l'induction de certains gènes liés à la résistance et il agit comme d'autres phénols en protégeant les cellules contre la toxicité des radicaux libres (Léon *et al.*, 1995). En effet, en inhibant la CAT, il contrôle la teneur en  $H_2O_2$  (Chen *et al.*, 1993). De plus, en association avec  $H_2O_2$ , il déclenche l'induction des PR-1 (PR-protéines de type 1). Son taux est contrôlé par l'activité salicylate hydroxylase dont l'activation diminue la production de PR-1 (Neuenschwander *et al.*, 1995a).

## 1.3. Résultats: identification du marqueur PAL

#### 1.3.1. Généralités

La PAL (EC 4.3.1.5) catalyse la première étape de la voie des phénylpropanoïdes, générant des composés phénoliques ayant des fonctions diverses. Elle est un marqueur de défense chez les plantes car elle est impliquée dans la synthèse de phytoalexines (Dixon, 1986) et dans la lignification (Wilkinson, 1992). L'enzyme est connue pour être élicitée par des molécules de nature chimique très variée, comme par des oligo-, polysaccharides, des glycoprotéines, des protéines, et des lipides (Jones, 1984).

#### 1.3.2. Approche méthodologique

 $4.10^6$  cellules de *Rubus* sont incubées pendant 30 min en présence ou non de signaux éliciteurs isolés de *Fusarium oxysporum* sp. Les fractions (3 à 6 µg) testées pour leur potentiel biologique sont les fractions brutes B, C, leurs composants (Bgp, B1, B2, B3, Cgp, C2, C3) qui ont été séparés par HPLC (Figure 23 B).

Les extraits enzymatiques PAL sont préparés à partir des cellules élicitées ou non (cellules témoins); l'évaluation de la réponse PAL repose sur la quantification, par spectrométrie à 280 nm, de l'acide *t*-cinnamique formé après désamination de <u>L</u>-Phe, ainsi que sur l'exploitation des courbes de cinétique (Cf. Matériels et Méthodes, B 3).

# 1.3.3. Réponses PAL induites par les fractions isolées de Fusarium oxysporum sp.

L'analyse porte sur une réponse PAL initiée en 30 min dans des cellules traitées ou non par les signaux d'origine fongique; la réponse d'élicitation est exprimée par l'activation PAL (R), qui est le rapport de l'activité des cellules élicitées sur l'activité des cellules non élicitées. Les résultats sont les suivants (Figure 28).

Les expériences réalisées à partir de cellules élicitées conduisent à une valeur R très élevée pour la fraction B (R = 61). On note aussi que le potentiel éliciteur des composants B1 et B3 (R de l'ordre de 20), de la fraction glycopeptidique Bgp (R=25), ainsi que celui du composant C2 de C avec R de 10 est important.



Figure 28. Réponse PAL induite dans des cellules de *Rubus* élicitées en (A) par la fraction B et ses dérivés: Bgp, B1, B2, B3 et en (B) par la fraction C et ses dérivés: Cgp, C2, C3.  $4.10^6$  cellules sont incubées pendant 30 min en présence ou non de l'éliciteur (3-6 µg). Des aliquotes (6 µg mL<sup>-1</sup> de protéines) d'extraits PAL préparés à partir des cellules élicitées ou non sont incubées pendant 30 min à 37°C avec 2.25 mM de L-Phe. La pente ( $\Delta A_{290}$  min<sup>-1</sup>) de la courbe de cinétique déduite par régression linéaire mesure l'activité PAL. La réponse PAL est l'activation enzymatique exprimée par R qui est le rapport de l'activité dans des cellules élicitées sur l'activité des cellules non traitées. Une valeur sur le graphe correspond au traitement des données relatives à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets indépendants d'élicitation.

## 2. Induction d'inhibiteurs de protéases

## 2.1. Généralités

Les **protéases**, très répandues dans la nature, sont synthétisées sous une forme inactive, ce qui permet de protéger la cellule, l'activation pouvant se déclencher rapidement et à même avoir lieu à distance. Les **sérine-protéases** contiennent dans leur site actif une chaîne latérale de sérine. Parmi les plus connues, on trouve la trypsine, l' $\alpha$ -chymotrypsine, l'élastase, la thrombine et même diverses enzymes bactériennes comme la subtilisine. Toutes les enzymes de cette famille sont inhibées par le di-isopropyl fluorophosphate. L'enzyme hydrolyse une foule de substrats à faible masse moléculaire, à fonction amide ou ester, avec une préférence pour les esters porteurs d'un cycle aromatique.

De nombreuses protéases n'utilisent pas la sérine dans leur site actif, mais préférent d'autres sites nucléophiles. Certaines ont de la cystéine dans leur site actif, comme la papaïne, la bromélaïne et les cathepsines B et L. Les différences entre sérine-protéases et thiolprotéases ne sont pas toujours tranchées; la papaïne renferme de la cystéine dans son site actif (à la place de la sérine) ainsi qu'un groupe histidine, et elle a une grande homologie de séquence avec la  $\alpha$ -chymotrypsine.

Les inhibiteurs de protéases agissent comme des analogues de substrats en bloquant, d'une façon compétitive et réversible, le site catalytique des protéases d'origine diverse (Laskowski et Kato, 1980). Les mécanismes de régulation de ces inhibiteurs ne sont pas encore clairement élucidés. Leur induction résulterait d'une synthèse *de novo* stimulée chez les plantes par un stress physique (Graham *et al.*, 1986), par un éliciteur souvent oligosaccharidique (Ryan, 1990), par des molécules "signal": acides jasmoniques ou méthyljasmonates (Farmer *et al.*, 1990), acide abscissique (Pena-Cortez *et al.*, 1988) ou autre phytohormone. Selon Pearce *et al.* (1991), la systémine induirait la synthèse d'IP.

Les IP s'accumulent chez les plantes, dans des organites (lysosomes) ou tissus spécifiques (endosperme). En fonction de leur spécificité d'action, ils sont classés en inhibiteurs de sérine-, cystéine-, aspartique- et métallo-protéases. Selon la structure tridimensionnelle et le nombre de sites actifs, ils sont regroupés en familles. Par exemple, l'effecteur PPI-I (Potato Proteinase Inhibiteur) dont la structure tétramérique est formée de chaînes protéiques identiques inhibe l'activité trypsine alors que l'effecteur PPI-II, de structure plus complexe, inhibe les activités trypsine et  $\alpha$ -chymotrypsine. Les inhibiteurs de sérine-protéase de type Bowman-Birk, constitués de deux régions homologues et d'un site réactif

inhibent l'activité trypsine, tandis que ceux de type Kunitz renfermant 2 sites actifs inhibent les activités trypsine et  $\alpha$ -chymotrypsine (Laskowski et Kato, 1980). Les inhibiteurs de type sérine- et cystéine-protéases sont mieux connus que les inhibiteurs de métallo- ou aspartiqueprotéases.

Les inhibiteurs de **type sérine-protéase** agissent sur des activités protéolytiques d'origine diverse (Ryan, 1990). Ainsi, ces inhibiteurs sécrétés ou libérés après rupture de la vacuole vont agir directement sur le pathogène en limitant la source en acides aminés nécessaire à son développement et/ ou à sa multiplication (Ball *et al.*, 1991). Ils peuvent aussi, comme le font les effecteurs KSTI et PPI-I/ -II, provoquer chez l'hôte une hyperactivité protéolytique au niveau du tractus intestinal causant une sensation de satiété, ce qui peut entraîner sa mort (Ryan, 1990). Certains inhibiteurs de sérine-protéases, sont classés parmi les PR-protéines, quand ils sont induits par un traitement éliciteur (Bishop *et al.*, 1984). C'est le cas de l'inhibiteur de sérine-protéase du groupe I (Geoffroy *et al.*, 1990) induit chez le tabac par le virus de la mosaïque du tabac.

Les inhibiteurs de **type thiol-protéase** ont une localisation intracellulaire et/ou lysosomale et sont communs à de nombreux organismes (Barrett, 1986). Ces inhibiteurs agissent sur des protéases (endo-, exopeptidases) qui ont un rôle majeur dans le "turn-over" de protéines au cours d'un stress ou d'une agression par des pathogènes (Hershko et Ciechanover, 1982). Par ailleurs, ils inhibent l'activité protéolytique de certains coléoptères altérant ainsi leur croissance (Liang *et al.*, 1991). **Tableau VII.** Les principales familles de différents inhibiteurs de protéases induits chezles végétaux (d'après Ryan, 1990)

Désignation	Famille	Spécificité		Origine
PPI	I	sérine-protéase	chymotrypsine	pomme de terre
				tomate
PPI	II	sérine-protéase	chymotrypsine,	pomme de terre
			trypsine	tomate
KSTI	Kunitz	sérine-protéase	trypsine	soja
BBSTI	Bowman-	sérine-protéase	chymotrypsine,	soja
	Birk		trypsine	luzerne
Cystatine		thiol-protéase	papaïne,	riz
			chymopapaïne	

PPI : "Potato Proteinase Inhibitor", inhibiteur de protéase de pomme de terre; KSTI: "Kunitz Soybean proteinase Trypsin Inhibitor", inhibiteur de trypsine du soja (famille Kunitz); BBSTI: "Bowman-Birk Soybean proteinase Trypsin Inhibitor", inhibiteur de trypsine du soja (famille Bowman-Birk).

## 2.2. Résultats: identification des marqueurs inhibiteurs de thiolprotéase et de sérine-protéase

### 2.2.1. Approche méthodologique

 $4.10^6$  cellules de *Rubus* sont incubées pendant 30 min en présence ou non de signaux éliciteurs isolés de *Fusarium oxysporum* sp. Les fractions (3 à 6 µg) testées pour leur potentiel biologique sont les fractions brutes B, C, leurs composants (Bgp, B1, B2, B3, Cgp, C2, C3) qui ont été séparés par HPLC (Figure 23 B).

Des extraits IP sont préparés à partir des cellules élicitées ou non (cellules témoins). La modulation d'une activité protéase (papaïne ou  $\alpha$ -chymotrypsine) par un extrait IP est suivie par spectrométrie à 410 nm dans un milieu réactionnel qui renferme la protéase et son substrat en présence ou non d'extrait IP; la teneur en protéines de cet extrait IP est de 1 µg mL<sup>-1</sup> protéine ou elle varie de 0 à 2 µg mL<sup>-1</sup>.

L'exploitation des courbes de cinétique permet d'évaluer une réponse IP qui est l'activité inhibiteur de protéase d'un extrait IP isolé de cellules traitées par un éliciteur donné; cette activité est exprimée en % de l'activité protéase de contrôle (soit l'activité protéase en l'absence d'effecteur) (Cf. Matériels et Méthodes, B 4).

Ci-dessous, nous rapportons les données relatives aux protéases papaïne ou  $\alpha$ chymotrypsine. Nous avons aussi testé la modulation des activités trypsine et subtilisine par des inhibiteurs de protéases extraits des cellules élicitées par les fractions B, Bgp, B1, B2, B3, C, Cgp, C2, C3, mais les résultats ne sont pas significatifs.

# 2.2.2. Réponse inhibiteur de papaïne ou de $\alpha$ -chymotrypsine induite par les fractions isolées de *Fusarium oxysporum* sp.

Dans la figure 29, on a présenté la modulation de protéases par une concentration en en effecteur (extrait IP) équivalente à 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> protéine provenant de cellules élicitées par les fractions fongiques. Les conditions expérimentales n'étaient pas limitantes dans la mesure où l'on a vérifié que l'effet inhibiteur augmente linéairement avec la concentration de l'extrait IP utilisé (variant de 0 à 2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> protéine).

En ce qui concerne **la modulation de la papaïne** (thiol- protéase) les résultats sont les suivants (Figure 29 A): certains effecteurs provenant de cellules élicitées par les signaux B et Bgp sont inhibiteurs, soit pour B et Bgp précisément une inhibition évaluée à 7 % et 12.6 % respectivement. Par contre, les effecteurs isolés des cellules non traitées ou des cellules élicitées par B1 sont activateurs comme le sont ceux isolés des cellules élicitées par C et ses composantes (C2, C3) (activation de l'ordre de 3 % et 8 % respectivement).

En ce qui concerne **la modulation de l'activité**  $\alpha$ -chymotrypsine les résultats sont les suivants (Figure 29 B): les effecteurs isolés de cellules élicitées par les composants de B (B1, B2, B3) et de C (C2, C3) sont inhibiteurs, avec des valeurs d'inhibition de l'ordre de 11-21 % pour les premiers ou de 4-6 % pour les seconds. Par contre, l'effecteur isolé des cellules de contrôle ou des cellules élicitées par Bgp, B et C ne sont pas actifs, et l'effecteur des cellules traitées par le glycopeptide Cgp est activateur (7 %).



Figure 29. Modulation de l'activité papaïne en (A) et de l'activité  $\alpha$ -chymotrypsine en (B) par des effecteurs IP isolés de cellules élicitées par les fractions B, Bgp, B1, B2, B3, C, Cgp, C2, C3 ou isolés de cellules non élicitées (T). 4.10<sup>6</sup> cellules de *Rubus* sont incubées pendant 30 min en présence ou non de l'éliciteur (3-6 µg), et les effecteurs IP sont extraits. La modulation de l'activité protéase en présence ou non d'un effecteur (1µg mL<sup>-1</sup> équivalent de protéines) est exprimée en % du contrôle (soit l'activité protéase en l'absence d'effecteur). La vitesse de la réaction enzymatique ( $\Delta A_{410}$ min<sup>-1</sup>) a été calculée à partir de la pente de la courbe déduite par régression linéaire. Une valeur sur le graphe correspond au traitement des données relatives à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets indépendants d'élicitation.

## 3. Induction de <u>D</u>-glycohydrolases

### 3.1. Généralités

Les glycohydrolases ou glycoside-hydrolases (EC 3.2.1.x) catalysent l'hydrolyse des liaisons O-glycosidiques, elles provoquent la coupure de la liaison C-O entre un sucre et un aglycone, qui est un autre sucre dans la plupart des substrats naturels. Certaines glycohydrolases sont également capables d'hydrolyser les liaisons C-S, comme par exemple la  $\beta$ -thioglucosidase (Botti *et al.*, 1995). De même, les liaisons C-F sont hydrolysées, entre

autres, par les  $\beta$ -amylases, les cellulases et les lichénases, les enzymes responsables respectivement de la dégradation de l'amidon, de la cellulose et des  $\beta$ -glucanes mixtes (Genghof *et al.*, 1978; Shoda *et al.*, 1993).

L'hydrolyse se déroule selon deux mécanismes qui conduisent soit à la rétention, soit à l'inversion de la configuration du carbone anomérique (Figure 30).



Figure 30. Les mécanismes moléculaires de l'hydrolyse enzymatique des liaisons glycosidiques avec rétention (en A) ou inversion (en B) de configuration.

On constate une grande diversité parmi les glycosylhydrolases car les hydrates de carbone naturels possèdent des structures chimiques et physiques extrêmement variées. De plus, ils jouent un rôle très important comme molécules signal, et sont ainsi les premiers médiateurs dans les interactions cellule-cellule. Ils ont des rôles centraux dans divers processus biologiques, comme la structuration des organismes, le stockage des réserve.

En conséquence, l'hydrolyse sélective des liaisons glycosidiques est essentielle au cours de croissance, de la dégradation des parois cellulaires ou au cours des interactions plante-pathogène. Dans ce cas, les substrats des enzymes (amylases, galacturonases, chitinases, glucanases, laminarinases...) sont impliqués dans la défense de la plante contre le pathogène et/ou dans la production de signaux endogènes à fonction élicitrice; les produits de dégradation des pectines, de la chitine en sont des exemples.

Parmi les glycohydrolases on distingue des enzymes intervenant dans la défense des plante; c'est le cas des (1,3)- $\beta$ - $\underline{D}$ -glucosylhydrolases associées aux PR-protéines, et des galacturonases fongiques. D'autres glycohydrolases, comme les amylases, les (1,4)- $\beta$ - $\underline{D}$ -glucanases contrôlent la croissance et/ou la différenciation cellulaire. Cependant, on doit remarquer que les fonctions physiologiques sont, en réalité, moins tranchées. Parmi les glycohydrolases, on trouve:

(i) des (1,3)- $\beta$ -<u>D</u>-glucanases, hydrolases "acides" ou "basiques" de localisation extracellulaire ou intracellulaire (Kauffmann *et al.*, 1987 ; Keefe *et al.*, 1990). Elles sont classées en plusieurs groupes selon Stintzi *et al.* (1993). Le rôle de ces protéines dans la défense de la plante repose sur leur capacité à lyser les parois des pathogènes riches en  $\beta$ -<u>D</u>-(1 $\rightarrow$ 3) glucanes. Cependant, cette activité enzymatique, comme celle d'ailleurs d'autres PRprotéines, n'est pas seulement impliquée dans la défense des plantes. En effet, des (1,3)- $\beta$ -<u>D</u>glucanases sont induites au cours de la germination, du développement des bourgeons floraux (Neale *et al.*, 1990) ou de la fructification. Ces réponses sont alors sous dépendance hormonale (auxines, cytokinines en général, acide abscissique en particulier);

(ii) des chitinases, classées PR-P et PR-Q du groupe 2 selon Stintzi *et al.* (1993), ont une activité de type endohydrolase générant des chito-oligosaccharides de 2 à 6 unités de N- acétylglucosamine à partir de la chitine, polymère abondant dans la paroi des champignons et dans la cuticule des arthropodes (Collinge *et al.*, 1993);

(iii) des amylases (α, EC 3.2.1.1 ou β, EC 3.2.1.2) qui sont synthétisées dans le scutellum des graines Elles gagnent l'albumen, en particulier la couche à aleurone, sous contrôle des phytohormones acides abscissique et gibbérellique (Jacobsen et Beach, 1985). Elles dégradent l'amidon pour libérer des oligomères (Beck et Ziegler, 1989) utilisés au cours du développement de l'embryon. Par ailleurs, l'activité  $\alpha$ -amylase peut être contrôlée par des inhibiteurs capables d'interagir avec son site catalytique (Gvozdeva et al., 1994). Dans ce cas l'inhibiteur est bifonctionnel, le plus connu est celui, isolé des graines de blé, qui inhibe à la fois l'activité α-amylase et la subtilisine et dont l'activité est dépendante d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des groupements SH (Buonocore et al., 1977). Les inhibiteurs de l'a amylase peuvent présenter des homologies de séquences avec les inhibiteurs de protéases appartenant aux familles de type Kunitz ou Bowman-Birk. (Cf. Chapitre 1, C 2). Les inhibiteurs bifonctionnels ont un rôle physiologique prépondérant en période de dormance car ils protègent le caryopse contre des activités amylolytiques et protéolytiques (Garcia-Olmedo et al., 1987);(iv) des  $\alpha$ -Dgalacturonases (endo (1,4)  $\alpha$ -D-polygalacturonase; EC 2.3.1.15)) qui sont des enzymes pectinolytiques. Elles hydrolysent la paroi primaire de plantes renfermant des polymères arabinogalacturonanes, constitutifs l'acide polygalacturonique, des des comme rhamnogalacturonanes et contribuent ainsi à donner à la paroi une plasticité, ce qui facilite les remaniements ultrastructuraux au cours de la croissance des tubes polliniques, ou au cours de la fructification (Huber, 1983, Filippini et al., 1992).

Par ailleurs, l'activité (1,4)- $\alpha$ - $\underline{D}$ -galacturonase intervient dans la défense des plantes (Côté et Hahn, 1994): les produits d'hydrolyse de l'acide polygalacturonique, des oligomères de DP de 10 à 15, sont, en effet, des signaux déclenchant chez l'hôte parasité la production d'inhibiteurs de protéase (Bishop et al., 1984), ou de phytoalexines (Walker-Simmons et al., 1983).

Cette activité est modulée par des inhibiteurs, les "PolyGalacturonases-Inhibiting Proteins" des anglo-saxons. Ces inhibiteurs, PGIP associés aux parois cellulaires des Dicotylédones interviennent dans la résistance des plantes aux pathogènes en limitant l'hydrolyse des pectines. L'activation des gènes spécifiques est induite par un stress (blessure, pathogène) et par l'éliciteur oligogalacturonate. Par exemple, les cellules de *Phaseolus vulgaris* L. augmentent l'accumulation d'ARNm codant pour des PGIP en réponse à des blessures, aux oligogalacturonanes et au champignon *Colletotrichum lindemuthianum* (Bergmann *et al.*, 1994). Les PGIP ont dans leur structure des domaines riches en leucine, ce qui facilite l'interaction protéine-protéine (Stotz *et al.*, 1994).

## 3.2. Résultats: identification du marqueur (1,4)-α-<u>D</u>galacturonase

### 3.2.1. Approche méthodologique.

 $4.10^6$  cellules de *Rubus* sont incubées pendant 30 min en présence ou non de signaux éliciteurs isolés de *Fusarium oxysporum* sp. Les fractions (3 à 6 µg) testées pour leur potentiel biologique sont les fractions brutes B, C, leurs composants (Bgp, B1, B2, B3, Cgp, C2, C3) qui ont été séparés par HPLC (Figure 23 B).

Des extraits enzymatiques  $(1,4)-\alpha$ -<u>D</u>-galacturonase ont été préparés à partir des cellules élicitées ou non élicitées (cellules témoins). L'activité  $(1,4)-\alpha$ -<u>D</u>-galacturonase est dosée à l'aide de l'acide polygalacturonique comme substrat, en présence ou non d'un extrait

IP (équivalent à 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> protéine) provenant de cellules élicitées; les extraits IP utilisés sont ceux dont les caractéristiques sont rapportées ci-dessus.

L'analyse des courbes de cinétique permet d'évaluer la réponse d'élicitation par le rapport (R); R est le rapport de l'activité enzymatique dans des cellules élicitées (dosée en présence ou non d'un extrait IP) sur l'activité dans des cellules non traitées (dosée en l'absence d'un extrait IP) (Cf. Matériels et Méthodes, B 5).

Ci-dessous, les données relatives à l'activité (1,4)- $\alpha$ - $\underline{D}$ -galacturonase sont rapportées. Nous avons testé aussi des marqueurs de défense ou de croissance type laminarinase ou  $\alpha$ amylase mais les résultats ne sont pas significatifs.

## 3.2.2. Réponse (1,4)-α-D-galacturonase: induction par les fractions fongiques isolées de Fusarium oxysporum sp. et modulation par des inhibiteurs de protéases

Dans un premier temps la réponse (1,4)- $\alpha$ - $\underline{D}$ -galacturonase a été évaluée *in vitro* en l'absence d'effecteur (Figure 31 A). Ensuite, la modulation des réponses par un IP a été abordée en évaluant *in vitro* l'activité (1,4)- $\alpha$ - $\underline{D}$ -galacturonase en présence d'un inhibiteur d' $\alpha$ -chymotrypsine induit par B1 (Figure 31 B) ou de papaïne induit par Bgp (Figure 31 C).

La figure 31 A montre que les signaux B et ses composants n'élicitent pas d'activité  $(1,4)-\alpha$ -<u>D</u>-galacturonase, à l'exception d'une faible réponse R de 1,1 et 1,25 induite par la fraction B et par son composant B1 respectivement. Les composants de la fraction C induisent des activations de l'ordre de 1,2 avec un maximun pour le glycopeptide Cgp (R de 1,3).

Les activités (1,4)- $\alpha$ - $\underline{D}$ -galacturonase induites peuvent-être modulées en ajoutant dans le milieu réactionnel, soit l'inhibiteur de papaïne provenant de cellules élicitées par B1 (Figure 31 B), soit l'inhibiteur de  $\alpha$ -chymotrypsine provenant de cellules élicitées par (Figure 31 C). Les signaux fongiques isolés de *Fusarium oxysporum* sp. ne sont donc pas de bons éliciteurs d'activité (1,4)- $\alpha$ - $\underline{D}$ -galacturonase mais certains comme B1 et Bgp révèlent la capacité d'induire des inhibiteurs de protéase qui eux amplifient la réponse galacturonase. L'intensité de cette amplification dépend non pas de la nature de l'effecteur qui peut inhiber ou activer l'activité enzymatique, mais de son origine donc de la structure chimique du signal éliciteur.

D'après les données de la figure 31, on observe:

(i) que l'enzyme (1,4)- $\alpha$ - $\underline{D}$ -galacturonase isolée des cellules traitées par B1 est activée par l'inhibiteur de papaïne (R de 2) ou par l'inhibiteur de  $\alpha$ -chymotrypsine (R de 1,6) ;

(ii) que toutes les enzymes isolées des cellules élicitées par les composants de la fraction C sont activées (R de 2,8) en présence d'un inhibiteur  $\alpha$ -chymotrypsine ou papaïne ou , les réponses les plus importantes sont celles des enzymes élicitées par C2 (R de 3,07) et par C3 (R de 3, 67);

(iii) que les enzymes isolées des cellules élicitées par Bgp, Cgp et C3 sont activées par l'inhibiteur de papaïne (R de 1,5, 2,9 et 3,67 respectivement);

(iv) que les enzymes isolées des cellules élicitées par B2 et C sont activées par l'inhibiteur de  $\alpha$ -chymotrypsine (R de 2 et 1,84 respectivement).



Figure 31. Activité (1,4)- $\alpha$ -<u>D</u>-galacturonase: réponse d'élicitation en (A) modulation de l'activité enzymatique par un inhibiteur d'a-chymotrypsine en (B) ou par un inhibiteur de papaïne en (C) induit par un traitement éliciteur. 4.10<sup>6</sup> cellules de Rubus sont incubées pendant 30 min en présence ou non de l'éliciteur (3-6 µg); les signaux utilisés sont les fractions B, C et leur dérivés: Bgp, B1, B2, B3, et Cgp, C2 et C3. Des extraits enzymatiques  $(1,4)-\alpha$ -D-galacturonase et des effecteurs IP sont préparés. Les extraits  $(1,4)-\alpha$ -D-galacturonase (équivalent à 20 µg mL<sup>-1</sup> de protéines) des cellules élicitées ou non sont incubés pendant un temps variable (1 h à 4 h) à 40°C avec l'acide polygalacturonique (30  $\mu$ g), en présence ou non d'un effecteur de protéase (équivalent à 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de protéines). Les effecteurs IP utilisés sont l'inhibiteur d'a-chymotrypsine isolé de cellules élicitées par B1 (3-6 µg) et l'inhibiteur de papaïne isolé de cellules élicitées par Bgp (3-6 µg). La vitesse de la réaction enzymatique ( $\Delta A_{500} \text{ min}^{-1}$ ) a été calculée à partir de la pente de la courbe de cinétique déduite par régression linéaire. La réponse (1,4)-a-D-galacturonase est exprimée par R, qui est le rapport de l'activité (quantifiée en présence ou non d'un inhibiteur de protéase) dans les cellules élicitées sur l'activité dans les cellules non traitées (quantifiée en l'absence d'un effecteur de protéase). Une valeur sur un graphe correspond au traitement des données relatives à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 2 sets indépendants.

## **4. INDUCTION DE REPONSES PRECOCES**

## 4.1. Généralités

Nous avons noté que l'induction d'une réponse PAL ou inhibiteur de protéase ou (1,4)-  $\alpha$ -galacturonase étaient induites après 30 min de traitement éliciteur. On peut détecter des réponses encore plus précocement: la production d'EAO, la détection de mouvements ioniques à travers le plasmalemme en sont des exemples car elles sont initialisées après 1 à 2 minutes de traitement.

En effet, la plante réagit très tôt à la tentative d'invasion parasitaire ou à un éliciteur. Parmi les réponses précoces, on peut citer, pour exemples, des échanges ioniques (intrusion dans la cellule d'ions Ca<sup>2+</sup>, extrusion de K<sup>+</sup> etc...), l'induction d'oxido-réductases, de peroxydases générant des EAO, l'activation de protéine kinases et/ou de phosphatases etc. Ces réponses qui amplifient de cascades de transduction initient rapidement des mécanismes de défense (renforcement des parois cellulaires, production de PR-protéines, déclenchement des réponses d'hypersensibilité précédant l'acquisition d'une immunité ou d'une résistance).

Dans ce chapitre, nous avons effectué une analyse préliminaire des réponses précoces. L'analyse plus détaillée de marqueurs comme la génération d'anion superoxyde et d'hydrogène peroxyde, comme des changements de la consommation d'oxygène, sera réalisée (Cf. Chapitre 3 B).

## 4.2. Résultats préliminaires

Notre objectif était de sélectionner des fractions isolées de *Fusarium oxysporum* sp. capables d'induire des réactions précoces dans des suspensions de cellules ou de protoplastes du *Rubus*. Dans une première étape, nous avons retenu comme marqueurs de réactions précoces, le changement de pH et la consommation en oxygène.

Les fractions brutes B, C et leurs composants (Bgp, B1, B2, B3, Cgp, C2, C3) (Figure 23 B), ont été utilisés comme signaux éliciteurs pour cette expérimentation préliminaire.

#### 4.2.1. Changement de pH induit par un traitement éliciteur

L'alcalinisation ou l'acidification de suspensions de cellules ou de protoplastes élicité(e)s ou non a été est suivie à la température ambiante à l'aide d'un pH mètre WTW 500 de laboratoire.

La figure 32 révèle que l'application de l'éliciteur résulte en l'alcalinisation des suspensions cellulaires: la fraction B induit une augmentation du pH de l'ordre de 0,6 unités en 20 minutes. La fraction glycopeptidique B1 et celle oligosaccharidique B3 ont un effet similaire (non représenté). Une variation du pH très faible est induite par la fraction B et ses composants B1, B2 et B3 (non représenté).



Figure 32. Alcalinisation des suspensions cellulaires élicitées ou non par les fractions brutes B et C isolées de *Fusarium oxysporum* sp.  $4.10^6$  cellules de *Rubus* sont incubées en l'absence (courbe a) ou en présence de l'éliciteur (3-6µg): fraction B (courbe b) et fraction C (courbe c), et les variations de pH sont enregistrées. Une valeur sur le graphe correspond à la moyenne des points provenant de 4 courbes développées par échantillon provenant de 3 sets indépendants d'élicitation.

# 4.2.2. Modification de consommation en $O_2$ induite par un traitement éliciteur.

La variation de consommation en  $O_2$  des cellules de contrôle (courbe a) ou élicitées par la fraction B ou C (courbe b ou c) a été suivie à l'abri de la lumière et à la température ambiante à l'aide d'une électrode de Clark (Figure 33).

On a observé que la consommation en  $O_2$  est de 1,5 nmoles  $O_2 \min^{-1}$  pour des suspensions de cellules non traitées alors qu'elle est de l'ordre de 5 nmoles  $O_2 \min^{-1}$  ou de 2 nmoles  $O_2 \min^{-1}$  pour des cellules élicitées par la fraction B ou C.



Figure 33. Consommation en  $O_2$  des suspensions cellulaires élicitées par les fractions brutes B et C. 4.10<sup>6</sup> cellules de *Rubus* sont incubées en l'absence (courbe a) ou en présence de l'éliciteur (3-6µg): fraction B (courbe b) et fraction C (courbe c), et la teneur en oxygène est suivie au cours du temps dans l'électrode de Clark. Une valeur sur le graphe correspond au traitement des données relatives à 4 courbes de cinétique développées par échantillon provenant de 3 sets indépendants d'élicitation. La teneur initiale en oxygène du milieu correspond à 240 nmoles.

## **D. DISCUSSION**

Pour aborder ce travail, nous avons tenu compte que les champignons du genre *Fusarium* induisaient des maladies graves chez les végétaux. Donc dans le cadre d'une thématique interaction plante-pathogène, en sachant que le mycelium est le premier composant de l'interaction avec l'hôte, nous avons cherché à isoler des molécules "signal" de *Fusarium oxysporum* sp.

Les premiers résultats d'analyse de fractions fongiques isolées a conduit à l'identification de structures de nature **glycoprotéique**, **glycopeptidique et oligo saccharidique**. L'analyse préliminaire de la partie glucidique de la fraction B1 a mis en évidence des résidus Gal, Man, Glc, GlcNAc, GalNAc, GlcUA et GalUA. L'existence de ces unités avait été signalée antérieurement chez d'autres souches de *Fusarium* (Bruneteau *et al.*, 1992; Barbosa et Kemmelmeier, 1993; Iwahara *et al.*, 1992; Jikibara *et al.*, 1992a).

Les fractions B ou C ou leurs composants isolée(e)s (Figure 23A) ont été utilisé(e)s comme éliciteurs (dose: 3-6  $\mu$ g; durée: 30 min) dans des suspensions de cellules de ronce. Notre travail préliminaire d'analyse du potentiel biologique de ces fractions permet de retenir que certaines fractions élicitent l'enzyme PAL (Figure 28 A et B), un inhibiteur de papaïne (Figure 29A) ou un inhibiteur d'  $\alpha$ -chymotrypsine (Figure 28B) ainsi que la génération d'EAO (Figure 33). En outre, un IP induit peut amplifier l'activité (1,4)- $\alpha$ -D-galacturonase de cellules élicitées.

On rappelle que de nombreux signaux oligosaccharidiques d'origine fongique ont été étudiés pour leur capacité à induire des réponses rapides d'hypersensibilité aboutissant à des nécroses ou à l'induction d'éthylène, à la synthèse de phytoalexines résultant d'une induction de PAL, à la synthèse de PR-protéines (glycohydrolases, IP), ou à la production d'EAO. Parfois, le pouvoir éliciteur a été relié à des signaux peptidiques (Parker *et al.*, 1991); dans d'autres cas, l'activité élicitrice a été supprimée après déglycosylation d'une protéine (Basse et Boller, 1992).

En ce qui concerne *Fusarium*, il est connu pour induire des réponses de défense, mais aucun éliciteur, oligosaccharidique ou glycoprotéique n'a pas été identifié. Nous avons mis en évidence que le traitement de cellules par des fractions isolées de *Fusarium oxysporum* sp. initie, en quelques minutes, des réponses physiologiques impliquées dans les mécanismes de défense des végétaux. Ces réactions physiologiques se traduisent par l'activation d'enzymes (glycohydrolases, PAL), par l'induction d'IP et par la production d'EAO

Les recherches réalisées sur des signaux éliciteurs (Cf. Chapitre 1, A 2), sur des oligosaccharines en particulier, ont montré qu'il existe une relation étroite entre la structure chimique d'un éliciteur et son activité biologique (Côté et Hahn, 1994). En plus, le degré de polymérisation, la substitution et la charge moléculaire (conditionnant la structure tridimensionnelle) de la chaîne glycosidique contrôlent la spécificité des réponses d'élicitation (Aldington et Fry, 1993). Ainsi, parmi une centaine d'oligomères β-D-glucosides extraits par hydrolyse acide partielle des parois de Phytophthora megasperma, seuls les oligomères de DP inférieur à 9 possèdent une activité élicitrice de phytoalexines (Cheong et al., 1991). Les oligomères de chitine (DP supérieur à 4) induisent des inhibiteurs de protéase (Walker-Simmons et al., 1983) alors que des oligomères de chitosane (DP supérieur à 7) induisent la formation de phytoalexines (Hadwiger et al., 1994). Des oligomères d'acide  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) galacturonique isolés de parois végétales (DP compris entre 10 et 14) induisent la formation de fleurs (Marfà et al., 1991) ou inhibent le développement des racines (Bellincampi et al., 1993) tandis que des oligomères (DP supérieur à 3) élicitent des activités (1,3)- $\beta$ - $\underline{D}$ glucanases (Davis et Hahlbrock, 1987). Par ailleurs, Moloshok et al. (1992) ont montré que les acides di, trigalacturoniques ont la capacité d'induire la synthèse d'IP chez la tomate.

Les fractions isolées de *Fusarium oxysporum* sp. analysées comme signaux éliciteurs dans des suspensions cellulaires montrent aussi une spécificité quant à l'induction de réactions de défense.

Chez Rubus, la fraction B et ses composants B1 et B3 sont inducteurs d'une activité PAL précoce. L'augmentation de l'activation d'un facteur 60 en 30 min de traitement par le signal B est une réponse remarquablement élevée. La PAL et probablement d'autres activités enzymatiques plus en aval dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes peuvent être élicitées. D'autres analyses sur la réponse PAL et les produits réactionnels ont été réalisées (Cf. Chapitre 3, C 3.2).

La PAL est impliquée dans la synthèse de phytoalexines (Dixon, 1986) et de lignines (Wilkinson et Butt, 1992), elle est un marqueur de réactions de défense chez les plantes, et elle est connue pour être stimulée par des molécules élicitrices de nature chimique variée: oligo-, polysaccharides, glycoprotéines, protéines, lipides (Jones, 1984).

Le fait qu'une agression par des pathogènes ou qu'un traitement éliciteur induise l'accumulation de divers acides phénoliques a déjà été rapporté (Rasmussen *et al.*, 1991 ; Funk et Brodelius, 1992) et l'organisation en complexe de ces enzymes a été retenue (Hrazdina et Jensen, 1992). Cette organisation spatiale permettrait une régulation très fine des activités en fonction de stimuli extérieurs (signaux éliciteurs, lumière...) ou endogènes (hormone, protéines régulatrices...) (Stafford, 1981).

Chez *Rubus*, les composants de la fraction B (B1 et Bgp) élicitent en 30 min un inhibiteur de protéase ( $\alpha$ -chymotrypsine ou papaïne). L'inhibition de l'activité  $\alpha$ -chymotrypsine observée à partir de l'échantillon provenant de cellules élicitées par B1 est très élevée car elle est de l'ordre de 21 % de l'activité de contrôle. Quant à l'inhibition d'activité papaïne, elle est de l'ordre de 12,6 % pour des échantillons provenant de cellules élicitées par Bgp.
On rappelle qu'en réponse à une agression par des pathogènes, les plantes peuvent réagir en produisant des PR-protéines. Parmi ces protéines se trouvent des IP et des  $\beta$ -<u>D</u>glycanases. L'induction d'inhibiteurs de sérine-protéase a été signalée en réponse à des éliciteurs (oligosaccharide (Doares *et al.*, 1995), polypeptidique (Pearce *et al.*, 1991)) ou à des hormones ou à des molécules à fonction hormonale comme l'éthylène (Margossian *et al.*, 1988). De même, des stimuli physiques (rayonnement U.V., blessures) sont connus pour induire la synthèse ces inhibiteurs (Linthorst *et al.*, 1993). Des pathogènes (*Phytophthora infestans, Colletotrichum lindemuthianum*) peuvent stimuler la synthèse des IP chez une grande variété de mono- et dicotylédones (Ryan, 1992). Sur la base de données relatives à la fonction physiologique des inhibiteurs de thiol-protéases (Kondo *et al.*, 1990), l'implication de cet effecteur dans le contrôle de la différenciation cellulaire est aussi à retenir.

Un IP est induit rapidement par l'éliciteur fongique B1 et Bgp, ce qui suggère que cette induction relèverait d'événements post-transcriptionnels. Cependant, des modifications transcriptionnelles conduisant à la synthèse *de novo* des IP ayant été rapportées le plus souvent (Moloshok *et al.*, 1992), il est possible que la réponse observée chez *Rubus* précède une autre réponse plus tardive. Une étude de cinétique couplée à l'utilisation d'inhibiteurs de transcription devrait apporter des renseignements sur les modalités d'expression de cette deuxième réponse physiologique.

Parmi des  $\alpha/\beta$ -<u>D</u>-glycanases (chitinases, laminarinase,  $\alpha/\beta$ -amylase,  $(1,4)-\alpha$ -<u>D</u>-galacturonase...) testées, nous avons retenu que seule l'activité  $(1,4)-\alpha$ -<u>D</u>-galacturonase est élicitée par la fraction C et des composants C3 et C4. Cette réponse présente la caractéristique d'être modulable par un inhibiteur de protéase induit par un signal fongique.

Les <u>D</u>-glycanases (polygalacturonases, glucanases, etc) activées par l'invasion d'un pathogène hydrolysent les parois des pathogènes en limitant leur progression dans la plante.

On soulignera que des activités  $(1,4)-\alpha$ -<u>D</u>-polygalacturonase sont également induites au cours de la fructification et de la mâturation des fruits (Darvill *et al.*, 1992), donc l'enzyme est impliquées dans des réactions de défense des végétaux ainsi qu'au cours de la différenciation cellulaire.

Les faibles intensités des réponses observées dans notre modèle expérimental peuvent s'expliquer par le fait que le produit fongique n'est pas pur, mais aussi parce qu'une régulation de cette activité se produirait, sous dépendance d'un IP. L'utilisation d'IP élicités a conduit, en effet, à des activations (1,4)- $\alpha$ - $\underline{D}$ -polygalacturonase élevées (R de l'ordre de 2). L'intensité de cette amplification dépend, non pas de la nature de l'effecteur qui peut inhiber ou activer l'activité enzymatique, mais de son origine donc de la nature du signal.

En ce qui concerne des réponses précoces analysées (flux ionique, polarisation du plasmalemme...) générées au cours d'interaction plante-pathogène on s'est limité dans ce chapitre à rapporter leur déclenchement par la fraction B. Le fait que la consommation en oxygène des cellules soit fortement altérée par un signal a incité à focaliser notre intérêt sur l'induction d'un "burst oxydatif"; ce travail a été développé dans le chapitre 3.

# **CHAPITRE 2**

# IDENTIFICATION DE MOLECULES BIOLOGIQUEMENT ACTIVES

# A. Caractérisation des glucides

# 1. Généralités

Les glucides offrent une grande variété de structures par les isoméries de liaisons entre les monosaccharides (un trisaccharide offre 1056 combinaisons possibles, tandis que 3 aminoacides offrent seulement 6 combinaisons possibles). Ils peuvent exister sous une forme d'oligo- et/ou de polymères ou de glycoconjugués (glycoprotéines, glycolipides) (Cf. Chapitre 1, A 2).

La famille des glycoconjugues provient de réactions de glycosylation catalysées par des glycosyltransférases qui consistent dans le transfert d'un monosaccharide (ou d'un glycanne) sur un accepteur. Dans le cas particulier des glycoprotéines, la glycosylation représente une des plus importantes modifications post-traductionnelles de protéines. La partie glucidique, appelée glycanne, est liée à la partie protéique par des liaisons *N*- ou *O*glycosidiques (Tableau VIII).

La structure glycannique peut venir modifier la conformation spatiale et par la même moduler l'activité de sont accepteur. Le glycanne contient des informations supplémentaires modulant la fonction biologique ou déterminant la durée de vie de la molécule acceptrice ou sa destinée.

Туре	de Aminoacide	Monosaccharide
glycosylprotéine	S	
<i>N</i> -glycoprotéines		
	Asn	β- <u>D</u> -GlcNAc
	Asn	β- <u>D</u> -GlcNAc
	Asn	α/β- <u>D</u> -Glc
	Asn	<u>L</u> -Rha
<i>O</i> -glycosylprotéines		
Type mucine	Ser/Thr	α- <u>D</u> -GalNAc
Type intracellulaire	Ser/Thr	β- <u>D</u> -GlcNAc
Type levures	Ser/Thr	α- <u>D</u> -Man
Tissus de rat	Ser/Thr	α- <u>L</u> -Fuc
Type protéoglycanne	Ser	β- <u>D</u> -Xyl
Type collagène	Ser	α- <u>D</u> -Gal
Type facteur IX	Ser	β- <u>D</u> -Glc
Type collagène	HO-Lys	β- <u>D</u> -Gal
Type extensine	HO-Pro	β- <u>L</u> -Araf
Type algue	HO-Pro	β- <u>D</u> -Gal
Type glycogénine	Tyr	α- <u>D</u> -Glc
Type S-layer	Tyr	β- <u>D</u> -Glc

Tableau VIII. Liaisons glucide-peptide existant dans les glycoprotéines

Les *N*- et *O*-glycannes présentent plusieurs rôles biologiques: (i) ils stabilisent la structure conformationnelle des protéines, pendant et après leurs biosynthèse, par des interactions glycanne-glycanne ou glycanne-protéine, (ii) ils contrôlent la protéolyse de prépro-protéines dans des formes actives, (iii) ils protègent les protéines contre les enzymes protéolytiques, (iv) ils masquent les épitopes peptidiques modulant ainsi la reconnaissance des protéines virales par le système immunitaire, (v) ils contrôlent le temps de vie des glycoprotéines et des cellules circulantes, (vi) ils sont des récepteurs de micro-organismes: virus, champignons, bactéries, (vii) ils sont impliqués dans la reconnaissance et dans l'adhésion cellulaire, (viii) ils induisent plusieurs maladies, appelé glycoprotéinoses" dans le cas de déficit en enzymes lysosomiques du catabolisme.

# 2. Identification des glucides

#### 2.1. Généralités

En tenant compte de la grande diversité des rôles et des implications des sucres dans la plupart de métabolismes, l'identification structurale est importante. Un "schéma" général pour l'identification structurale des sucres montre la nécessité d'établir:

(i) l'identité et le nombre des constituants monosaccharidiques;

(ii) la séquence des monosaccharides, incluant la position des liaisons glycosidiques;

(iii) le type et le nombre de substituants non-glucidiques;

Une gamme très variée des méthodes nous permet résoudre ces problèmes de structure en plusieurs temps

- libération et isolation de la partie glucidique par des méthodes chimiques et/ou enzymatiques, de la partie protéique ou lipidique.

- analyse par des méthodes physiques et chimiques de la structure primaire des glycannes.

#### 2.2. Libération de la partie glycosidique

#### 2.2.1. Les N-glycannes

La libération des chaînes N-glycanniques conjuguées à des résidus d'asparagine peut se réaliser par des méthodes enzymatiques, à l'aide de l'enzyme peptide(N-(N-acétyle- $\beta$ - $\underline{D}$ glucosamine)) asparagine amidase (PNGase) et par des méthodes chimiques, à l'aide de l'hydrazine anhydre. Par cette technique chimique, la liaison acétamid et glycosylamine (Figure 34A) sont coupées. En reste cette technique chimique est très délicate car: (i) elle induit des modification sur la N-acéthylglucosamine terminale augmentant l'hétérogénéité de la molécule, (ii) elle libère aussi les chaînes de O-glycannes, (iii) elle élimine des substituant non-glucidique comme les groupement acétyles de la N-acéthylglucosamine et de l'acide Nacéthylneuraminique. En général, si la méthode est appliquée dans des conditions rigoureuses et adaptées pour chaque type de glycoprotéines, les désavantages, ci-dessus mentionnés, sont beaucoup diminués.

#### 2.2.2. Les O-glycannes

La liaison glycosidique est parfaitement stable en milieu alcalin, sauf dans le cas où l'aglycone présente des caractéristiques structurales qui labilisent cette liaison glycosidique. Dans les glycoprotéines, ce cas se rencontre lorsque la liaison glycosidique est en position  $\beta$  d'un carbonyl d'une liaison amide ou ester: la  $\beta$ -élimination a lieu pour les liaisons *O*-glycosidiques entre un sucre et un  $\beta$ -hydroxy-amino-acide tel que la sérine ou la thréonine, en milieu légérement basique. Il s'agit d'une réaction catalytique qui ne consomme pas d'ions HO<sup>-</sup> (Figure 34B).



Figure 34. Mécanisme général en (A) de l'hydrazinolyse, et en (B) de la  $\beta$ -élimination. R, aminoacide; R', glycanne.

# 2.3. Analyse structurale des glycannes

L'analyse structurale des glycannes nécessite l'application d'un ensemble très complexe des techniques chimiques (chromatographie en phase gezeuse, chromatographie en couces minces...) et physiques (résonance magnétique nucléaire et spectromètrie de masse). Dans le cadre de ce chapitre nous nous focalisons sur les techniques physiques d'analyse structurale, car elles permettent une caractérisation complète de la structure analyse.

#### 2.3.1. La technique Résonance Magnétique Nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une des techniques spectroscopiques efficace et non-destructice qui permet d'accéder à la structure complexes des macromolécules biologiques, dans notre cas de caractériser des structures glucidiques. Elle peut, en principe, fournir toutes les informations nécessaires à l'établissement de la structure complète d'une molécule glucidique, c'est à dire, la **nature et la séquence des monosaccharides**, la **position des liaisons** glycosidiques et leur **anomérie**. Elle est devenue une partie incontournable de la méthodologie utilisée pour l'analyse structurale de chaînes glycanniques.

Le principe de la méthode repose sur le magnétisme nucléaire. Les noyaux de certaines atomes (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C ou <sup>31</sup>P) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique: le spin. Les noyaux possédant un spin chez les glucides et intéressants pour la RMN sont les noyaux <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P car ils possèdent un noyau à nombre quantique de spin I =  $\frac{1}{2}$ .

Chaque signal du spectre est caractérisé par un certain nombre de paramètres, chacun d'eux apportent des informations spécifiques sur l'environnement structural des protons correspondants. Ainsi, le spectre total est caractéristique de la structure de la molécule glucidique. Les paramètres de RMN les plus significatifs pour la détermination de la structure primaire d'une molécule sont donnés dans le tableau IX:

Paramètre RMN	Symboles	Unités	Informations structurales
Déplacement chimique	δ	ppm	Densité électronique relative
Constante de couplage	J	Hz	Nombre de protons voisins
Intensité	-	-	Nombre de protons ayant le même δ
Largeur de raie	-	Hz	Mobilité du proton: flexibilité de la structure

Tableau IX: Paramètres de RMN

Le déplacement chimique définit la localisation du signal le long de l'axe horizontal. Il est mesuré par rapport à un composé de référence et il est lié principalement à la structure chimique de la molécule.

Le couplage spin-spin ou couplage direct désigne l'effet du champ magnétique crée par un noyau X sur un noyau A. Par exemple, le signal d'un proton anomère d'un monosaccharide donne un signal sous la forme d'un doublet. L'intensité d'un signal (surface du signal) dépend du nombre de noyaux ayant le même déplacement chimique.

La méthodologie d'analyse des molécules glucidiques par RMN du <sup>1</sup>H est assez compliquée, car les molécules glucidiques possèdent plusieurs protons dont certains sont impliqués dans des liaisons C-H et d'autres dans les groupements O-H. Chaque proton possède son propre environnement et, sa propre densité électronique. Pour déterminer la structure primaire d'une molécule glucidique par RMN, seuls les protons directement liés aux carbones sont intéressants. Ceux présents dans les groupements O-H sont "échangeables". Ils ne possèdent pas un environnement bien défini du fait qu'ils peuvent s'échanger avec les protons du solvant et donner ainsi un pic mal défini dans le spectre RMN. Pour cette raison, l'échantillon, avant d'être analysé, est dissous dans  $D_2O$ . Les groupements O-H sont alors convertis en O-D, éliminant ainsi les signaux O-H sur le spectre provenant de la molécule glucidique et des molécules d'eau.

La réalisation d'un spectre proton à une dimension est systématique. Elle permet de connaître plusieurs paramètres. Deux cas peuvent se présenter:

(1) la molécules a été déjà isolée et, dans ce cas, les déplacement chimiques de ses protons sont strictement identiques à ceux déjà publiés et qui figurent dans les banques de données. Dans ce cas, l'analyse est terminée;

(2) la molécules est nouvelle et la comparaison des déplacements chimiques avec la banque de données ne permet pas d'identifier les monosaccharides et les liaisons. Dans ce cas, les analyses de RMN doivent être approfondies par la réalisation d'expériences à deux dimensions. Les techniques COSY homo- et hétéronucléaire et ROESY permettent, dans la majorité des cas, d'identifier les monosaccharides présents dans l'oligosaccharide et d'élucides la structure primaire de ce dernier.

#### a) Détermination du nombre et de la nature des monosaccharides:

Le spectre des protons, <sup>1</sup>H, à une dimension (Figure 35) apporte de nombreux renseignement comme:

(i) la valeur des déplacements chimiques de chaque proton identifiable;

(ii) le nombre de résidus monosaccharidiques (nombre de protons anomères);

(iii) la présence ou l'absence d'acide sialique (présence des protons anomères);

(iv) le nombre des résidus d'osamines (nombre de raies correspondants aux groupement acétamids), de fucose (nombre de doublets caractéristiques dans les hautes champs);

(v) accessoirement, l'état de pureté de la molécule (intensité relative des signaux).

141



**Figure 35**. Principe de l'analyse des spectres de <sup>1</sup>H-RMN en utilisant la méthode des "Structural Reporter Groups".

#### b) Séquence et liaisons:

La séquence des monosaccharidiques peut être déterminée à partir de différentes techniques homo- et hétéronucléaires:

- le COSY homonucléaire permet de visualiser les constantes de couplage entre 2 protons par un transfert de la magnétisation d'un proton sur un proton voisin. Par cette méthode, on peut donc mesurer toutes les constantes de couplage entre les différents protons et d'identifier les monosaccharides;

- la technique heteronucléaire HMQC (Heteronuclear MultiQuantum Coherence) permet de corréler chaque proton avec le carbone sur lequel il est attaché, ce qui permet d'identifier et de déterminer le déplacement de la majorité des protons de la molécule et des carbones correspondants. La connaissance des déplacement chimiques des atomes de carbone permet de déterminer la substitution apportant des informations sur la nature des liaisons et substitutions diverses;

- la méthode hétéronucléaire HMQC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) permet d'obtenir les corrélations et les couplages entre un proton et le carbone voisin. Cette

142

information est d'autant plus importante qu'elle permet de déterminer la séquence de l'oligosaccharide;

- la méthode hétéronucléaire ROESY (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY) permet de visualiser les corrélations dipolaires proton-proton entre deux voisins proches de plus 5 Å. Les corrélations peuvent être d'origine intra- ou extra-résidus. Les interactions interrésisdus sont plus intéressantes puisqu'elles permettent de conforter les résultats concernants la structure primaire de l'oligosaccharide-alditol.

#### 2.3.2. Spectrométrie de Masse

La spectrométrie de masse réunit une "famille" de technique, dont chacune est fondée sur un principe différent en ce qui concerne la source d'ionisation et l'analyseur. Les performances d'un instrument (sensibilité, résolution, précision et domaine de masse) vont dépendre de sa configuration. Les techiniques de désorption/ionisation bombardement d'atomes rapides (FAB), électrospray (ES), matrice assistée par laser désorption (MALD) permettent l'analyse de substrats polaires de haute masse moléculaire et sont un complément aux techniques conventionnelles: impact électronique (EI) et ionisation chimique (CI) utilisées pour les substrats volatils.

Le principe de la SM est fondé sur la technique analyse des fragments chargés, issus d'une molécule soumise à un bombardement électronique. A cet effet, un échantillon liquide est volatilisé sous vide dans un réservoir chauffé. Il pénètre dans une chambre d'ionisaton où il est bombardé par un courant d'électrons d'énergie 70 eV ( $1 \text{ eV} = 23 \text{ kcal mole}^{-1}$ ). L'énergie absorbée par les molécules provoque le départ d'un électron et conduit à l'obtention de l'ion moléculaire M<sup>+</sup>. Cet ion se fragmente ensuite en ions plus petits. Tous les ions chargés positivement sont accélérés sous un potentiel de 2000 volts, puis déviés en fonction de leur rapport m/e dans un champ magnétique ou encore dans un champ quadripolaire. Les ions sont

ensuite collectés sous une forme d'un courent électrique qui sera amplifié et enregistré. On peut ensuite étudier ces ions un à un en fonction du temps de rétention du produit analysé.

En général, dans le cadre de la SM, ont été développées les techniques d'ionisation sivantes:

#### (i) Impact électronique (EI)

L'ionisation par impact électronique est une technique de routine pour analyser les monosaccharides. L'interaction des électrons avec les molécules produit des ions moléculaires de type radical cation  $M^{+\bullet}$ . Dans les conditions standards d'analyse, pour des électrons ayant une énergie de 70 eV, un excès d'énergie est, de plus, transféré vers les ions formés et provoque leur fragmentation spontanée (réactions 1, 2 et 3):

Réaction 1:  $\mathbf{M} + \mathbf{e}^{-} \rightarrow \mathbf{M}^{+\bullet} + 2 \mathbf{e}^{-}$ Réaction 2:  $\mathbf{M}^{+\bullet} \rightarrow \mathbf{F}^{+} + \mathbf{R}^{\bullet}$ Réaction 3:  $\mathbf{M}^{+\bullet} \rightarrow \mathbf{F}^{+\bullet} + \mathbf{N}$ 

M, F, R et N désignent, respectivement, la molécule d'échantillon, un fragment, un radical ou une molécule neutre.

Des études systématiques sur la fragmentation des dérivés alditol acétates partiellement méthylés et des méthyl-glycosides partiellement méthylés et acétylés mettent en évidence la possibilité de caractériser le type de substitution des monosaccharides par la présence de fragments marqueurs.

#### (ii) Ionisation Chimique (CI)

L'ionisation chimique consiste à produire des ions par collision de la molécule à ioniser avec des ions primaires présents dans la source. Le but est donc de provoquer des collisions ions-molécules. L'avantage de l'ionisation chimique est de fournir un spectre où l'ion moléculaire est facilement reconnaissable. Lors de cette ionisation, un gaz réactant, en général de l'ammoniac, du méthane ou de l'isobutane pour le mode positif, est introduit dans la source. Des analyses en mode négatif peuvent être réalisées en utilisant le mélange méthane/hémioxyde d'azote (CH<sub>4</sub>/N<sub>2</sub>O). Le faisceau d'électrons provoque l'ionisation du gaz réactant (**R**). L'ion ainsi produit entrera en collision surtout avec d'autres molécules du gaz réactif, formant ainsi par une série de réactions un plasma d'ionisation. Des ions de la substance à analyser se formeront par réaction chimique avec les ions de ce plasma, donnant ainsi lieu à des réactions de transfert de protons, d'addition, de transfert de charges, etc (réactions 4 et 5).

> Réaction 4:  $\mathbf{NH}_3 + \mathbf{e}^- \rightarrow \mathbf{NH}_3^{+\bullet} + 2 \mathbf{e}^-$ Réaction 5:  $\mathbf{NH}_3 + \mathbf{NH}_3^{+\bullet} \rightarrow \mathbf{NH}_4^+ + \mathbf{NH}_2^{\bullet}$

L'ionisation des molécules basiques (amines) résulte d'une réaction acide-base en phase gazeuse entre les ions du gaz réactant et l'échantillon (**M**) (réaction 6).

#### Réaction 6 : $M + NH_4^+ \rightarrow [M + H]^+ + NH_3$

Les molécules polaires et celles susceptibles de former des liaisons hydrogène, mais peu ou pas basiques, forment un adduit ion-molécules (réaction 7).

Réaction 7: 
$$\mathbf{M} + \mathbf{NH_4}^+ \rightarrow [\mathbf{M} + \mathbf{NH_4}]^+$$

Dans les cas intermédiaires, on observera les deux ions  $[M + NH_4]^+$  et  $[M + H]^+$ .

Cette technique consiste à focaliser sur un échantillon un faisceau d'ions ou de molécules neutres. En FAB (Fast Atom Bombardement), l'échantillon est solubilisé dans une matrice de faible tension de vapeur et bombardé par un jet d'atomes de gaz neutre de forte énergie cinétique (argon ou xénon avec une énergie des particules du faisceau primaire allant de 2 à 8 keV), y provoquant une onde de choc qui va expulser de la solution des ions et des molécules. Les ions sont accélérés par différence de potentiel vers l'analyseur. En fin d'accélération, l'énergie cinétique acquise est donc égale à:  $Ec = 1/2 \text{ mv}^2 = zV$  ou m/z =  $2V/v^2$ , où z est le nombre de charge élémentaire, V la tension d'accélération, m la masse moléculaire de l'on et v sa vitesse.

Cette méthode est très efficace pour produire des ions moléculaires à partir de substances polaires et/ou thermolabiles (peptides, glycannes). Ces espèces moléculaires résultent d'une protonation  $[M + H]^+$  ou d'une cationisation par un métal alcalin  $[M + cation]^+$  en mode positif, ou d'une déprotonation  $[M-H]^-$  en mode négatif.

Les spectres FAB-MS des oligosaccharides dérivés livrent des informations structurales importantes, en particulier sur la séquence des monosaccharides constitutifs. Les éléments structuraux qui peuvent être déterminés par FAB-MS sont le degré d'hétérogénéité et le type de glycosylation des glycoprotéines, les sites de glycosylation au niveau de la chaîne peptidiques; les points de branchement dans les glycoconjugués, le nombre et la longueur des antennes, la présence de groupements sulfate, phosphate, la séquence complète de chaînes glycanniques.

#### (iv) Désorption laser assistée par matrice (MALD)

Cette méthode, MALD (Matrix Assisted Laser Desorption), consiste à mélanger la substance à analyser à une solution de petites molécules organiques, appelée matrice, possédant une forte absorption à la longueur d'onde du laser. Le mélange est irradié par un faisceau laser UV (337 nm pour un laser à azote) qui libère une importante quantité d'énergie dans la phase condensée. Il en résulte la désorption des ions formés par transfert de protons entre la matrice photo-excitée et la substance analysée. Le choix de la matrice est très important et différents composés peuvent nécessiter différentes matrices. Elle assure plusieurs fonctions: absorber l'énergie du laser, isoler les molécules de l'échantillon des unes des autres pour éviter la formation de complexes qui empêcheraient la formation d'ions moléculaires. Elle doit être capable d'ioniser les composés avec une grande efficacité et une fragmentation minimale.

Cette technique permet l'analyse de biomolécules de masses moléculaires élevées telles que les protéines et les glycoprotéines. Par rapport à la FAB, la technique de désorption par le laser a l'avantage de permettre l'analyse de composés de haute masse moléculaire, de molécules complexes et d'être plus simple d'emploi et beaucoup plus sensible (détecte ion de quelques picomoles ou fentomoles avec une précision de masse supérieure à 0,1%).

#### (v) Electrospray

La particularité de cette technique de spectrométrie de masse réside dans l'utilisation d'une source d'ions à la pression atmosphérique. L'efficacité d'ionisation est de  $10^3$  à  $10^4$  fois plus grande que dans une source à pression réduite. L'application principale est l'analyse de glycoprotéines et de glycopeptides. Cette technique est également applicable à des molécules ne possédant aucun site ionisable grâce à la formation d'adduits sodique, potassique, ammonium ou autre.

# 3. Approche méthodologique

Dans ce chapitre, le travail a été focalisé sur l'identification structurale des fractions isolées de *Fusarium oxysporum* sp. qui induisent des **réactions physiologiques significatives de défense** (Cf. Chapitre 1, A 4) sur suspensions de cellules de végétaux (*Rubus*).

Deux fractions, nommées B1 et B3, isolées de *Fusarium oxysporum* sp. (Figure 23 B) ont été sélectionnése sur la base de leur potentiel d'activité biologique. Il s'agit de fractions qui, utilisées à une échelle microanalytique pendant un temps court d'élicitation (en général 30 min), sont capables d'induire chez des suspensions de cellules: (i) l'activation de  $\beta$ -D-glycohydrolase (Figure 31 A et B), l'activation de la PAL (Figure 28 A) ou l'activation d'IP (Figure 29 B).

Les techniques de séparation, purification et caractérisation que nous avons utilisées afin de déterminer la structure des glycannes de ces 2 fractions conduits sur les méthodes suivantes:  $\beta$ -élimination, chromatographie de tamisage moléculaire et d'échange d'ions dans des systèmes HPLC et FPLC, TLC, méthodes colorimétriques d'identification des sucres, chromatographie en phase gazeuse, RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) et SM.

# B. Caractérisation de la glycoprotéine B1 isolée de *Fusarium oxysporum*

L'analyse structurale de la fraction glycoprotéique B1 (Figure 23 B) isolée de *Fusarium oxysporum* sp., obtenue par HPLC sur une colonne HW 40F/60F équilibrée avec NaNO<sub>3</sub> 1 x  $10^{-1}$  M, a été effectuée dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1 (UMR n°111 du CNRS). Nous rappelons que cette fraction possède un pouvoir éliciteur PAL (R 20) (Figure 28 A) et induit l'activation d'un inhibiteur de l' $\alpha$ -chymotrypsine (Figure 29 B).

# 1. Caractérisation préliminaire

Cette caractérisation est fondée sur des analyses effectuées par chromatographie en phase gazeuse, chromatographie d'échange d'ions dans un système FPLC et HPLC.

## 1.1. Chromatographie en phase gazeuse

La composition et le rapport molaire en monoaccharides de la glycoprotéine B1 est réalisée sur des dérivés méthylglycosylés et triméthylsililés (Cf. Matériels et Méthodes, B 9.2.6) obtenus après la méthanolyse et la triméthylsilylation de la partie glycannique du B1 (Figure 36). Les résultats présentés dans le tableau X montre la présence de sucres neutres (mannose: temps de rétention de 30,43 et 31,77 min.; glucose: Tr de 35 et 36.19 min; galactose: à 30,6; 31,77; 32,53; 33,83 min), des hexosamines (glucosamine à 44,42 min et galactosamine à 42,89 min.), des acides uroniques (35,33 et 35,73 min) et un pic de lactone à 24,11 et 27 min. Le pourcentage de glucides totaux dans cette fraction glycoprotéique est de 20%, estimation faite par rapport au témoin interne (méso-inositol).



Figure 36. Chromatogramme en phase gazeuse des méthylesters triméthylsyl des différents monosaccharides libérés par méthanolyse acide de la fraction glycoprotéique B1. Man, mannose; Gal, galactose; Glc, glucose; GlcAU, acides uroniques; GalNAc, glucosamine; GlcNAc galactosamine.

Tableau X	. Composition	molaire en	monosaccharides	de la	fraction	glycopro	otéique B1.
-----------	---------------	------------	-----------------	-------	----------	----------	-------------

	Gal	Man	Gle	GalNAc	GlcNAc	GluA	Glucides totaux
B1	1	6.4	1.93	0.03	0.27	0.15	20

# 1.2. Chromatographie d'échange d'ions dans un système FPLC

Nous avons ensuite analysé la fraction glycoprotéique B1 à l'aide d'une colonne d'échangeur d'anions (ammonium quaternaire, Mono Q; Cf. Matériels et Méthodes, B 9.2.4)

Les composants de la fraction B1 chargés positivement sont élués au volume mort de la colonne avec le tampon Tris HCl 0,2 M, pH 8, tandis que les composants chargés négativement sont retenus et élués ultérieurement avec un gradient linéaire de NaCl de 0 à 0,5 M dans le tampon Tris HCl 0,2 M (le débit 1 mL min<sup>-1</sup>). On peut observer une homogénéité relative de cette fraction glycoprotéique B1 (Figure 37) qui ne peut être fractionnée en plusieurs composants par cette technique.



Figure 37. Chromatographie dans un système FPLC de la fraction B1 (b) sur une colonne Mono Q, avec un gradient linéaire de NaCl de 0 à 0,5 M dans le tampon Tris HCl 0,2 M (a).

# 2. Analyse structurale

# 2.1. Libération des O-glycannes

La fraction glycoprotéique B1 a été soumise à un processus de  $\beta$ -élimination réductrice (Cf. Matériels et Méthodes, B 9.2.7). Par cette méthode, seul les glycannes liés O-glycosidiquement sont libérés sous forme d'oligosaccharides-alditol, la liaison N-glycosidique n'étant pas affectée. Le milieu réactionnel est concentré par évaporation sous vide en présence de méthanol et dessalé ensuite sur une colonne de Bio-Gel P<sub>4</sub>. Les composants glucidiques sont repérées en présence du réactif acide sulfurique-orcinol et rassemblées afin d'être soumis à d'autres expériences de séparation, isolement et analyse.

### 2.2. Séparation et purification de composants glycosylés

Le mélange des composants glucidiques (O-glycannes, glycoprotéines N-glycosylées), issus de la  $\beta$ -élimination de la fraction B1, est soumis à un fractionnement dans un système de chromatographie d'échange d'ions (Cf. Matériels et Méthodes, B 9.2.2.) réalisé avec des colonnes de Dowex 50 x 2 (35 x 2 cm) et Dowex 1 x 2 (35 x 2 cm).

#### **2.2.1.** Composants neutres

La fraction de glucides éluée et qui n'est pas retenue sur les deux types de colonnes de Dowex, a été appelée fraction neutre (N), car elle présente majoritairement des composants neutres. Cette fraction a été dessalée à l'aide d'une colonne de Bio-Gel P<sub>4</sub> (108 x 2,3 cm, débit 15 mL h<sup>-1</sup>) et ensuite analysée par chromatographie en couche mince à l'aide du solvant nbutanol/ acide acétique/ eau (2:1:1,5 v/v). La présence des glucides a été mise en évidence par un réactif à l'orcinol sulfurique (Figure 38). Le chromatogramme obtenu à partir de la fraction neutre montre une hétérogénéité importante par la présence de 3 fractions majeures (N<sub>I</sub>, N<sub>II</sub> et N<sub>III</sub>) ayant des degrés de polymérisation (DP) différents. Provisoirement et en fonction des contrôles appliques, nous pouvons estimer que les fractions N<sub>I</sub>, N<sub>II</sub> et N<sub>III</sub> possèdent des DP de 8-9, 6 et 3-4, respectivement.



Figure 38. Chromatographie en couche mince des oligosaccharides neutres libérés par  $\beta$ élimination de la fraction glycoprotéique B1 isolée du mycélium de *Fusarium oxysporum* (1) en présence de témoins oligosaccharidiques (2) à l'aide du solvant A. Révélation des glucides à l'aide d'orcinol sulfurique. DP, dégrées de polymèrisation.

Chaque fraction est re-fractionnée dans un système HPLC (colonne  $C_{18}$ , élution par l'eau à un débit 0,5 mL min<sup>-1</sup>, détection à 206 nm; Cf. Matériels et Méthodes, § B\* 9.2.3.). Nous avons de cette manière obtenu 7 sous-fractions (Figure 39): (i) la fraction  $N_I$  a donné 2 pics,  $N_I$ a et  $N_I$ b qui sortent à 27,17 min. et 28,45 min. respectivement;

(ii) la fraction N<sub>II</sub> a fourni 2 pics N<sub>II</sub>a et N<sub>II</sub>b sortant à 32,58 et 33,38 minutes;

(iii) la fraction N<sub>III</sub> s'est résolue en 3 pics: N<sub>III</sub>a (36,44 min.), N<sub>III</sub>b (37,50 min.) et N<sub>III</sub>c

(38,12 min.).

Les pics séparés sont concentrés, lyophilisés et préparés pour des expériences de RMN, GLC et SM.



Figure 39. Analyse chromatographique dans un système HPLC à l'aide d'une colonne hydrophobe  $C_{18}$  des sous-fractions oligosaccharidiques neutres, (A) fraction  $N_{II}$ , (B) fraction  $N_{II}$  et (C) fraction  $N_{III}$ , isolées par CCM (Figure 38) à partir de la fraction N. La détection a été réalisée à 206 nm.

#### 2.2.2. Composants acides

Les composants acides retenus sur la colonne de Dowex 1 x 2, désormais appelés A, sont élués dans un gradient isocratique d'acétate de pyridine (10mM, 20mM, 50mM, 100mM, 200mM, 500 mM, 1M et 2 M). Les fractions acides éluées, appelé  $A_{10}$ ,  $A_{20}$ ... $A_2$  d'après la concentration de l'acétate de pyridine qui les a décrochées, sont concentrées par évaporation sous vide en présence du méthanol. Elles sont ensuite dessalées sur une colonne de Bio-Gel P<sub>4</sub> et lyophilisées. L'homogénéité de ces fractions est mise en évidence par chromatographie en couche mince, dans le solvant A (Cf. Matériels et Méthodes, 9.2.5). La présence de sucres a été mise en évidence par le réactif à l'orcinol sulfurique (Figure 40). Les fractions acides sont homogènes et ont donc utilisées pour les études en RMN, GLC et SM.



Figure 40. Chromatographie en couche mince des oligosaccharides acides libérés par  $\beta$ -élimination de la fraction B1 (1) à l'aide du solvant A. Révélation de la partie glucidique est réalisée par le réactif à l'orcinol sulfurique. A<sub>10</sub>, A<sub>20</sub>...A<sub>2</sub> sont des fractions acides éluées par l'acétate de pyridine à des concentrations: 10mM, 20mM, 50mM, 100mM, 200mM, 500 mM, 1M et 2 M.

#### 2.2.3. Composants basiques

Les composants basiques retenus sur la colonne de Dowex 50 x 2 sont élués à l'aide de l'acétate de pyridine (500mM) et constituent une fraction  $B_{500}$ . Ensuite ils sont concentrées par une évaporation sous vide en présence du méthanol, dessalées à l'aide d'une colonne de Bio-Gel P<sub>4</sub> et lyophilisées. La présence de sucres a été révélée par un réactif à l'orcinol sulfurique.

### 2.3. Etude de la structure de la fraction $N_Ia$

La fraction N<sub>I</sub>a a été choisie d'être analysée dans une première étape en raison de la quantité et de la pureté obtenue. Cette fraction a été isolée par HPLC sur une colonne C<sub>18</sub> de la fraction N<sub>I</sub> isolée par  $\beta$ -élimination réductrice de la glycoprotéine B1 (Figure 39).

#### 2.3.1. Analyse par SM

Les masses moléculaires de la fraction  $N_la$  ont été mesurées par spectrométrie de masse selon la méthode de désorption lasser assistée par matrice de temps vol (MALDI), par un appareil Vision 2000 (Finnigan MAT, Hemmel). La mesure de la masse moléculaire a été réalisée avec les oligosaccharides-alditols de la fraction  $N_la$ .

L'analyse de la fraction N<sub>I</sub>a par spectrométrie de masse montre une série de pics espacés de 162 u.m.a. Chaque série de pics est constituée d'un doublet ( $\Delta m$  22), lié à la présence d'un ion [M + Na]<sup>+</sup> ou de deux atomes de sodium [M-H + 2 Na]<sup>+</sup>. En attribuant aux unités monosaccharidiques les masses respectives de 180 (hexose), 182 (hexitol) et de 194 (acide glucuronique), trois constituants majeurs ont pu être caractérisés, dont la composition molaire est respectivement la suivantes: 2 GlcA, 2 Hex, 1 Hex-ol; 2 GlcA, 3 Hex, 1 Hex-ol et 2 GlcA, 4 Hex, 1 Hex-ol (Tableau XI)

Ion speudomoléculaire		GlcA	Hex	Hex-ol	Masse mésurée	
881	$[M + Na]^+$	2	2	1	858	
903	$\left[M-H+2 \text{ Na}\right]^+$	2	2	1	858	
1043	$[M + Na]^+$	2	3	1	1020	
1065	$\left[M-H+2 \text{ Na}\right]^+$	2	3	1	1020	
1205	$[M + Na]^+$	2	4	1	1182	
1227	$[M + Na]^+$	2	4	1	1182	

 Tableau XI. Mesure de la masse moléculaire des oligosaccharides alditol par

 spectrométrie de masse (MALDI)

# 2.3.2. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse et Spectrométrie de Masse (CPG-SM)

Les oligosaccharides alditols libérés par  $\beta$ -élimination réductrice ont été perméthylés par la méthode à la soude puis hydrolysés par méthanolyse acide (méthanol/HCl 0,5 M, 80°C, 24h). Les éthers méthylique libérés sont ensuite acétylés par le mélange pyridine/ anhydride acétique (1:1 v/v). Les éthers méthyliques partiellement acétylés sont séparés par chromatographie phase gazeuse et identifiés par spectrométrie de masse d'impact électronique.

La nature des monosaccharides a été définie où deux hexitols ont été identifiés par méthylation: 1,3,4,5 Me hexitol laissant suggérer un monosaccharide substitué dans la position 2 et 6, respectivement et 1,3,5 Me hexitol indiquant la présence d'un monosaccharide terminal 3 fois substitué.

Notons que ont été identifiés dans la fraction  $N_{Ia}$  méthylée 6 monosaccharides sous forme pyranose (Figure 41).



Figure 41. Spectre CGP-MS des hexitols méthylés et partiellement acétylés dérivés de la fraction  $N_Ia$ .

.

#### 2.3.3. Analyse par RMN

Les analyses par RMN ont été réalisées sur un appareil Bruker ASX 400 WB avec, comme standard la 4,4'-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate de sodium dont le déplacement chimique est de 2,225 ppm (Cf. Matériels et Méthodes, B 9.1.1). Un spectre HOHAHA et ROESY a été également enregistré, en utilisant les séquences de pulse standard Bruker.

L'analyse RMN de la fraction N<sub>l</sub>a a mis en évidence une série de 10 signaux correspondant aux protons anomères du mélange d'oligosaccharides. Cinq de ces protons sont identifiés comme les protons anomères de résidues de β-mannoses. En effet, le spectre HOHAHA a permis de mesurer les constantes de couplage entre chaque proton de l'hétérocycle (J<sub>1,2</sub> de 1 Hz; J<sub>2,3</sub> de 2 Hz; J<sub>3,4</sub> de 8 Hz; J<sub>4,5</sub> de 8 Hz). Ces paramètres sont caractéristiques de protons respectivement en position équatoriale (H-2) et axiale (H-3, H-4, H-5). En outre, un effet NOE entre H-1 et H-5 est observé qui confirme la position axiale du proton anomère (anomère  $\beta$ ). Trois protons anomères de résidus de  $\beta$ -mannose possèdent des glissements chimique de  $\delta$  à 4,600; 4,618 et 4,670 ppm, respectivement, et leurs protons H-2 sans fortement blindés à 3,90 et 4,20 ppm environ. Ces unités de mannose sont donc en position terminale non-réductrice. Deux autres résidud de β-mannose possèdent des protons H-1 et H-2 très déblindés: δH-1 à 4,72; δH-2 à 4,21 ppm et δH-1 à 4,60; δH-2 à 4,16 ppm, respectivement. Ces deux résidus de  $\beta$ -mannose sont donc en position interne et substitués en position C-2. D'ailleurs, deux résidus de  $\beta$ -mannose sont reliés entre eux sur le spectre ROESY par un contact H-1  $\rightarrow$  H-2. Deux autres résidus d'a-mannose ont également été identifiés. Toutefois, l'absence de contact NOE ne permet pas de les situer au sein des oligosacharides alditols. Des résidus de  $\beta$ -Galf ont été identifiées dans le spectre HOHAHA, sur la base du couplage H-1, H-2 (< 1 Hz) et le déblindage des protons H-2 ( $\delta$  à 4,36 ppm) et H-3 (δ à 4,18 ppm). Néanmoins, aucun élément du spectre ne permet d'établir la nature de sa substitution qui, au demeurant, a été démontrée précédemment par méthylation.

Enfin, deux signaux à  $\delta$  à 5,07 et 5,17 ppm peuvent être attribués aux protons anomères de l' $\alpha$ -glucose et de l'acide  $\alpha$ -galacturonique. Les protons H-1 des résidus de  $\beta$ mannose terminaux ( $\delta$  à 4,600 et 4,618 ppm) présentent des pics de corrélation NOE avec les protons H-4 du glucose et de l'acide uronique.

En conclusion sur la base de ces résultats et tenant en compte de la spectrométrie de masse, de l'analyse par méthylation et du fait que l'hexitol dérivé d'un sucre pyranique, un schéma général de structure peut être proposé (Figure 42).



Figure 42. Structure primaire probable, obtenue après des analyses de SM et RMN, de la fraction N<sub>I</sub>a issue par  $\beta$ -élimination à partir de la fraction glycoprotéique B1. X et X' peuvent être des résidus de  $\alpha$ -<u>D</u>-Glc*p*,  $\alpha$ -<u>D</u>-GlcA ou  $\alpha$ -<u>D</u>-Man*p*. Conjugués (1) ou non au squelette de base.

# C. Caractérisation de la fraction oligosaccharidique B3 isolée de *Fusarium oxysporum* sp.

L'analyse structurale de la fraction oligosaccharidique B3 (Figure 23 B) isolée de *Fusarium oxysporum* sp. a été effectuée au CERMAV de Grenoble. Rappelons que cette fraction à été séparée dans un système HPLC à l'aide d'une colonne HW 40F/60F en présence d'un tampon NaNO<sub>3</sub> 1 x  $10^{-1}$  M à partir de la fraction brute B. La fraction B3 possède un pouvoir éliciteur PAL (R 18) (Figure 28 A).

# 1. Etude préliminaire

# 1.1. Chromatographie en couche mince

Dans un premier temps, la fraction B3 a été analysée par chromatographie en couche mince à l'aide du solvant A (Cf. Matériels et Méthodes, B 9.2.5) et d'oligosaccharides standards, de DP différents. La présence de sucres a été mise en évidence sur les plaques de silice par la méthode à l'orcinol sulfurique. D'après la migration de la fraction B3, on peut estimer que son DP, par rapport aux témoins utilisés est de 2-3 (Figure 43). L'analyse fine a été poursuivie par chromatographie en phase gazeuse.



**Figure 43**. Chromatographie en couche mince de la fraction B3 (1) en présence des standards oligosaccharidiques (2) à l'aide du solvant A. La révélation de la partie glucidique est réalisée à l'aide d'un réactif à l'orcinol sulfurique. DP, degrés de polymérisation.

# 1.2. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse des acétates d'alditols (Cf. Matériels et Méthodes, B 9.2.6) dérivés de la fraction oligosaccharidique B3 nous a permis d'identifier les monosaccharides neutres suivant: seulement **mannose** (Tr à 12, 260) et **glucose** (Tr à 14,335), dans un rapport molaire de **1,3: 1** (Figure 44).



Figure 44. Chromatogramme en phase gazeuse des acétates d'alditols dérivés de la fraction B3.

# 2. Analyse structurale

# 2.1. Analyse par SM

Les masses moléculaires de la fraction B3 ont été mesurées par spectrométrie de masse selon la méthode FAB-SM sur une matrice de glycérol bombardée par Xe (9kV) à l'aide d'un un spectromètre Nermag R 1010C (Cf. Matériels et Methodes, B 9.1.2).

L'analyse de la fraction B3 par spectrométrie de masse montre une série de pics espacés de 162 u.m.a. Chaque série de pic est constituée d'un doublet ( $\Delta m$  92) du à la présence d'un  $[M + H]^+$  ou ( $[M + H]^+$  + glycérol). En attribuant aux unités monosaccharidiques les masses respectives de 180 (hexose), 182 (hexitol) et de 194 (acide glucuronique), seulement deux résidus ont pu être caractérisée: un di- et un trisaccharide constitués d'hexoses (Tableau XII).

 Tableau XII. Masse moléculaire de la fraction B3 mesurée par spectrométrie de masse FAB

Ion speudomoléculaire		Hex	Masse mésurée	
343	$[M + H]^+$	2	342	
435	$[M - H + Glycérol]^+$	2	342	
505	$[M + H]^+$	3	504	
597	$[M - H + Glycérol]^+$	3	504	

# 2.2. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse et Spectrométrie de Masse (CPG-SM)

La fraction B3 est perméthylés, puis hydrolysée par méthanolyse. Les éthers méthyliques libérés sont ensuite acétylés (Cf. Matériels et Méthodes, B 9.2.9). Les éthers méthyliques partiellement acétylés sont séparés par chromatographie phase gazeuse et après identifiés par spectrométrie de masse d'impact électronique.

Deux héxitols situés en position terminale réductrice ont été identifiés: un 2,3,4,6 Me hexitol provenant d'un monosaccharide non-substitué, un 3,4,6 Me hexitol témoin de la présence d'un monosaccharide terminal réductrice substitué en position 2. Notons que les monosaccharides de la fraction B3 sont présents sous forme pyranose (Figure 45).



la fraction B3.
#### 2.3. Analyse par RMN

La structure primaire du produit B3 a été élucidée par RMN en 1D et 2D du <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C. Les spectres réalisés en <sup>13</sup>C (75 MHz) à 50°C (Figure 46) montrent la présence de 5 signaux à 102,04; 100,81; 98,36; 97,22 et 90,21 ppm dans la région de protons anomères. Les deux derniers signaux sont attribués en fonction de leur glissements chimique aux formes α et β d'un <u>D</u>-hexopyranose situé en position terminale réductrice. L'attribution des signaux existant dans les spectres du <sup>13</sup>C (1D) est réalisée par HMOC et HMBC (Tableau XIII).



50°C.

**Tableau XIII**. Glissement chimique (en ppm) obtenu par <sup>13</sup>C-RMN (1D à 75 MHz) de la fraction B3 isolée de *Fusarium oxysporum* sp.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Disaccharide					1	
α- <u>D</u> -Man <i>p-</i> (1-2)-α- <u>D</u> -Glc <i>p</i>				1		
α- <u>D</u> -Glcp	90,21	76,02	72,35	70,73	72,29	61,63
<u>α-D</u> -Man <i>p</i> (a)	98,36	71,29	71,461	67,62	73,81	61,80
α-D-Manp-(1-2)-β-D-Glcp						
β- <u>D</u> -Glcp	97,22	80,08	75,44	70,57	76,86	61,63
<u>α-D</u> -Man <i>p</i> (a)	100,81	71,29	71,461	67,62	73,81	61,80
Trisaccharide α-D-Man <i>p</i> -(1-4)-α-D-Man <i>p</i> -(1-2)- <u>D</u> -Glc <i>p</i>						
α- <u>D</u> -Man <i>p</i> (b)	102,04	71,29	71,461	67,62	73,81	61,81

L'analyse quantitative des signaux présents dans la région des protons anomères du spectre <sup>1</sup>H (1D) montre la présence de 2 composants majeurs: un di- et un trisaccharide dans des quantité de 80 et 20 %, respectivement (Figure 47). En autre le spectre <sup>1</sup>H (1D) montre clairement l'absence de N-acétylhexosamines, de fucose et d'acides uroniques, ainsi que l'absence d'un contaminent protéique.

Parmi les 5 signaux de la région de protons anomères qui présentent un glissement chimique ( $\delta$ ) à 5,37 (J<sub>1,2</sub> de 3,9 Hz); 5,18 (J<sub>1,2</sub> de 2,1 Hz); 5,11 (J<sub>1,2</sub> de 2,15 Hz); 4,95 (J<sub>1,2</sub> de 1,9 Hz) et 4,65 (J<sub>1,2</sub> de 8 Hz) ppm (Figure 48), le doublet à 5,37 et 4,65 ppm montre une corrélation avec des signaux en <sup>13</sup>C à 90,21 et 97,22 ppm qui ont été attribués aux formes anomères  $\alpha$  et  $\beta$  <u>D</u>-glucose en position terminale réductrice. L'intégration de la surface de résonance de protons anomères montrent que les proportions relatives des formes  $\alpha$  et  $\beta$  sont de 52 % et 48 %, respectivement. Les résidus de <u>D</u>-mannose sous une forme  $\alpha$ , ayant un glissement chimique à 5,18; 5,11 et 4,95 ppm, sont caractérisés par la constante faible de couplage <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>.



Figure 47. Spectre <sup>1</sup>H–RMN (1D à 500 Mz) de la fraction B3 solubilisée en  $D_2O$  à 50°C.

L'attribution complète des signaux <sup>1</sup>H a été réalisées par des experiences <sup>1</sup>H<sup>1</sup>H COSY et COSY relayé ainsi que TOCSY (1D) qui a permis de caractériser les protons réducteurs du résidu glucose (Tableau XIV).

**Tableau XIV.** Glissements chimiques (en ppm) obtenu par <sup>1</sup>H-RMN (1D à 500 Mz) de la fraction B3 isolée de *Fusarium oxysporum* sp.

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6, H-6'
Disaccharide					•	
α- <u>D</u> -Man <i>p</i> -(1-2)-α- <u>D</u> -Gic <i>p</i>						
α- <u>D</u> -Glcp	5,37	3,58	3,69	3,37	3,76	3,73; 3,69
α- <u>D</u> -Man <i>p</i> (a)	4,95	3,90	3,82	3,62	n,i	<u>n,i; n,i</u>
α- <u>D</u> -Manp-(1-2)-β- <u>D</u> -Glcp						
β- <u>D</u> -Glcp	4,65	3,31	3,47	3,36	3,38	3,81; 3,64
α- <u>D</u> -Man <i>p</i> (a)	5,18	3,93	3,78	3,66	n,i	n,i; n,i
Trisaccharide						
$\alpha$ -D-Manp-(1-4)- $\alpha$ -D-Manp-(1-2)-D-Glcp						
<u>α-D</u> -Man <i>p</i> (b)	5,11	3,98	3,78	3,66	n,i	n,i

La nature de différentes liaisons inter-glycosidiques a été déterminée principalement par des expériences NOESY et HMBC. Les H-1 du <u>D</u>-mannose à 4,95 et 5,37 ppm ont été corrélés avec C-2 de la forme  $\alpha$  et  $\beta$  du <u>D</u>-glucose terminal réducteur. Le spectre NOESY montre aussi des interactions importants entre divers résidus (Figure 48):

- (i) H-1[ $\alpha$ -<u>D</u>-Glcp] et H-1[ $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (a)],
- (ii) H-1[ $\alpha$ -<u>D</u>-Glcp] et H-2[ $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (a)],
- (iii) H-1[ $\beta$ -<u>D</u>-Glcp] et H-3[ $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (a)].

La résonance du H-1 du <u>D</u>-mannose étant influencée par la configuration  $\alpha$  ou  $\beta$  du résidu de glucose liée à un rapprochement entre le centre anomère du glucose et la liaison inter-glcosydique (1 $\rightarrow$ 2), permet identifier une forme structurale de type  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (a)-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha/\beta$ -<u>D</u>-Glcp.



Figure 48. Spectre NOESY de la fraction B3 isolées de Fusarium oxysporum sp.

La liaison inter-glycosidique  $(1\rightarrow 4)$  entre deux résidus de mannose,  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (a) et  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (b),qui existent dans la composition du trisaccharide a été identifiée en tenant compte de plusieurs expériences. Par HMBC, nous avons observé une corrélation entre C-1[ $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (b)] et le signal à 3,66 ppm (<sup>1</sup>H). Ce signal par HMQC a été attribué au signal à 80,88 ppm qui caractérise une liaison inter-glycosidique sur un spectre <sup>13</sup>C. Le glissement chimique de 3,66 ppm correspond aux protons H-4 car le glissement chimique fort et les expériences INEPT conduisent au C-4[ $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (a)].

La configuration du glucose  $\alpha$  ou  $\beta$  a une influence importante sur le résidu  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (a) voisin, mais elle n'a aucune influence sur le résidu  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (b) terminal du trisaccharide. Réciproquement, nous n'observons par de variations de glissement chimique des  $\alpha/\beta$  <u>D</u>-Glcp et  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (a) entre le di- et le trisaccharde.

En intégrant tous ces données et en les corroborent avec les données obtenues dans des analyses preliminaires nous pouvon établir la structure de composant B3 présentée dans la figure 49.

#### A $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (a)-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha/\beta$ -<u>D</u>-Glcp

B  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (b)-(1→4)- $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (a)-(1→2)- $\alpha/\beta$ -<u>D</u>-Glcp

Figure 49. Structure primaire de deux composants majeurs oligosaccharidiques appartenant à la fraction B3, isolées de *Fusarium oxysporum* sp. En A, le disaccharide et en B, le trisaccharide.

#### **D.** Discussion

Dans ce chapitre, nous avons continué l'analyse de la relation structure-activité par l'identification des structures qui présents un potentiel biologiques. Si Fusarium oxysporum est très bien connu pour son agression vis-à-vis d'une grande diversité de végétaux (), au contraire les structures élicitrices existantes appartenant à son mycélium sont très peu connues. En générale, le mycélium de champignons de la famille Fusarium après son destruction par des traitement divers (température, sonication...) libère des morceaux qui séparés par des chromatographies de tamisage moléculaire conduisent à des composants majoritaire de type glycolipidiques, glycoprotéiques, lipidiqes, oligosaccharidiqes ou composants avec phosphore...(Iwahara et al., 1996). Après la destruction, par la soude, du mycélium provenant de Fusarium oxysporum sp. (la souche sur laquelle nous avons travaillé) enchaîne par une charomatographie de tamisage moléculaire nous a permis d'identifier les mêmes types de composants majoritaire cités, ci-dessus. Sur tous ces composants nous avons testés leur pouvoir biologique en contact avec des suspensions de cellules de Rubus. Une fraction oligosaccharidique B3 (Cf. Chapitre 1, C) et une glycoprotéique B1 (Cf. Chapitre 1, C) ont été trouvées en ayant un pouvoir biologique important sur des réponses de défense de type PAL, IP.

La plupart de réponses d'élicitations son reliées à des signaux oligosaccharidiques. Dans des glycoprotéines la partie glucidique est représentée par des O- et N-glycannes qui ont des structures très diversifiées. A l'appui de cette hypothèse c'est le fait que les O-glycannes libérés, par des expériences de  $\beta$ -élimination, à partir des champignons de type *Fusarium* présents de structure acides, neutres ou basiques en fonction de leur unités carbohydrates. Ce type de séparation, en fonction de la charge du composant, est réalisée par le passage successive sur des colonnes d'échange ionique (anionic et cationic) de type Dowex forme H<sup>+</sup> ou HO<sup>-</sup>. L'identification des composants (O-glycannes) isolés à partir de glycoprotéines est achevée par des analyses en SM et RMN. Notre travail d'identification de molécules biologiquement activées, dans point de vue induction de réponses de défense, a démarré après la libération (par  $\beta$ -élimination) de O-glycannes à partir de la glycoprotéine B1. Les Oglycannes obtenus sont séparés par une chromatographie d'échange ionique sur des résines de type Dowex quand nous avons obtenu des fractions neutres (N), acides (A) et basiques (B) (Cf. Chapitre 2, B 2.2) Afin d'aboutir à une structure primaire finale nous avons concentre notre travail sur la sous-fraction N<sub>i</sub>a issue par une séparation dans un système HPLC de la fraction N. Cette fraction, N<sub>i</sub>a, analysée par chromatographie en phase gazeuse, SM et RMN montre l'existence de structure de type  $\beta$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-Manp,  $\alpha$ -D-GlcA (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-Galf  $\beta$ ,  $\beta$ -D-Galf  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -D-Manp ou  $\beta$ -D-Galf  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -D-Galf, citées par ailleurs sur d'autres souche de *Fusarium* (Jikibara *et al.*, 1992 b et c; Iwahara *et al.*, 1995). En plus, nous avons identifié une liaison  $\beta$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-GlcA (Figure 49) au lieu d'une liaison  $\beta$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 4)  $\alpha$ -D-GlcA trouvée couramment (Jikibara *et al.*, 1992 b et c; Iwahara *et al.*, 1995).

Un problème particulier nous a posé la fraction oligosaccharidique B3 (Figure 42) issue aussi du mycelium de *Fusarium oxysporum* sp. Même si les analyses effectuées par chromatographie en phase gazeuse montre un présence "normale" des carbohydrates de type glucose et mannose sous une forme pyranosique, les analyses effectues par RMN ont mis en évidence des signaux correspondant à des liaisons inter-glycosidiques assez rarement observées de type entre deux résidus de mannose,  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 4)  $\alpha$ -D-Manp, ou mannose et glucose,  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ / $\beta$ -D-Glcp. Ces types de structures n'ont pas été identifiées aux champignons de la famille *Fusarium*.

Les structures de type  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (1 $\rightarrow$ 4)  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp ont été rapporté une seule fois de Bock *et al.* (1984) dans un cadre d'étude purement chimique, mais les structures de type  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha/\beta$ -<u>D</u>-Glcp ont été trouvée chez des bactéries et dans la composition de la ristomycine A (Sztaricskai et al., 1980, Oren et al., 1993). Le plus important c'est que les deux type de structure, ci dessus, n'ont pas été retrouvées ensemble dans un composant comme c'est le cas de notre trisaccharide isolé de Fusarium oxysporum sp.

En conclusion la fraction B3 présent une structure citée pour la première fois dans de travaux d'identification de la structure qui en plus est activée dans point de vue biologiquement induisant des réponses de défense de type PAL.

### CHAPITRE 3

# **REPONSES PRECOCES INDUITES PAR DES SIGNAUX ELICITEURS ISOLES DE** *Fusarium*

sp. M7-1 ou de Fusarium oxysporum sp

## A. Les réactions physiologiques précoces induites par un traitement éliciteur

#### 1. Généralités

Les plantes possèdent plusieurs mécanismes de défense pour s'adapter au stress provenant de leur environnement et pour résister, en particulier, à l'agression par des pathogènes. Une des premières lignes de défense des plantes est représentée par des facteurs préformés ou constitutifs de nature physique ou chimique variée (Cf. Introduction, A 2), ou bien par l'induction de modifications physiologiques relevant des réactions nommées compatibles ou non (Cf. Introduction, A 3).

Dans le cas de réactions incompatibles, la plante réagit rapidement (en quelques minutes) à la tentative d'invasion parasitaire et les mécanismes de défense induits chez le végétal se caractérisent par un bouleversement de son métabolisme (Nürnberger *et al.*, 1994) (Cf. Introduction, A 3.3). La perception du pathogène est suivie par la génération de molécules qui sont responsables de l'activation spécifique de voies métaboliques assurant ainsi la diffusion d'un signal (Figure 50) ou l'initiation de réponse. Parmi ces molécules se situent les EAO, et des composes phénoliques comme des phénylpropanoïdes, et le SA apte à développer une SAR.

En activant des séquences enzymatiques impliquées dans leur biosynthèse ou dans leur regulation, soit des phosphatases, des phospholipases (Dangl *et al.*, 1996), des protéines G (Low et Merida, 1995), ou des peroxydases (Nürnberger *et al.*, 1994), en déclenchant des échanges ioniques, via des canaux et des pompes ioniques (Vera-Estrella *et al.*, 1994), les **EAO ont des effets immédiats et toxiques sur le pathogène.** Si l'attaquant n'est pas éliminé, la plante continuera par se protéger en développant une réponse rapide d'hypersensibilité. Ce

moyen naturel de défense conduit à l'apparition de nécroses autour des sites d'infection, tout en déclenchant une cascade d'événements impliqués dans l'expression de réponses cellulaires immédiates ou différées. Aussi sous l'action d'EAO, de  $H_2O_2$  en particulier, les parois se renforcent en modifiant ses composants (apparition de liaisons entre les protéines), ce qui freine l'invasion du pathogène.

Des séquences du métabolisme phénolique sont également activées au cours d'une réponse HR (Harmmond-Kosack et Jones, 1996). Par exemple, l'induction des enzymes phénoliques comme la PAL, la cinnamoyl-CoA, la chalcone-synthase (CHS) sont des réactions précoces en réponse à l'attaque du pathogène. Cette induction corrélée ou non à l'activation des gènes correspondants résulte en la synthèse de lignines (Jaeck *et al.*, 1992), de SA (Ryals *et al.*, 1996), ou de phytoalexines (Dixon et Paiva, 1995) (Cf. Chapitre 1, C 1). Si l'agression continue ou si la défense n'est pas suffisante, ces réponses précoces sont relayées (après quelques 10 heures ) par l'activation des gènes codant pour les PR-protéines, l'activation du génome est alors implique dans les réponses de résistance.

En conclusion, les réponses précoces sont essentielles à la survie de la plante car elles lui permettent de résister à un pathogène ou un stress tout en mettant en place des systèmes de défense plus performants et plus spécifiques. Le rôle physiologique important des réactions précoces est vérifié par l'emploi d'inhibiteurs spécifiques. Par exemple, l'induction des défenses précoces est supprimée par des composés inhibant des voies de transduction de signaux comme des inhibiteurs de canaux ioniques (Ebel *et al.*, 1995; Atkinson *et al.*, 1996), de phosphatases/ de protéine-kinases (acide okadoïque, ou molécule  $K_{252}$ ) (Popham *et al.*, 1995).



Figure 50. Les mécanismes précoces de défense des plantes : relations avec les principales cascades de transduction selon Harmmond-Kosack (1996).

BA, acide benzoïque; BAG, acide benzoïque glucosylé; B<sub>2</sub>H, acide benzoïque 2-hydroxylase; CA, acide *t*-cinnamique; CAT, catalase; C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, éthylène; HPDase, hydroperoxidase; JA, acide jasmonique; LOX, lipoxygénase; OGA, oligogalacturonanes ; PGases, polygalacturonases; PGIS, inhibiteurs de polygalacturonase; <u>L</u>-Phe, <u>L</u>-Phénylalanine; Rp, récepteur ; k/p, protéine-kinase ou phosphatase ; SA acide salicylique; SAG, acide salicylique glucosylé; SOD, superoxyde dismutase; (-) ou (+), activation ou inhibition.

#### 2. Approche méthodologique

Dans ce chapitre, le travail a été focalisé sur des réactions précoces de défense induites dans des suspensions de cellules (protoplastes) de végétaux par différents signaux. Notre intérêt est porté sur la production d'un "burst oxydatif" et sur l'activation du métabolisme phénolique. Ces réactions sont impliquées dans la transduction du signal (cas de certaines EAO comme  $O_2^{\bullet}$ ), dans des mécanismes de défense comme un renforcement de barrière physique et/ou chimique (production de lignines, de phytoalexines, libération de certaines EAO comme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par exemple).

Plusieurs approches expérimentales ont été réalisées afin de mettre en évidence et de caractériser la production du "burst oxydatif" et l'activation de la voie des phénylpropanoïdes (de la PAL en particulier) en réponse à un traitement éliciteur. Ce traitement de quelques minutes, réalisé en présence ou non d'un effecteur, impliquera un éliciteur utilisé à des concentrations pico-, nanomolaires.

Le matériel biologique soumis au stress biologique est représenté par des suspensions de cellules (protoplastes) de *Rubus*. Comme dans la plupart des cas, le plasmalemme est le siège de déclenchement des réponses physiologiques précoces nous avons axé notre travail en priorité sur des suspensions de protoplastes de *Rubus*. En effet, de nombreuses séquences oxydatives de transduction sont bien connues pour être associées au plasmalemme. En plus, au cours d'expériences préliminaires au CERMAV, on avait observé que les réponses induites dans des protoplastes étaient de 40-45% plus importantes que celles détectées dans les cellules, qui en plus sont délayées dans le temps.

Les signaux fongiques utilisés comme éliciteurs pour les expériences rapportées dans ce chapitre 3 sont:

(i) les fractions Ja, Jb et Jc préparées à partir de glycoprotéines isolés du mycelium de Fusarium sp. M7-1 (Cf. Matériels et Méthodes, A 2.2). Elles ont été fournies par le Professeur Shojiro Iwahara (Kagawa University, Faculty of Agriculture, Miki-Cho, Kagawa-Ken Japan). Le signal Ja est un polysaccharide acide avec une masse moléculaire d'environ 50 kDa. Le squelette de base est formé par des résidus galactofuranosiques liés  $\beta$  (1 $\rightarrow$  6) avec des branchements de type  $\beta$ -<u>D</u>-Manp (1 $\rightarrow$ 4)  $\alpha$ -<u>D</u>-GlcA,  $\alpha/\beta$ -<u>D</u>-Glcp, et  $\beta$ -<u>D</u>-Manp (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-Manp  $(1\rightarrow 4) \alpha$ -D-GlcA. Le signal Jb est une fraction oligosaccharidique neutre avant une masse moléculaire de 1,5 kDa environ. Les unités de base sont des résidus mannose liés  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 2), par exemple:  $\beta$ -<u>D</u>-Manp (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -<u>D</u>-Manp-ol. Le signal **Jc** est un mélange d'oligosaccharides acides avec une masse moléculaire de 1 kDa environ dont les composants sont: (a)  $\beta$ -<u>D</u>-Manp (1→4)  $\alpha$ -<u>D</u>-GlcA (1→2)  $\beta$ -<u>D</u>-Galf  $\beta$  (1→6)  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp (1→2)  $\beta$ -<u>D</u>-Manp-ol et  $\beta$ -<u>D</u>-Manp (1→4)  $\alpha$ -<u>D</u>-GlcA (1→2)  $\beta$ -<u>D</u>-Galf  $\beta$  (1→6) [ $\alpha$ -<u>L</u>-Rha  $\alpha$  (1→2)  $\alpha$ -<u>D</u>-Man  $(1\rightarrow 2)$ ]  $\alpha$ -<u>D</u> Man-ol; (b)  $\alpha$ -<u>D</u> GlcNAc  $(1\rightarrow 4) \alpha$ -<u>D</u>-GlcA  $(1\rightarrow 2)$  [( $\alpha$ -<u>D</u> GlcNac  $(1\rightarrow 4)$ ]  $\alpha$ -<u>D</u>-GlcA (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -<u>D</u> Galf (1 $\rightarrow$ 6) [ $\alpha$ -<u>L</u> Rha (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -<u>D</u> Man (1 $\rightarrow$ 2)]  $\alpha$ -<u>D</u> Man-ol; (c)  $\alpha$ -<u>D</u> GlcNAc  $(1\rightarrow 4) \alpha$ -D-GlcA  $(1\rightarrow 2) \alpha$ -D GlcNac  $(1\rightarrow 4) \alpha$ -D-GlcA  $(1\rightarrow 2) \beta$ -D Galf  $(1\rightarrow 6) \alpha$ -<u>L</u> Rha  $(1\rightarrow 2) \alpha$ -<u>D</u> Man  $(1\rightarrow 2)$  Man-ol; (d)  $\alpha$ -<u>L</u> Rha  $(1\rightarrow 2) \alpha$ -<u>D</u> Man  $(1\rightarrow 2) \alpha$ -<u>D</u> Man-ol-P. (ii) la fraction nommée B3 préparée à partir du mycelium de Fusarium oxysporum sp. Rappelons qu'au CERMAV, elle a été isolée à partir de la fraction brute B (Figure 23 B), et qu'elle a été analysée sur un plan structural (Cf. Chapitre 2, C). Il s'agit d'un mélange de di- et trisaccharides, dont la masse moléculaire a été évaluée à 480 Da;

Pour évaluer le potentiel éliciteur de ces différentes fractions, on s'est limité à l'identification de réponses de défense en s'appuyant sur les données préliminaires du chapitre l puis en effectuant une analyse approfondie des deux réponses précoces initiées, EAO et PAL. Dans les conditions expérimentales retenues, les signaux ont été utilisés à différentes concentrations (1 pM à 100 nM) en présence ou non d'un effecteur. Pour les signaux B3, Jb et Jc, la concentration a été exprimée en molarité; pour celle du signal Ja, elle a été exprimée par rapport à une unité de monomère.

C'est pour mieux comprendre la cascade de transduction impliquée dans la perception du signal, ou pour avoir des données sur les voies métaboliques concernées par les réponses physiologiques que l'on a utilisé des effecteurs comme des inhibiteurs ou des activateurs de respiration mitochondriale (SHAM et antimycine), d'activité lipoxygénase (acides caféique, stéarique, linoléique et PLA<sub>2</sub>), comme un inhibiteur de traduction (cycloheximide), comme des enzymes ou accepteur (CAT, SOD, Cyt c).

# B. INDUCTION D'ESPECES ACTIVEES D'OXYGENE

#### 1. Généralités

Les EAO incluant  $O_2^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\bullet}$ , sont normalement présentes dans les cellules saines, mais leur production comme outils de défense, a été rapportée au cours des situations de stress environnementaux, des interactions plante-pathogène ou éliciteur-cellule végétale. Les EAO résultent du métabolisme oxydatif par le billet de cascade de réactions impliquant, entre autres, les enzymes NAD(P)H oxydases, SOD, peroxydases, glutathion-transférase/ réductase, ou bien l'activation des gènes codant pour ces enzymes. L'ensemble des ces manifestations d'un stress oxydant est désigné par l'expression de génération d'EAO; c'est le "burst oxydatif" selon l'expression des anglo-saxons.

Les EAO sont des oxydants redoutables capables d'arracher des électrons aux macromolécules organiques cellulaires, provoquant ainsi la peroxydation des lipides

membranaires, la destruction des protéines, la détérioration de l'ADN et des chromosomes. Les EAO sont utilisées comme des espèces toxiques contre le pathogène, des activateurs de certains gènes de défense ou comme des messagers secondaires dans des étapes de transduction.

Parfois les végétaux sont soumis à la toxicité des EAO, mais ils peuvent développer des systèmes constitutifs ou inductifs de protection et de réparation afin de résister à des agressions multiples et quotidiennes. Par exemple, la tolérance à l'oxygène se traduit par un équilibre entre la production d'EAO par le métabolisme cellulaire normal et leur élimination **par les capacités antioxydantes de la cellule.** En général, la protection est réalisée grâce à la vitamine E ou tocophérol (TH<sub>2</sub>) à localisation membranaire capable d'éliminer les radicaux peroxyles, ce qui empêche la propagation des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (réactions 8 et 9):

Réaction 8:  $\mathbf{R}^{\bullet} + \mathbf{TH}_2 \rightarrow \mathbf{RH} + \mathbf{TH}^{\bullet}$ 

Réaction 9:  $ROO^{\bullet} + TH_2 \rightarrow ROOH + TH^{\bullet}$ 

Des glutathion-peroxydases ainsi que des phospholipases permettent l'élimination des peroxydes des membranes, lipides endommagés, augmentent le temps de vie normal des membranes.

#### 2. Caractéristiques des EAO

#### 2.1 L'oxygène moléculaire O<sub>2</sub>

Dans son état fondamental,  $O_2$  est une molécule composée de deux atomes présentant sur leur orbite électronique externe, 2 électrons célibataires de "spin" parallèles. Deux électrons de même "spin" ne pouvant occuper la même orbite, l'oxygène ne peut accepter une paire d'électrons ce qui limite sa réactivité. L'oxygène moléculaire réagit cependant extrêmement bien avec d'autres centres paramagnétiques tels que les radicaux libres ou les métaux de transition (fer ou cuivre).

Il est essentiellement formé dans les cellules végétales par l'activation photochimique. La réduction de l'oxygène produit, par une suite d'échanges monoélectroniques, des intermédiaires radicalaires plus ou moins toxiques pour les cellules vivantes.

#### 2.2 L'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

Obtenu par réduction monoélectronique de l'oxygène moléculaire, l'anion  $O_2^{\bullet-}$  est un monoradical paramagnétique, relativement peu réactif (réaction 10):

Réaction 10:  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$ 

La production  $O_2^{\bullet}$  apparaît dans une phase précoce de reconnaissance entre les cellules de la plante et des substances libérées par le pathogène bien avant sa pénétration dans les cellules hôtes (Doke, 1983).  $O_2^{\bullet}$  peut être généré, soit électrochimiquement par électrolyse de l'oxygène, soit chimiquement par auto-oxydation de quinones en semiquinones, puis en hydroxyquinones ou par les métaux de transition (cuivre, fer...), soit biologiquement par réduction de l'oxygène par des flavines (riboflavines, FAD, FMN) ou par des enzymes membranaires (NAD(P)H oxydases, peroxydases, xanthine-oxydase).

Les NADPH oxydases conduisent directement à la production  $d'O_2^{\bullet}$  par un mécanisme régulé par phosphorylation ou déphosphorylation. Au cours d'interactions de type ligandrécepteur, des EAO seraient libérées, d'après Mehdy (1994), soit par activation de la NADPH oxydase à la suite de sa phosphorylation par des protéine-kinases (en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire), soit par activation de peroxydases membranaires. Les NADPH oxydases isolées des plantes présentent une homologie de séquences avec celles des neutrophiles (Segal et Abo, 1993; Groom *et al.*, 1996) et des phagocytes (Morel *et al.*, 1991). Cette hypothèse est appuyée par des recherches récentes montrant, par exemple, que les anticorps anti-NADPH oxydases isolées des mammifères ont des réactions croisées avec celles des végétaux. En plus, la production des EAO, chez les plantes, est supprimée par l'utilisation des inhibiteurs de NADPH oxydase des mammifères (Jones, 1994).

Les **peroxydases** sont aussi des sources de production d'EAO et notamment de  $l'O_2^{\bullet \bullet}$ (Peng et Kuc, 1992). L'activité peroxydasique est augmentée au cours des interactions noncompatibles plante-pathogène (Vera-Estrella *et al.*, 1992).

La toxicité de l'anion  $O_2^{\bullet}$  est limitée, car, étant une molécule chargée, il ne peut pas pénétrer à travers le plasmalemme. Cependant sa toxicité découle de sa facilité à produire de **peroxyde d'hydrogène** et de radicaux libres **hydroxyle et perhydroxyle**.

#### 2.3 Le radical hydroxyle (HO<sup>•</sup>) et le radical perhydroxyle (HOO<sup>•</sup>)

L'anion  $O_2^{\bullet}$  en milieu acide forme un radical HOO<sup>•</sup> qui est un oxydant plus fort que lui, et qui subit rapidement une dismutation (réactions 11, 12 et 13):

Réaction 11:  $O_2^{\bullet-} + H^+ \leftrightarrow HOO^{\bullet}$ 

Réaction 12:  $HOO^{\bullet} + O_2^{\bullet} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ 

Réaction 12:  $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ 

Le radical HO<sup>•</sup> est généré dans les cellules à partir de  $H_2O_2$  par une réaction catalysée par la lumière ou par des métaux de transition libres ou complexés (via des métalloprotéines...). Ceux-ci sont recyclés, à leur niveau initial d'oxydation par l'intermédiaire de différents agents cellulaires réducteurs (ascorbate, NAD(P)H,  $O_2^{\bullet-}$ ). Ainsi la réduction de  $H_2O_2$ , catalysée par les ions Fe<sup>2+</sup>, conduit à la production de HO<sup>•</sup> par la réaction de Fenton (réaction 14). Lorsque le fer (Fe<sup>3+</sup>) est réduit par  $O_2^{\bullet \bullet}$  (réaction 15), le bilan global se traduit par la réaction d'Haber-Weiss (réaction 16).

Réaction 14:  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + HO^{-} + Fe^{3+}$ 

Réaction 15:  $Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ 

Réaction 16:  $H_2O_2 + O_2^{\bullet} \rightarrow HO^{\bullet} + HO^{\bullet} + O_2$ 

Le radical hydroxyle et le radical perhydroxyle sont des espèces connues les plus réactives. Ils réagissent spontanément sur leur site de formation avec toute molécule ou structure membranaire. Ils seraient impliqués dans la désorganisation des membranes au cours de la réponse d'hypersensibilité, car ils peuvent pénétrer les membranes, arracher les ions H<sup>•</sup> aux groupements dièniques des acides gras polyinsaturés (Jordan et Devaly, 1990). La composition chimique des membranes est riche en acides gras polyinsaturés qui sont en effet, des cibles privilégiées pour des attaques radicalaires.

Selon le mécanisme illustré dans la figure 51, au cours d'une phase d'initiation, le radical hydroxyle arrache un atome d'hydrogène à un atome de carbone d'un acide gras polyinsaturé, produisant un R<sup>•</sup>. Au cours d'une phase de propagation, le R<sup>•</sup> subit un réarrangement moléculaire suivi d'une réaction avec l'oxygène pour donner le ROO<sup>•</sup>. Celui-ci réagit à son tour et arrache l'hydrogène d'un autre acide gras polyinsaturé pour former un ROOH et un nouveau R<sup>•</sup>. Cette oxydation des lipides se propage et s'amplifie d'un acide gras à l'autre. La peroxydation lipidique est donc une des réactions radicalaires qui conduit à la déstabilisation des édifices membranaires. Ceci a pour conséquence la modification des propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires: variation de fluidité, changement de perméabilité aux ions, variation de potentiel transmembranaire, et/ou activation de la voie octadécanoïdique.



Figure 51. Mécanisme général de peroxydation des acides gras polyinsaturés membranaires

L'enzyme lipoxygénase (linoleate: oxygène oxydoreductase, EC 1.13.11.12) catalyse la peroxydation des molécules qui contiennent des groupements *cis, cis*-1,4-pentadiène (Figure 52). Sa présence est ubiquitaire dans les tissus des plantes où on trouve plusieurs isoenzymes codés par des gènes différents qui ont comme substrat l'acide linoléique (C18 :2) ou linolénique (C18 :3) (Figure 52).



Figure 52. Voie lipoxygénase, d'après Hildebrand (1989)

186

#### 2.4 Le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée

La molécule  $H_2O_2$  n'est pas un radical libre mais il possède un fort pouvoir oxydant. Il est généré par réduction de  $O_2^{\bullet}$  dans des réactions de dismutation catalysées par des ions métalliques ou par des complexes enzymatiques tels que les superoxyde-dismutases.

Les enzymes de type **SOD** (Bowler *et al.*, 1992) sont des métalloprotéines qui accélèrent de  $10^4$  à  $10^5$  fois la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène, sans consommer de cofacteur, selon la réaction (17).

Réaction 17:  $O_2^{\bullet \bullet} + O_2^{\bullet \bullet} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ 

Selon l'ion métallique présent dans le site actif de l'enzyme, on distingue trois types de SOD: (i) les Cu/Zn SOD localisées principalement dans le cytosol des cellules des Eucaryotes et de quelques bactéries, dans les peroxysomes et dans les chloroplastes de certaines plantes; (ii) les Mn SOD présentes essentiellement dans la matrice des mitochondries et qui sont parfois associées à la membrane des chloroplastes; (iii) les Fe SOD, présentes surtout chez les Procaryotes et dans les plastes de certaines plantes.

La transformation ou la destruction de  $H_2O_2$  est réalisée par différents types d'enzymes: les catalases et les peroxydases.

Les catalases sont des métalloenzymes tétramériques contenant un complexe héminique ( $Fe^{2+}$ -protoporphyrine) dans leur site actif. Elles convertissent le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction 18:

#### Réaction 18: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

Elles sont essentiellement concentrées dans les peroxysomes de la plupart des cellules aérobies.

Les peroxydases (glutathion-peroxydase, ascorbate peroxydase..), ayant pour la plupart une structure héminique, assurent la destruction d' $H_2O_2$  d'après les réactions 19, 20,

21:

Réaction 19: peroxydase +  $H_2O_2 \rightarrow composé I + H_2O$ 

Réaction 20: composé I +  $RH_2 \rightarrow composé II + RH^{\bullet}$ 

Réaction 21: composé II +  $RH_2 \rightarrow peroxydase + RH^{\bullet} + H_2O$ 

où RH<sub>2</sub> est un substrat oxydé au cours de la réaction.

Le rôle clef du  $H_2O_2$  dans l'orchestration de la réponse d'hypersensibilité est bien connu (Tenhaken *et al.*, 1995), en particulier une fonction de molécule signal diffusant vers les parties de la plante non infectées a été retenue. Ci-dessous, on rappelle les principaux rôles ou processus ou  $H_2O_2$  est impliquée:

(i)  $H_2O_2$  participerait au renforcement d'une barrière physique naturelle en induisant la synthèse de HRGP, de lignines (Olson et Varner, 1993) et en participant à la formation de liaisons par oxydation entre des composants protéique pariétaux;

(ii)  $H_2O_2$  induirait des gènes codant pour des protéines de detoxification limitant la toxicité des EAO, comme la glutathion S-transférase, ou pour des protéines intervenant dans la défense de la plante comme les enzymes phénoliques (PAL, chalcone-synthase et chalcone-isomérase) ou comme les PR-protéines;

(iii)  $H_2O_2$  semble être directement responsable de la mort cellulaire (apoptose) à partir d'une concentration endogène seuil supérieure à celle requise pour l'induction des gènes de défense;

(iv)  $H_2O_2$  diffuse dans les cellules voisines non infectées activant l'enzyme  $BA_2H$ implique dans la production de SA, molécule clef des réponses HR et SAR;

(v)  $H_2O_2$  est utilisée comme espèce toxique contre le pathogène. C'est alors un activateur de gènes impliqués dans la défense (voir ii) ou comme messager secondaire dans des étapes de transduction des signaux échangés entre la plante et le pathogène (Fig 50).

#### 189

#### 2.5. Autres radicaux libres centrés sur l'oxygène

Les radicaux peroxyles (ROO<sup>•</sup>) et alkoxyle (RO<sup>•</sup>), résultent le plus souvent de l'action de HO<sup>•</sup>, par des réactions radicalaires en présence de l'oxygène , sur des molécules organiques de type RH ou ROOH. En plus, ils peuvent se former à partir des hydroperoxydes qui se décomposent en présence de fer, d'anion superoxyde ou de chaleur selon des réactions 22, 23, et 24:

Réaction 22: ROOH +  $Fe^{2+} \rightarrow RO^{\bullet} + Fe^{3+} + HO^{-}()$ Réaction 23: ROOH +  $Fe^{3+} \rightarrow ROO^{\bullet} + Fe^{2+} + H^{+}()$ Réaction 24: ROOH +  $O_2^{\bullet-} \rightarrow RO^{\bullet} + O_2 + HO^{-}()$ 

Ces radicaux libres sont très réactifs et à leur tour peuvent initier des nouvelles peroxydations.

# 3. "*Burst oxydatif*" induit par des *O*-glycannes isolés de glycoprotéines provenant de *Fusarium* sp. *M7-1*: détection et caractéristiques biochimiques

L'état radicalaire est, en principe, très instable et difficile à mettre en évidence par des mesures directes. Selon l'approche méthodologique détaillée au Chapitre Mat et Met, B6, 7 et 8), nous avons quantifié des EAO induites par des fractions oligosaccharidiques, isolées de *Fusarium* et utilisées comme signal pendant quelques minutes, et nous avons réuni des informations sur les voies métaboliques impliquées dans leur production ou leur régulation.

Rappelons que :

les techniques utilisées pour quantifier les EAO sont basées sur la réduction du Cyt c selon
Doke *et al.* (1983)., la consommation d'oxygène dans un électrode de Clark selon Dwyner *et al.*, (1996), et l'oxydation de la pyranine selon Apostol *et al.* (1989).

- les fractions Ja, Jb et Jc isolées de *Fusarium* sp. M7-1 ont été utilisées comme signaux à des concentrations de 1 pM a 100 nM, en présence ou non d'effecteurs (SOD, CAT, antimycine A plus SHAM, acide caféique, acide linoléique);

- la pendant génération des EAO pendant 15 min au plus, a été suivie dans des suspensions de protoplastes de *Rubus*;

- tous les résultats d'enregistrement des cinétiques ont donné lieu à une exploitation des données sur logiciel; 1 point sur les graphes présentés ci-dessous correspondra au traitement des données de 4 courbes de cinétique, au moins, par échantillon, bien le définir pour l'oral provenant de 3 sets indépendants d'élicitation.

#### 3.1. Génération d'anion superoxyde

#### 3.1.1. Réduction du Cyt c exogène par les signaux Ja, Jb et Jc

On rappelle que la réduction en quelques minutes du Cyt résulte de la production d'anion superoxide dans le milieu en réponse à l'éliciteur (Figure 11, courbe b).

D'après la courbe de dose-dépendance de la figure 53 (courbe Jc), la réduction induite par Jc conduit à une sinusoïde pour des concentrations en éliciteur inférieures à 50 pM. La concentration optimale de 10 pM, correspond à une réduction du Cyt c équivalente à 7,45 nmoles min<sup>-1</sup>, soit une réduction 1,5 fois supérieure à celle observée pour les contrôles (protoplastes non traités). A partir d'une concentration en éliciteur supérieure à 50 pM, la réduction du Cyt c croît avec un maximum de 8 nmoles min<sup>-1</sup> (soit 161 % par rapport au contrôle) pour une concentration de 100 nM. La fraction Jb n'induit pas une réduction du Cyt c (courbe Jb), mais la fraction Jc induit une réduction du Cyt c à une concentration supérieure à 50 pM. Cette réduction se chiffre à 6,45 nmoles min<sup>-1</sup> (soit 130 % par rapport au contrôle) (courbe Jc).



Figure 53. Génération d'O<sup>•</sup><sub>2</sub> induite par les fractions Ja, Jb et Jc dans des protoplastes de *Rubus*. 2.10<sup>6</sup> protoplastes de *Rubus* sont élicités ou non par les fractions Ja (courbe Ja), Jb (courbe Jb) et Jc (courbe Jc) utilisées à des concentrations de 1 pM à 100 nM en présence du Cyt c (100 $\mu$ M). La cinétique de réduction du Cyt c est suivie à 550 nm, et la vitesse de la réaction, mesurée par  $\Delta A_{550}$  min<sup>-1</sup>, est exprimée en % du contrôle (vitesse de réduction du Cyt c dans des protoplastes non élicités et en l'absence d'effecteur). Une valeur portée sur le graphe correspond à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets différents d'élicitation.

#### 3.1.2. Production d'O<sup>•</sup><sub>2</sub>: modulation de la réponse d'élicitation

Nous avons modulé la production d'O<sup>-2</sup> induite dans des conditions expérimentales optimales de réponse d'élicitation (génération O<sup>-2</sup> de 7,45 nmoles min<sup>-1</sup> par la fraction Jc à une concentration de 10 pM) en présence des effecteurs: SOD (0,16 mg mL<sup>-1</sup>), CAT (0,15 mg mL<sup>-1</sup>), antimycine A (150  $\mu$ M) plus SHAM (20  $\mu$ M), acide caféique (400  $\mu$ M), acide linoléique (40  $\mu$ M). Ce travail (Figure 54) a été conduit dans la perspective d'identifier des séquences de la cascade de transduction impliquée dans la production et transformation d'EAO.



Figure 54. Modulation de la génération d'O<sup>•-</sup><sub>2</sub> dans des protoplastes témoins (1) ou élicités par la fraction Jc (2).  $2.10^6$  protoplastes en présence du Cyt c (100µM) sont élicités ou non par Jc (10 pM) en l'absence d'effecteur (A), ou en présence d'un effecteur B, C ou D: B, acide linoléique (40 µM); C, acide caféique (400 µM); D, SHAM (20 µM) plus l'antimycine A (150 µM). La vitesse de la réduction mesurée ( $\Delta A_{550} \min^{-1}$ ) est exprimée en % du contrôle (protoplastes non élicités en l'absence d'effecteur). Une valeur portée sur le graphe correspond à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets différents d'élicitation.

L'apport d'un effecteur résulte en un changement de la production d'O<sup>•-</sup><sub>2</sub>. D'après la figure 54, on note que la production d'O<sup>•-</sup><sub>2</sub> dans les protoplastes non élicités (A, ligne 1) est augmentée par l'acide linoléique (40  $\mu$ M) (B, ligne 1) dans la mesure où elle atteint 160 %. Par contre, elle ne varie pas en présence d'acide caféique (400  $\mu$ M) (C, ligne 1) et elle diminue à 25 % avec l'effecteur antimycine A (20  $\mu$ M) plus SHAM (150  $\mu$ M) (D, ligne 1). En présence du signal Jc, les réponses sont différentes: le traitement éliciteur augmente à 150 % la génération d'O<sup>•-</sup><sub>2</sub> (A, ligne 2). Cette production s'abaisse à 110% en présence d'acide

linoléique (40  $\mu$ M) (B, ligne 2), ou à 125 % en présence d'acide caféique (400  $\mu$ M) (C, ligne 2) ou à 57 % après l'addition d'antimycine A (20  $\mu$ M) plus SHAM (150  $\mu$ M) ) (D, ligne 2).

On a observé que la présence de SOD  $(0,16 \text{ mg mL}^{-1})$  dans le milieu inhibe partiellement la réponse d'élicitation mais il n'y a pas eu de changement significatif en présence de catalase  $(0,15 \text{ mg mL}^{-1})$  (non illustré).

#### 3.2. Consommation d'oxygène

#### 3.2.1. Consommation d'oxygène induite par les signaux Ja, Jb et Jc

On rappelle qua la teneur en oxygène dans des suspensions de protoplastes a été suivie à l'aide d'une électrode de Clark (Figure 12). Cette teneur dépend à la fois de la respiration mitochondriale et du potentiel rédox du plasmalemme qui lui dépend étroitement du traitement éliciteur. Par exemple l'application de Jc résulte, après un temps court d'interaction de 1 à 2 minutes, en une augmentation de la consommation d'oxygène (Figure 12, courbe b) par rapport à celles des protoplastes de contrôle (Figure 12, courbe a).

D'après la courbe de dose-dépendance de la figure 55, l'effet de l'éliciteur Jc est optimal pour la dose de 10 pM (courbe Jc). Cet effet a été évalué à 17 nmoles  $O_2 \text{ min}^{-1}$ , soit une consommation d'oxygène 2 fois plus importante que pour les contrôles (protoplastes non traités). Des concentrations supérieures à 50 pM n'induisent pas de modification plus importante.

L'inducteur Jb n'induit qu'une faible activation de la consommation d'oxygène (9,4 nmoles  $O_2 \text{ min}^{-1}$ , soit 110 % par rapport au contrôle) à la concentration de 1 nM environ. En ce qui concerne l'inducteur Ja, il est efficace à la concentration élevée de 100 nM environ, ce qui correspond à une consommation d'oxygène de 12,75 nmoles  $O_2 \text{ min}^{-1}$  (soit 150 % par rapport au contrôle).



Figure 55. Consommation d'oxygène induite par les fractions Ja, Jb et Jc dans des protoplastes de *Rubus*.  $2.10^6$  protoplastes suspendus dans un tampon Tris HCl (pH 4,8) sont élicités ou non par les fractions Ja (courbe Ja), Jb (courbe Jb) et Jc (courbe Jb) utilisées à des concentrations de 1pM à 100 nM. La vitesse de la consommation d'oxygène (nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>) est exprimée en % du contrôle ( protoplstes non traités). Une valeur portée sur le graphe correspond à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets différents d'élicitation.

#### 3.2.2. Consommation d'oxygène: modulation de la réponse d'élicitation

Pour identifier des séquences d'oxydo-réduction impliquées dans la réponse d'élicitation, la consommation optimale d'oxygène induite par la fraction Jc (10 pM) a été modulée en présence d'un effecteur: PLA<sub>2</sub> (8  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), acide caféique (400  $\mu$ M), acide stéarique (40  $\mu$ M) et acide linoléique (40  $\mu$ M). Les résultats sont les suivants (Figure 56): - la consommation d'oxygène est augmentée par le traitement éliciteur car elle est multipliée d'un facteur 2 (A, ligne 2) par rapport à celle du contrôle (A, ligne 1). Elle est encore amplifiée à 241 % en présence de la PLA<sub>2</sub> (B, ligne 3), à 223 % en présence d'acide stéarique (C, ligne 5) ou à 230 % en présence d'acide linoléique (D, ligne 7). On note que l'acide caféique diminue à 171 % la consommation d'oxygène induite par PLA<sub>2</sub> (B, ligne 4) ou à 154% celle induite par l'acide linoléique (D, ligne 8). Par contre, l'acide caféique est sans action sur la consommation induite par l'acide stéarique (C, ligne 6).

195



**Figure 56.** Modulation de la consommation de l'oxygène dans des protoplastes élicités par la fraction Jc  $2.10^6$  protoplastes suspendus dans un tampon Tris HCl pH 4,8 sont élicités par la fraction Jc (10 pM) en présence (conditions B, C et D) ou non (condition A) d'un effecteur. Réponse des protoplastes témoins en (1). Réponse des protoplastes élicités en l'absence d'effecteur en (2) ou en présence d'un effecteur (3-8): en B, addition de la PLA<sub>2</sub> (8 µg mL<sup>-1</sup>) (3) puis de l'acide caféique (400 µM) (4); en C, addition de l'acide stéarique (40 µM) (5) puis de l'acide caféique (400 µM) (6); en D, addition de l'acide linoléique (40 µM) (7) puis de l'acide caféique (400 µM) (8). La vitesse de la consommation (n moles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>) a été exprimée en % du contrôle (vitesse dans des protoplastes non-élicités et en l'absence d'effecteur). Une valeur portée sur le graphe correspond à 4 courbes de cinétique, au moins, par échantillon provenant de 3 sets d'élicitation différents.

#### 3.3. Production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 3.3.1. L'oxydation de la pyranine

La production de  $H_2O_2$  selon le processus d'oxydation décrit ci-dessus dans le paragraphe 2 (réaction 18) est générée par l'application d'un signal.

#### Réaction 18: $H_2O_2 + Pyranine (réduite) \rightarrow HO^{\bullet} + HO^{-} + Pyranine (oxydée)$

Le processus d'oxydation est visualisé par une baisse de la fluorescence à 512 nm dans la suspension de protoplastes élicités, et comparé à celui présent dans les protoplastes nonélicités (Figure 13).

Des suspensions de protoplastes de *Rubus* incubées d'abord en présence de CAT  $(0,15 \text{ mg mL}^{-1})$  (afin d'éliminer l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endogène) sont élicitées ou non par les fractions Ja, Jb et Jc et la diminution de fluorescence de la pyranine est suivie 2-3 min après l'application du signal Jc, une baisse de fluorescence de la pyranine se détecte; par contre les fractions Ja et Jb n'ont pas d'effet significatif (non representé).

L'influence de la concentration de la fraction Jc sur la production de  $H_2O_2$  montre une courbe (Figure 57, courbe Jc) comportant des similitudes avec celle obtenue pour la réduction du Cyt c (Figure 54). En effet, la courbe est sinusoïdale et un effet optimal se détecte pour une concentration en éliciteur de l'ordre de 10 pM: dans ce cas, la vitesse maximale d'oxydation de la pyranine est égale à 177 % du contrôle, ce qui correspond à une génération de 2,25  $\mu$ M  $H_2O_2$ .



Figure 57. Effets des signaux Ja, Jb et Jc sur la fluorescence de la pyranine dans des suspensions de protoplastes de *Rubus*. 2.10<sup>6</sup> protoplastes suspendus dans un tampon phosphate (pH 7,4) contenant du Tween (0,1%), de la pyranine (0,2  $\mu$ M) sont élicités ou non par les fractions Ja (courbe Ja), Jb (courbe Jb) et Jc (courbe Jc) (1 pM -100 nM). La baisse de fluorescence de la pyranine est suivie, et la vitesse de la réaction ( $\Delta F_{512} \min^{-1}$ ) est exprimée en % du contrôle (vitesse dans des protoplastes non élicités). Une valeur portée sur le graphe correspond à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets différents d'élicitation.

#### 3.3.2. Production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: modulation de la réponse d'élicitation

La production d' $H_2O_2$  induite par la dose optimale de 10 pM en éliciteur a été modulée par un effecteur: SOD (0,16 mg mL<sup>-1</sup>), acide linoléique (40  $\mu$ M), acide stéarique (40  $\mu$ M) ou acide caféique (400  $\mu$ M).

La figure 58 indique que la production de  $H_2O_2$  dans des protoplastes témoins (A, ligne 1) est augmentée à 177 % par le signal Jc (A, ligne 2). Cette réponse d'élicitation est amplifiée à 191 % par l'enzyme SOD (A, ligne 3), alors que l'acide stéarique ne produit pas de changement (A, ligne 6) et l'acide linoléique produit une baisse de la fluorescence à 35,4 % (A, ligne 4). L'acide caféique ne modifie pas la réponse obtenue en présence de l'acide stéarique (A, ligne 7) mais lève l'effet de l'acide linoléique dans la mesure où la production de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s'élève à 83 % (A, ligne 5).



Figure 58. Modulation de la génération de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 2.10<sup>6</sup> protoplastes en suspension dans un tampon phosphate (pH 7,4) contenant du Tween (0,1%), de la pyranine (0,2  $\mu$ M) sont élicités par la fraction Jc (10 pM) en présence d'un effecteur (conditions B, C et D) ou non (condition A). Réponse des protoplastes témoins en (1). Réponse des protoplastes élicités en l'absence d'effecteur en (2) ou en présence d'un effecteur (3-7): en B, addition de SOD (0,16 mg mL<sup>-1</sup>) (3); en C, addition d'acide linoléique (40  $\mu$ M) (4) suivie de l'acide caféique (400  $\mu$ M) (5); en D, addition de l'acide stéarique (40  $\mu$ M) (6) suivie de l'acide caféique (400 M) (7). La baisse de fluorescence de la pyranine est suivie, et la vitesse de la réaction ( $\Delta$ F<sub>512</sub> min<sup>-1</sup>) est exprimée en % du contrôle (vitesse dans des protoplastes non élicités). Une valeur portée sur le graphe correspond à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets différents d'élicitation.
#### **C. REPONSE D'ELICITATION PAL**

#### 1. Généralités

On rappelle que chez les végétaux, un stress d'origine biotique ou abiotique induit l'activation de certaines voies métaboliques dont celle des phénylpropanoïdes. Cette voie est impliquée dans la défense car elle génère les métabolites secondaires phytoalexines, lignines et SA.

Par référence à la figure 24, l'activation de la PAL est l'étape déterminante dans la production de métabolites de résistance au stress. L'enzyme PAL est l'enzyme clef de la voie des phénylpropanoïdes (unités C6-C3) représentées par les acides p-coumarique, caféique, férulique, ou sinapylique qui, sous la forme d'esters de coenzyme A sont des précurseurs des lignines et des flavonoïdes (Dixon et Pavia, 1995). Ainsi la PAL contrôle la synthèse des flavonoïdes qui sont des unités C15 résultant de la condensation d'une unité cinnamoyl-CoA avec des molécules de malonyl-CoA. Certains d'entre-eux sont des phytoalexines à fonction fongicide ou bactéricide (Kuc, 1985), ou des composants qui limitent les effets nuisibles des radiations U.V. (Lois, 1994), ou des signaux de reconnaissance, c'est le cas de la lutéoline, flavone nécessaire à la symbiose des Rhizobiacées avec des légumineuses (Peters et al., 1986). La PAL contrôle la synthèse des composés benzoïques (unités C6-C1) qui sont des agents antifongiques (comme les acides benzoïque, protocatéchique, gentisique et gallique), des bactéricides (comme l'acide chlorogénique) (Grayer et Harborne, 1994) ou qui, comme d'acide salicylique, ont une fonction hormonale intervenant dans des processus de défense mais aussi dans des étapes clefs du développement des plantes.

L'activation de la PAL, à la suite d'un stress ou d'une agression par un pathogène, se manifeste précocement et/ ou tardivement. Les bases moléculaires de la réponse précoce est mal connue. On sait qu'elle s'accompagne d'une synthèse d'ARNm et de modifications posttraductionnelles. Par contre, la synthèse *de novo* qui accompagne l'expression tardive est bien analysée.

L'étude des voies du métabolisme phénolique est difficile à réaliser pour différentes raisons: (i) la synthèse des produits fait intervenir, le plus souvent, plusieurs enzymes associées en **complexes membranaires** (Hrazdina et Jensen, 1992); (ii) en fonction de la nature du signal, de la molécule réceptrice et de l'état physiologique de la plante, la synthèse phénolique est orientée vers l'une ou l'autre voie; (iii) de plus, les phénols font l'objet d'une **compartimentation** tissulaire ou intracellulaire; (iv) enfin, s'ils peuvent s'accumuler dans un organite ou un tissu , ils peuvent aussi se déceler à l'état de **traces**; (v) quand ils sont présents à des concentrations élevées, ils s'avèrent toxiques pour l'organisme, mais leur compartimentation (une accumulation dans des vacuoles par exemple) assure une protection de la cellule. Ainsi, leur synthèse au cours d'un stress peut être compensée par une rapide dégradation ou un stockage sous des formes inactives; (vi) enfin, l'activation du métabolisme phénolique peut se produire sans entraîner de changements au niveau du métabolisme primaire.

#### 2. Approche méthodologique

L'approche méthodologique relative à l'analyse de la réponse d'élicitation PAL, a été détaillée ci-dessus (Cf. Chapitre 3, A 2). Des suspensions de cellules ou de protoplastes de *Rubus* ont été élicité(e)s par les fractions Ja, Jb et Jc isolées de *Fusarium* sp. M7-1 et par la fraction B3 isolé de *Fusarium oxysporum* sp. (Figure 49). L'éliciteur utilisé à la concentration de 100 nM a été incubé, en présence ou non d'un inhibiteur de la traduction (la cycloheximide) (1  $\mu$ M) pendant des temps variables jusqu'à 30 h.

L'activité enzymatique PAL a été testée selon Zuker *et al.* (1965) (Cf. Matériels et Méthodes, B 3.5), des produits réactionnels PAL ont été extraits selon Khan et Vaidyanathan (1986) et analysés par chromatographie sur couches minces de silice, en spectrophotométrie U.V, ou en HPLC-PAD (Cf. Matériels et Méthodes, B 3.3).

En ce qui concerne l'identification des produits réactionnels de la PAL, elle se fait couramment par HPLC couplée à une détection en U.V. ou en fluorescence (Rasmussen *et al.*, 1991), ou par HPLC couplée à une analyse par chromatographie en phase gazeuse (couplée à un spectromètre de masse (Orr *et al.*, 1993). Cependant les performances de ces techniques demeurent limitées quand on les applique à l'identification et à la quantification, à une échelle nanoanalytique, des phénols. Par exemple, la spectrométrie de masse requiert quelques  $\mu g$  de produit pour son identification, ce qui exclue une étude dynamique des voies de biosynthèse. Les mêmes restrictions s'appliquent aux techniques reposant sur l'utilisation de substrats radiomarqués qui, en outre, ne permettent pas de suivre sélectivement une voie donnée.

En ce qui nous concerne, **nous avons opté pour la technique HPLC-PDA.** Cette technique a permis de lever ces restrictions. Dans les années 80, l'identification de composés en HPLC a fait d'énormes progrès avec l'introduction des détecteurs à barrette de diodes (Figure 59) qui permettent, à partir de chaque produit élué, de réaliser un spectre d'absorption

U.V./visible, et de calculer des paramètres contrôlant sa pureté et son identité (Figure 60). Une colonne HPLC couplée à un détecteur U.V./visible à barrette de diodes rend, en effet, possible la séparation et l'identification simultanées des éluats. Par le traitement informatique des signaux on obtient, (i) des informations découlant de la structure chimique sont analysées en s'appuyant sur des banques de données et elles demeurent fiables lorsque l'analyse porte sur des picomoles de métabolites; (ii) l'homogénéité de chaque pic élué est contrôlée (Fallick et Romano (1995). Ainsi, la pureté de l'éluat est appréciée par le paramètre "purity angle", un produit étant pur si ce paramètre est proche de 0° et inférieur au paramètre "purity threshold" qui, lui, tient compte de la ligne de base fluctuant selon les conditions expérimentales (pH, solvant, température...). L'identification des produits se fait à partir des paramètres "match angle" et "match threshold" calculés d'après les données vectorielles des spectres U.V./ visible des produits élués et analysées par référence à des standards. Si le paramètre "match angle" est proche de 0°, le produit analysé est analogue au standard, ceci avec une erreur expérimentale évaluée d'après le paramètre "match threshold" qui tient compte des conditions d'élution (pH, température, solvant...).



Figure 59: Détecteur UV/Visible à barrette de diodes (Waters modèle 996).



Figure 60. Exemple de profil d'élution HPLC-PDA. Les composants phénoliques de référence sont élués d'une matrice chromatographique (phase inverse de type RP-18; 125 mm x 4 mm; diamètre des particules 5  $\mu$ m) par une phase mobile constituée des solvants I (5% d'acide acétique dans l'eau, v/v) et II (MeOH). Les conditions d'élution sont, dans ce cas, un gradient isocratique de 20 % de II dans I pendant 0-5 min, un gradient linéaire de 20 à 80 % de II dans I pendant 5-35 min, un gradient isocratique de 80% de II dans I pendant 35-45 min. Le volume d'injection de l'échantillon est de 100  $\mu$ l, et le débit de la colonne est de 1 ml. min<sup>-1</sup>. La détection est effectuée simultanément à 260 nm à 600 nm à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes.

# 3. Induction de la PAL par des O-glycannes isolés de glycoprotéines provenant de *Fusarium* sp. M7- 1 3.1. Détection

L'évaluation de l'activation PAL repose sur la mesure de la densité optique à 290 nm de milieux réactionnels renfermant des extraits enzymatiques isolés de protoplastes élicités ou non pendant 30 min. par les fractions Ja, Jb et Jc (Cf. Chapitre 3, A 2). La figure 61 indique que seul le signal Jc est fortement actif avec une valeur de R à 108 correspondant à une activité de 900  $\mu$ kat (kg protéine)<sup>-1</sup>. On note que le potentiel éliciteur du signal **Ja** est de R à 15, soit de 125  $\mu$ kat (kg protéine)<sup>-1</sup> et que la fraction **Jb** n'induit pas de réponse PAL.



Figure 61. Réponse PAL induite par les fractions Ja, Jb et Jc isolées de *Fusarium* sp. M7-1. 2.10<sup>6</sup> protoplastes de *Rubus* sont incubés pendant 30 min en présence ou non d'une fraction utilisée à la concentration de 100 nM. Les extraits enzymatiques PAL préparés à partir des protoplastes élicités (Ja, Jb et Jc) ou non (C) sont incubés pendant 30 min à 37°C avec 2,25 mM <u>L</u>-Phe, et l'activité PAL est suivie par spectrométrie à 290 nm. L'activité enzymatique mesurée par la vitesse de réaction ( $\Delta A_{290}$  min<sup>-1</sup>) est exprimée en µkat (kg protéine)<sup>-1</sup>; l'activation PAL est donnée par le rapport R (activité dans les protoplastes élicités sur l'activité dans les protoplastes de contrôle au temps t<sub>0</sub>). L'activité PAL est exprimée en µkat (kg protéine)<sup>-1</sup> ou en R (le rapport de l'activité dans des protoplastes élicités sur l'activité dans des protoplastes non-élicités). Une valeur sur le graphe correspond au traitement des données relatives à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets indépendants d'élicitation.

#### 3.2. Caractérisation

Des cinétiques PAL ont été développées en utilisant des extraits PAL provenant de suspensions renfermant au moins 85-90 % de protoplastes vivants incubés pendant 30 min ou pendant des temps variables avec l'éliciteur le plus actif (soit Jc) utilisé à la concentration de 100 nM (Figure 62).



**Figure 62.** Cinétique de réponse PAL induite par la fraction Jc isolée de *Fusarium* sp. M7-1. 2.10<sup>6</sup> protoplastes de *Rubus* sont incubés pendant un temps variable (de 0 à 30 h) avec la fraction Jc (100 nM) en présence (courbe a ) ou non (courbe b) de cycloheximide (1  $\mu$ M); la courbe c correspond à la cinétique développée dans des protoplastes non élicités en l'absence de cycloheximide. Les extraits enzymatiques PAL des protoplastes élicités ou non sont incubés pendant 30 min à 37°C avec 2,25 mM <u>L</u>-Phe, et l'activité PAL est dosé par spectrométrie à 290 nm. L'activité enzymatique mesurée par la vitesse de réaction ( $\Delta A_{290}$  min<sup>-1</sup>) est exprimée en  $\mu$ kat (kg protéine)<sup>-1</sup>; l'activation PAL est donnée par le rapport R (activité dans les protoplastes élicités sur l'activité dans des protoplastes de contrôle au temps t<sub>0</sub>). Une valeur sur le graphe correspond au traitement des données relatives à 4 courbes de cinétique, au moins, développées par échantillon provenant de 3 sets indépendants d'élicitation.

La figure 62 indique que la courbe d'activation PAL en réponse au signal Jc a une allure sinusoïdale (courbe a): le traitement éliciteur induit en 30 min, une activation rapide et transitoire de l'activité PAL de l'ordre de 900  $\mu$ kat (kg protéine)<sup>-1</sup>, soit une activation de valeur R égale à 108. Pour un temps long d'élicitation, au-delà de 20 h, un deuxième pic s'amorce correspondant à une réponse PAL de l'ordre de 750  $\mu$ kat (kg protéine)<sup>-1</sup> soit une valeur R de 90 pour 30 h de traitement. On observe que la présence de cycloheximide (courbe b) atténue largement la réponse PAL tardive qui est de 21 % seulement alors que son effet est moindre sur la réponse précoce maintenue à 88 %. L'activité PAL dans des protoplastes non traités (courbe c) est faible et elle ne fluctue pas d'une façon significative jusqu'à 20 h.

Au cours d'un traitement éliciteur d'une courte durée, inférieur à 5 heures, l'activité spécifique PAL croît alors que le taux de protéines extractibles ne change pas; au delà de 5 heures, la teneur en protéines extractibles croît d'un facteur 5 indiquant par rapport à celles d'une courte durée, ce qui indique l'existence d'une synthèse *de novo* de l'enzyme (non représenté).

#### 3.3 Identification des produits réactionnels

#### 3.3.1. Données préliminaires

Des extraits bruts PAL, préparés à partir de  $2.10^6$  protoplastes élicités ou non par la fraction Jc (100 nM) ont été incubés pendant 4 h à 37°C en présence de 2,25 mM <u>L</u>-Phe; les composés phénoliques du milieu réactionnel, extraits quantitativement par acétate d'éthyle ont été analysés par CCM, et les caractéristiques spectrométriques ont été déterminées. Les données préliminaires obtenues ont été ensuite utilisées pour mettre au point des conditions d'analyse par HPLC-PDA.

208

#### (i) Analyse par chromatographie sur couches minces de silice.

Les produits réactionnels déposées sur couches minces de silice ont migré à l'aide du solvant A: toluène/ MeOH/ acétate d'éthyle (10: 1: 1, v/v). La détection est réalisée sous U.V. (254 nm) et/ ou par une révélation à l'iode. On note que l'échantillon provenant de protoplastes élicités présente 2 spots majeurs de R<sub>f</sub> de 0,7 et 0,87; les produits issus des protoplastes témoins présentent approximativement le même chromatogramme, mais en quantité 3 fois plus faible environ (non représenté). Les standards analysés dans les mêmes conditions donnent les valeurs suivantes de Rf : vanilline (Rf de 0,6), acide *t*-cinnamique (Rf de 0,4), acide férulique (Rf de 0,08); aldéhyde salicylique (Rf de 0,85).

#### (ii) L'analyse par spectrophotométrie.

Les produits réactionnels extraits de l'activité PAL provenant de protoplastes élicités ou non sont solubilisés dans un milieu éthanolique et analysés par spectrophotométrie à des longueurs d'ondes variables (entre 240 et 340 nm).

En milieu éthanolique, le spectre des produits réactionnels issus de protoplastes non élicités présents une absorbance maximale ( $\lambda_{max}$ ) à 275 nm, tandis que les produits réactionnels des protoplastes élicités ont un  $\lambda_{max}$  à 262 nm. Le déplacement bathochrome en milieu alcalin dans les 2 cas (protoplastes élicités ou non) est de quelques 2 nm. Par contre le déplacement bathochrome induit par le réactif AlCl<sub>3</sub> n'est pas significatif (non représenté).

En réponse à l'éliciteur plusieurs produits réactionnels PAL sont détectables d'une polarité proche de celle d'unités phénylpropanoïdes  $C_6$ - $C_3$  (272 nm); en plus, ces produits auraient des groupement méthoxylés (après leur co-migration avec des standards et d'après le déplacementn bathochrome). L'dentification des produits réactionnels est très difficile à faire avec ces techniques en raison de la multitude des familles des produits qui peuvent présenter les mêmes caractéristiques; néanmoins, on retiendra l'hypothèse d'unités cinnamiques et/ou benzoïques.

#### 3.3.2. Analyse par HPLC-PAD

Les analyses préliminaires rapportées ci-dessus permettent proposer que plusieurs unités cinnamates pourraient être parmi les produits réactionnels PAL. Ces données seront retenues pour choisir la polarité des solvants de l'analyse HPLC-PDA.

#### (i) Définition des conditions expérimentales d'analyse HPLC-PDA

Afin d'analyser par HPLC-PAD les produits réactionnels des extraits PAL issus des protoplastes élicités ou non, nous avons utiliser une colonne de type RP-18 avec la phase mobile: sovants I (acide acétique 5 % (v/v)) et II (méthanol). Les conditions d'élution choisies sont un gradient isocratique de 15 % de (II) dans (I) pendant 5 min puis, de 5 à 35 min, un gradient linéaire allant de 15 % de (II) dans (I) à 80 % de (II) dans (I), et enfin, de 35-45 min, un gradient isocratique de 80 % de (II) dans (I) (Figure 60).

Dans un premier temps on a enregistré le profil d'élution des standards externes, on a noté les temps de rétention (Tr), et les caractéristiques spectrophotométriques des produits (absorption sous U.V. à 256 nm, 280 nm et 310 nm) et on a effectué une quantification à 310 nm par référence à la surface du pic. La valeur (Tr) des standards externes sont de 8,54 min pour la vanilline, de 13,45 min pour l'acide férulique et de 22,57 min pour l'acide *t*-cinnamique.

#### (ii) Analyse des échantillons provenant des protoplastes élicités ou non

Les chromatogrammes à 256 nm des produits phénolique des milieux réactionnels PAL issus des protoplastes élicités par la fraction Jc (Figure 63 B) donnent les pics majeurs F, X1, X2, X3, X4, X5 ayant des temps de rétention (Tr) à 13,45; 31,07 min., 33,1 min., 37,6 min., 40,74 min. et 42,37 min. respectivement. Les chromatogrammes provenant des protoplastes de contrôle (Figure 63 A) montrent des quantités plus faibles de produits (pic X4) ou plus élevées (cas des pics X1, X2, X3 et X5.), mais le pic F (Tr à 13,45 min ) est absent.

La détection à 310 nm (Figure 63 C) révèle que le pic F est homogène, et, par référence à l'analyse d'un standard, il a été identifié à de l'acide férulique. Ce pic se détecte dans l'échantillon élicité (courbe b) et il est absent dans le chromatogramme des témoins (courbe a). Par contre, les autres produits n'ont pas été identifiés. La quantification des produits phénoliques à 256 nm montre que l'application de la fraction Jc (100 nM) à 2.10<sup>6</sup> protoplastes pendant 30 min induit une accumulation de 1,3 nmoles d'acide férulique. De même, le signal Jc fait décroître d'un facteur 0,4, 0,45, 0,42 et 0,37 les pics X1, X2, X3 et X5 respectivement, et fait croître d'un facteur 1,7 le pic X4 . Ces données démontrent que la réponse d'élicitation induite par Jc ne se limite pas à l'activation de l'enzyme PAL mais qu'elle provoque l'activation d'un complexe enzymatique comprenant la PAL et d'autres enzymes de la voie des phénylpropanoïdes dont une cinnamate 3-*O*-méthyltransférase.



Figure 63. Profil chromatographique HPLC des phénols issus des milieux réactionnels PAL obtenus à partir des protoplastes de *Rubus* élicités pendant 30 min par la fraction Jc (100 nM) (A) (C) ou non traités (B). Les composants phénoliques d'un milieu réactionnel sont déposés sur une colonne RP-18 et élués avec la phase mobile qui est un mélange de solution I (acide acétique 5 %) et de solution II (MeOH). La programme d'élution a été: entre 0 et 5 min un gradient isocratique réalisé par 15 % de II en I; entre 5 et 35 min un gradient linéaire de 15% de II en I jusqu'à 80 % de II en I et entre 5 et 45 min un gradient isocratique de 80 % de II en I. Le volume d'injection de l'échantillon est de 100  $\mu$ l, et le débit de la colonne est de 1 mL min<sup>-1</sup>. La détection a été effectuée simultanément à 260 nm (A, B) et à 310 nm (C) à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes.

## 4. Caractérisation de la réponse PAL induite par des signaux isolés de *Fusarium oxysporum* sp.

Le travail préliminaire d'investigation sur le potentiel éliciteur de fractions isolées de *Fusarium oxysporum* sp. réalisées dans le laboratoire CERMAV avait permis de sélectionner la fraction B3 comme signal induisant le marqueur PAL. Dans le cadre de ce chapitre 3, nous avons poursuivi l'analyse de la réponse PAL induite par cette fraction.

On rappelle que la fraction B3 a été isolée de *Fusarium oxysporum* sp. (Figure 23 B), et qu'elle a été identifiée à un mélange di- et trisacchariques (Figure 49). Ceci nous a permis d'exprimer la quantité en molarité. B3 induit une activation PAL évaluée à R égal à 18 (Figure 28 A) dans des suspensions de 4.10<sup>6</sup> cellules traitées pendant 30 min.

Dans ce chapitre, la réponse PAL a été étudiée comme cela a été détaillé ci-dessus pour la réponse induite par la fraction Jc: elle a été suivie au cours du temps et les produits réactionnels ont été analysés par CCM et par HPLC-PAD.

#### 4.1. Caractérisation

Des cellules de élicitées par la fraction B3 (100 nM) révèlent une courbe de cinétique PAL similaire à celle présentée pour l'éliciteur Jc de la figure 62 (courbe b). Cette courbe non représentée ici montre 2 pics PAL: les cellules ont une réponse Pal précoce vers 30 min (R de 18, soit 150  $\mu$ kat (kg protéine)<sup>-1</sup>) et une deuxième activation après 20 h d'élicitation avec la valeur R de 23 (soit 191,6  $\mu$ kat (kg protéine)<sup>-1</sup>) après 30 h. De même, la réponse en présence de cycloheximide (1  $\mu$ M) est similaire à celle illustrée pour la fraction Jc (Figure 63, courbe a). En effet, en présence de cycloheximide la réponse précoce est maintenue à 92 % (soit une inhibition de 8 %) et la réponse tardive vers 30 h correspond à une inhibition de 78 %.

#### 4.2. Identification des produits réactionnels PAL

#### 4.2.1. Données préliminaires

#### (i) Analyse par chromatographie sur couche mince de silice

Les produits réactionnels issus des échantillons PAL provenant des cellules élicitées par la fraction B3 ou non sont déposés sur des couches minces de silice en présence des standards (aldéhyde salicylique, vanilline, acide *t*-cinnamique et acide férulique). Après migration en présence du solvant: A, toluène/ MeOH/ acétate d'éthyle (10: 1: 1, v/v) et détection sous U.V. (254 nm) avant ou/et après révélation à l'iode, les résultats sont les suivants (non représenté): l'échantillon des cellules élicitées ou contrôle présentent un seul spot avec un Rf de 0.87 (le standard aldéhyde salicylique a un Rf de 0,85). La seule différence détectable par cette technique entre élicité et contrôle porte sur la concentration en produits réactionnels de 2 fois plus élevée dans l'échantillon élicité que dans le contrôle.

#### (ii) L'analyse par la spectrophotométrie

Les produits réactionnels issues des cellules élicitées ou non sont solubilisés dans un milieu éthanolique et analysés par la spectrophotométrie à des longueurs d'ondes variables (entre 240 et 340 nm).

On observe que l'échantillon provenant de cellules élicitées a un pic d'absorbance à 260 nm tandis que celui du contrôle présent un maximum d'absorbance vers 275-280 nm.

#### 4.2.2. Analyse par HPLC-PAD

Les analyses ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe C 3.3.2. Les résultats de la figure 64 montrent: (i) le chromatogramme de l'échantillon provenant de cellules élicitées présente 5 pics majeurs appelés S, Y1, Y2, Y3 et Y4 ayant un temps de rétention de 13,57; 33,1; 37,6; 39,4 et respectivement 40,74 min (Figure 64 B); (ii) le chromatogramme de l'échantillon provenant du contrôle a 3 pics majoritaires Y1, Y2 et Y4 ayant un Tr de 33,1; 37,6 min et 40,74 min respectivement (Figure 64 A); le pic Y3 n'est pas présent ici. Par référence à l'analyse d'un standard, le pic S été identifié a de l'aldéhyde; les autres pics n'ont pas été identifiés.

En comparant les surfaces des pics des chromatogrammes A et B, on observe une croissance de 1,5 fois pour le pic Y1 de A par rapport à B, mais par contre les pics Y2 et Y4 de A diminuent d'un facter 1.5 et 2 respectivement dans B. L'application de la fraction B3 (100 nM) à 4.106 cellules pendant 30 min induit une accumulation de 0,25 nmoles d'aldéhyde salicylique (pic S).

Cette donnée indique que la PAL n'est pas seule activée par l'éliciteur, des enzymes de la voie des benzoates seraient aussi élicitées.



Figure 64. Profil chromatographique HPLC des phénols issus des milieux réactionnels PAL obtenus à partir des cellules de *Rubus* de contrôle (A) ou élicitées (B) pendant 30 min; par la fraction B3 (100 nM). Les composants phénoliques d'un milieu réactionnel sont déposés sur une colonne RP-18 et élués avec la phase mobile qui est un mélange de solution I (acide acétique 5 %) et la solution II (MeOH). La programme d'élution a été: entre 0 et 5 min un gradient isocratique réalisé par 15% II en I; entre 5 et 35 min. un gradient linéaire de 15% à 80% II en I et entre 5 et 45 min. un gradient isocratique 80 % II en I. Le volume d'injection de l'échantillon est de 100  $\mu$ l, et le débit de la colonne est de 1 mL. min<sup>-1</sup>. La détection a été effectuée à 260 nm à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes.

#### **D. DISCUSSION**

Le champignon du genre *Fusarium* induit des désordres d'ordre physiologique ou génétique dans un large spectre des plantes. Il est aussi responsable de plusieurs maladies chez les animaux, ainsi que chez les humains (Nelson *et al.*, 1994). Des changements du métabolisme oxydatif de la plante se produisent quand les réactions de défense de la plante se mettent en place en réponse à l'attaque du pathogène. Les activités redox sont impliquées dans des mécanismes de défense locale ou systémique (Sutherland, 1991; Mehdy, 1994).

Au cours du "burst oxydatif" des EAO ( $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet}$ ,  $HO^{\bullet}$  ou ROO<sup>•</sup>) sont générées. Elle peuvent provoquer une peroxydation lipidique (Vera-Estrella *et al.*, 1992), être impliquées dans la formation de lignines ou de phytoalexines, et oxyder des protéines de la paroi cellulaire.

Parmi les facteurs induisant un" burst oxydatif" au cours de réactions précoces de défense, on a identifié des carbohydrates et des peptides. Ces composés sont d'origine fongique ou bien ils appartiennent à la plante-hôte (Low et Heinstein, 1986; Vera-Estrella *et al.*, 1992; Nurnberger *et al.*, 1997). Par exemple, des oligomères d'acide galacturonique de *Phaseolus vulgaris* sont connus pour provoquer un "burst oxydatif" chez la plante-hôte (Apostol *et al.*, 1989). Ainsi, des galactoglucomannanes du pathogène *Colletrichum*, sont capables d'activer la peroxydation lipidique via des EAO (Rogers *et al.*, 1988).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons montré, pour la première fois, que des carbohydrates isolés du champignon *Fusarium* élicitent, en quelques minutes dans des suspensions de protoplastes végétaux, un "burst oxydatif" ainsi que l'activation de la PAL. A propos du "burst oxydatif" élicité chez *Rubus*, on a observé que des *O*-glycanes ou des oligomères utilisés à faible concentration (10 pM, 100 nM), déclenchaient en quelques minutes la production d'EAO. Le fait que des protoplastes répondent à l'éliciteur indique que la paroi cellulaire n'intervient pas dans la perception et dans l'expression des réponses. Dans ce cas, la production d'EAO a été amorcée probablement par des interactions spécifiques plasmalemmiques de type ligand-récepteur compte tenu de la faible dose optimale d'efficacité du produit.

Les EAO du "burst oxydatif" jouent le rôle d'agents toxiques contre le pathogène. Ils peuvent être aussi impliqués dans des séquences de transduction des signaux (Doring et Luthje, 1996). Par contre, on ne sait pas encore si chez les plantes comme chez les animaux, ce sont des messagers secondaires régulant l'expression de gènes. Cependant, on a pu montrer que des activités redox induisaient des signaux trans-membranaires en modifiant la concentration en Ca<sup>2+</sup>, en inositol triphosphate /ou en diacyl glycérol (Dixon *et al.*, 1994; Low et Merida, 1995; Ward *et al.*, 1995), en changeant le profil électrophorétique de protéines (Zhou *et al.*, 1995) ou en activant des enzymes (Bent, 1996), et l'implication d'une GTPprotéine dans le "burst oxydatif" a été retenue (Legende *et al.* (1992). Au cours d'un traitement éliciteur, l'enzyme NADPH oxydase contrôle la production de radicaux superoxyde (Doke, 1983; Mehdy, 1994), la première étape de production des EAO. Elle est activée par un protéine-kinase et/ou par des acides gras libérés des membranes par la PLA<sub>2</sub> (Brightman *et al.*, 1991).

Chez *Rubus*, quand leur respiration mitochondriale a été bloquée, les protoplastes peuvent répondre à un signal fongique en augmentant leur consommation d'oxygène (suivie à l'aide d'une électrode de Clark, en générant l'anion  $O_2^{\bullet}$  (ce qui a été détecté par la réduction du Cyt c), et en libérant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ce qui est suivie par la baisse de fluorescence de la pyranine.

La réduction du Cyt c est modifiée par les acides linoléique ou caféique. L'acide caféique, connu comme inbibiteur d'activité LOX, diminue l'effet de la PLA<sub>2</sub> et de l'acide linoléique mais il ne modifie pas les effets induits par l'acide stéarique. De même, la baisse de la fluorescence est diminuée par l'acide linoléique, et non par l'acide stéarique. En conséquence, les EAO seraient en relation avec la voie lipoxygénase, et impliquées vraisemblablement dans la peroxydation d'acides gras insaturés de la voie octadécanoïdique (acides linoléique, linolénique, arachidonique...). L'activation des enzymes LOX, peroxydases et époxyhydrolases (Siedow, 1991) est bien connue pour produire des métabolites de défense comme les jasmonates et la traumatine.

L'enzyme SOD réalise la transformation de  $O_2^{\bullet}$  en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mehdy, 1994). En effet, on a observé que dans les suspensions de protoplastes élicités en présence de SOD en milieu aérobie, la réduction du Cyt c diminuait et la fluorescence de la pyranine baissait d'une façon significative. L'addition de catalase dans le milieu d'élicitation ne perturbe pas d'une manière importante la production de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, mais détruit en grande partie l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite.

Ces expériences indiquent que  $1'O_2^{\bullet-}$  serait utilisé dans plusieurs séquences, l'une d'entre elles étant la transformation dans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Elles montrent que la catalase n'interviendrait pas dans la production d'O<sub>2</sub><sup> $\bullet-$ </sup>, et que le signal éliciteur activerait des peroxydases endogènes; l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> serait un oxydant ou substrat pour la catalase sans interférer avec la synthèse de l'O<sub>2</sub><sup> $\bullet-$ </sup>.

La production des EAO et leurs effets dans les plantes ressemblent à ce qui existe dans les cellules animales. On a souligné ci-dessus des homologies entre les séquences des NADPH-oxydases des animaux avec celles des plantes. On peut aussi évoquer l'analogie de la structure chimique des produits de la voie octadécanoïdique des plantes, avec les prostaglandines et les leukotriènes des animaux (Doares *et al.*, 1995). A propos de l'élicitation de la PAL chez *Rubus*, on a observé que les interactions de la fraction Jc (à une faible concentration, 100 nM) avec des protoplastes résultent en une activation précoce de la PAL, suivie d'une deuxième réponse tardive au delà de 24 h. La cinétique PAL effectuée sur un extrait enzymatique PAL issu de protoplastes élicités en présence ou non de la cycloheximide (inhibiteur de la traduction) a révélé que la réponse précoce relèverait de modifications post-traductionelles alors que la réponse tardive reposerait sur la synthèse *de novo* de l'enzyme. Donc on note une phase initiée en quelques minutes, correspondant à un signal rapide de transduction et une régulation post-traductionnelle de la PAL, et une deuxième phase, différée dans le temps, au cours de laquelle le niveau d'ARNm s'élève et s'accompagne de la synthèse *de novo* de l'enzyme.

Les signaux fongiques Jc et B3 déclenchent tous deux l'activation de la PAL mais ils impliquent des voies phénoliques différentes. L'analyse par HPLC-PAD, des produits réactionnels de la PAL provenant de protoplastes élicités indique que Jc a induit la synthèse de l'acide férulique, alors que B3 a induit celle de l'adéhyde salicylique. Dans le premier cas, c'est la conséquence de l'activation d'un complexe PAL regroupant des cinnamatehydroxylases (dont la cinnamate 4-hydroxylase), des cinnamate-Co A ligases (dont la *p*coumarate-CoA ligase), une cinnamate 3-*O* méthyltransferase (dont une caféate 3-*O* méthyltransferase). Dans le second cas, ce sont des enzymes de la voie benzoate qui, en plus de la PAL, sont activées.

Des O- méthyltransferases a été mis en évidence par Schmitt et al. (1991) dans le cadre d'interactions plante-pathogène. Par exemple, des 3-O methyltransferases élicitées chez le pois ou chez le tabac modifient des phénylpropanoïdes ou des flavonoïdes (Mathieu et al., 1994).

218

Chez les végétaux supérieurs, un lien a été établi entre des réactions du "burst oxydatif", et l'activation du métabolisme phénylpropanoïdique . Par exemple, une cinnamate 4-hydroxylase and une férulate 5-hydroxylase sont activées en présence de monooxygenases, P450 dépendantes (Werck-Reichhart, 1995, Meyer *et al.*, 1996). Une fois générés, les produits phénoliques modulent à leur tour la production EAO. En particulier, l'acide caféique, l'acide férulique ou un dérivé: la curcumine ont un effet d'inhibiteur sur des decarboxylases (Huang *et al.*, 1988) ou sur la peroxydation de lipides membranaires.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

L'acquisition des données de biochimie permettra de préparer, à partir du ou des motifs (s) biologiquement actifs des ligands fonctionnalisés. Ces ligands sont des sondes oligosaccharidiques et/ou glycoprotéiniques indispensables *in vivo* et *in vitro* à l'isolement et à la caractérisation des récepteurs plasmalemmiques impliqués dans la reconnaissance du signal éliciteur. Auparavant, évidemment, se sera imposée la vérification que les interactions signal-cellules (protoplastes) sont bien de type ligand-récepteur. Cette vérification repose sur l'utilisation de tests ELISA, cinétique dépendants, effectués à partir de sondes oligosaccharidiques marquées.

L'acquisition d'informations sur les modalités de perception du signal seront utiles pour approfondir **la connaissance des relations structure-activité nécessaires à des applications biotechnologiques.** De plus en plus, des travaux sont développés dans différents laboratoires en vue de l'utilisation d'oligosaccharides éliciteurs par des partenaires industriels. En effet, ces molécules sont capables de stimuler les défenses naturelles des plantes face à des micro-organismes, et elles sont aussi capables de contrôler certaines phases clefs de développement des plantes (germination, floraison etc...) comme peuvent le faire des hormones (auxines, cytokinines..).

En conséquence, l'utilisation des éliciteurs ouvre une voie nouvelle vers l'utilisation en agriculture de substances spécifiques entrant dans la composition d'engrais ou de produits phytosanitaires qui sont efficaces pour les récoltes sans polluer l'environnement et sans changer définitivement le patrimoine génomique de la plante.

#### **B.** Perspectives et retombées biotechnologiques

L'approche pluridisciplinaire effectué à ce jour a permis d'isoler du champignon Fusarium un signal oligosaccharidique actif dans l'élicitation d'une réponse PAL, en particulier dans l'activation d'un complexe PAL. En outre, les résultats de biochimie dégagent la spécificité de l'interaction. Un des prolongements de ce travail sera d'élucider le mode d'action de cet éliciteur, une bonne connaissance des mécanismes biochimiques de perception est requis pour déboucher sur des applications biotechnologiques (voir ci-dessous).

Pour ce faire, on devra travailler dans deux domaines:

(i) sur un plan d'analyse chimique, il faudra compléter les données d'analyse structurale de l'éliciteur, apporter des informations sur sa structure tridimensionnelle, et fonctionnaliser le motif biologique retenu comme biologiquement efficace. Ce dernier point est indispensable aux biochimistes pour les études d'interactions de type ligand -récepteur mentionnées ci dessous, et pour détailler les relations structure-activité dans le cadre d'applications biotechnologiques;

(ii) sur un plan d'analyse biochimique, il faudra développer des études qui conduiront à **l'identification du motif actif** capable d'activer spécifiquement une réponse PAL ou EAO. Chacune de ces réponses intervient dans la défense du végétal et peut donc faire l'objet d'applications biotechnologiques. Pour cela, des relations **structure-activité** seront détaillées chez des **plantes- hôtes** et **non-hôtes**. Ensuite, les informations obtenues seront complétées par des comparaisons entre plusieurs systèmes qui relèvent du monde végétal mais aussi animal.

des lignines et pour son potentiel antioxydant, le second comme dérivé de l'acide salicylique, ce dernier bien connu pour ses fonctions biologiques (Cf. Chapite 1, A 2.7). Il faut remarquer que c'est la première fois que l'on met en évidence la synthèse d'acide férulique en rapport avec un processus d'élicitation alors que quelques auteurs avaient observé, sans en expliquer les bases moléculaires, une forte accumulation d'acide férulique dans des graminées contaminées par *Fusarium*.

En rapport avec le marqueur PAL intensément élicité par différents signaux fongiques, nous avons analysé les séquences du métabolisme des phénylpropanoïdes impliquées dans la réponse.

Les résultats permettent de dégager les données suivantes:

(i) nous avons montré que la réponse PAL se déroule selon deux phases: **une phase précoce initialisée** en quelques minutes et une **phase plus tardive** à partir de 5 h de traitement. Nous avons aussi noté que la réponse d'élicitation relève vraisemblablement de 2 mécanismes distincts. Pour des temps courts, il y aurait des modifications posttraductionnelles en rapport avec la transduction du signal. Pour des temps plus longs d'interaction, on a retenu l'existence d'une synthèse protéique donnant lieu à la réponse tardive dont l'intensité est très supérieure à celle de la réponse précoce, et qui est inhibée en présence de cycloheximide;

(ii) les courbes en forme de "cloche" caractérisant les réponses PAL obtenues dans les protoplastes en fonction de la dose en éliciteur, et la gamme de concentration observée pour la dose optimale d'efficacité **confirment la spécificité de l'interaction**, ce qui suggère une interaction éliciteur -protoplaste (cellule) de type ligand-récepteur;

(iii) la capacité des protoplastes à être élicités (avec une intensité supérieure à celle des cellules) montre que la paroi cellulaire n'est pas indispensable pour obtenir une réponse physiologique, ce qui argumente en faveur du rôle du plasmalemme dans des liaisons spécifiques avec l'éliciteur c'est à dire un motif chimique efficace.

Un produit réactionnel PAL a été été identifiée à une échelle nanoanalytique par chromatographie HPLC-PAD. Il s'agit de l'acide férulique élicité par les fractions oligosaccharides issues de *Fusarium* sp. M7-1, et de l'aldéhyde salicylique élicité par oligosaccharides issues de *Fusarium oxysporum* sp. Ces produits sont répertoriés pour avoir un rôle clef dans la défense des plantes contre des pathogènes, le premier comme précurseur Dans le cas de l'élicitation de réactions physiologiques de défense impliquant des PR-protéines comme un inhibiteur de protéase apparenté au groupe des PR-5, comme des glycohydrolases ou bien impliquant l'activation de la PAL, enzyme clef dans la synthèse de phytoalexines, nous avons confirmé l'influence de la structure chimique, du DP et de la dose en éliciteur sur la réponse physiologique de défense.

En ce qui concerne **la modulation de la thiol-protéase papaïne**, les résultats ont montré que les signaux B et Bgp sont des inhibiteurs, avec une inhibition évaluée à 7 % et 12,6 % respectivement. Le composant B1, C et ses composants (C2, C3) sont des activateurs de l'ordre de 3 % et 8 %. Pour **la modulation de l'activité**  $\alpha$ -chymotrypsine on observe un effet opposé; les signaux Bgp, B ne sont pas actifs, mais B1, B2, B3, C2 et C3 sont des inhibiteurs, avec des valeurs d'inhibition de l'ordre de 11-21 % pour les premiers ou de 4-6 % pour les autres. Ce fait dégage une fois encore la relation structure-activité.

En ce qui concerne la (1,4)- $\alpha$ - $\underline{D}$ -galacturonase, enzyme impliquée dans des réactions de défense mais aussi dans le contrôle de certains stades de développement de la plante, on a observé qu'elle n'est pas élicitée par les signaux isolés de *Fusarium oxysporum* sp. Par contre, l'enzyme provenant de cellules élicitées a une activité amplifiée d'un facteur 2-3 par un inhibiteur de papaine et d' $\alpha$ -chymotrypsine isolé de cellules élicités par Bgp (Figure 31 C) et B1 (Figure 31 B). relations structure-activité: nous avons établi des corrélations entre une certaine structure, une certaine concentration du signal et la réponse physiologique générée.

Ainsi, les structures oligosaccharidiques testées (Cf. Chapitre 3, B) induisent en quelques minutes la production importante d'EAO (oxygène, anion superoxyde, eau oxygènée) sur un matériel biologique représenté par des protoplastes (cellules) en suspension. Les principales techniques à l'aide desquelles nous avons étudié cette production ont été la consommation d'oxygène dans une électrode de Clark, le suivi de la réduction du Cyt c et celui de la pyranine. Les principales enzymes impliquées dans ce processus de réduction sont la NAD(P)H oxydase, les superoxyde dismutase et catalase. On a montré que l'activité de la NAD(P)H oxidase "visualisée" via la réduction du Cyt augmente en réponse au signal Jc, et que cette réponse est modulable par des acides gras ou par la phospholipase A<sub>2</sub>. De même, la consommation d'oxygène s'élève à 200 % par rapport au contrôle non-élicité, et en ajoutant de la phospholipase A<sub>2</sub> (activateur de la NAD(P)H oxydase) la consommation est augmentée à 240 %.

Les EAO produites sont des espèces toxiques pour le pathogène mais elles peuvent être aussi des messagers secondaires (Chapitre 3, B). Notre travail argumente en faveur de cette dernière hypothèse: ce rôle a été dégagé en utilisant des modulateurs de LOX, de peroxidation lipidique, de respiration mitochondriale. L'acide caféique (inhibiteur de la 5-LOX) bloque l'effet stimulateur de la PLA<sub>2</sub> et aussi celui d'acides gras ayant une fonction diène. Par exemple, la consommation d'oxygène dans des protoplastes élicités par la fraction Jc (200 % par rapport au contrôle non-élicité) augmente en présence de la PLA<sub>2</sub> (240 % par rapport au contrôle) ou de l'acide linoléique (235 % par rapport au contrôle) ou de l'acide stéarique (235% par rapport au contrôle) mais en présence d'acide caféique les réponses s'abaissent à 160%, 150% ou se maintiennent à 234% respectivement. impliquées dans la transduction du signal perçu, soit des séquences de voies métaboliques activées.

On rappelle que la capacité des oligo-, polysaccharides à induire chez les végétaux des processus physiologiques majeurs de défense ou à intervenir dans différentes phases de leur développement a été démontrée pour la première fois par Darvill et Albersheim (1984). Depuis, de très nombreuses structures glycanniques actives ont été identifiées (Cf. Chapitre 1, A 2) et leur mode d'action a fait l'objet de nombreux travaux (Cf. Chapitre 1, A 1).

Dans cette thèse, nous avons apporté des informations supplémentaires en identifiant des oligosaccharides du champignon *Fusarium* à des molécules "signal". Ces molécules sont soit dérivées de glycoprotéines isolées du mycelium de *Fusarium* sp. M 7-1, soit elles proviennent de *Fusarium oxysporum* sp. Dans ce dernier cas, leur analyse effectuée dans le cadre de la thèse, a permis de les identifier à des oligosaccharides de type  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp  $(1\rightarrow 4) \alpha$ -<u>D</u>-Manp,  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp  $(1\rightarrow 2)$ - $\alpha/\beta$ -<u>D</u>-Glcp (Figure 49) ou  $\beta$ -<u>D</u>-Manp  $(1\rightarrow 2) \alpha$ -<u>D</u>-GlcA (Figure 42). Ces oligosaccharides dont la structure n'a jamais été mentionnée auparavant dans la littérature sont les dimères,  $\alpha$ -<u>D</u>-Manp  $(1\rightarrow 2)$ - $\alpha/\beta$ -<u>D</u>-Glcp (Figure 49).

Ainsi, nous avons testé le potentiel biologique des fractions isolées de Fusarium oxysporum sp. ou Fusarium sp. M 7-1: appliquées à des suspensions de protoplastes (de cellules), elles sont élicitrices. Par un traitement éliciteur de courte durée (5 à 30 min) effectué à des doses nanomolaires, elles induisent des marqueurs de réactions de défense précoces et/ou tardives.

L'expression *in vitro* des réponses de défense élicitées comme la production d'EAO, l'activation de la PAL, de glycohydrolases, d'inhibiteur de protéase a été étudiée. Les réactions précoces induites, spécialement la génération d'espèces activées d'oxygène, et l'activation de la PAL ont bénéficié d'une attention importante. Nous avons dégagé des

#### A. Bilan des résultats expérimentaux

Le domaine des relations plante-pathogène est encore très mal connu. En effet, les analyses sont centrées sur l'expression d'une réponse physiologique qui n'est que la phase finale d'une cascade d'évènements biochimiques. Les premières étapes des interactions plante-pathogène, en rapport avec la perception d'un signal et avec sa transduction, demeurent les plus difficiles à caractériser alors qu'elles ont un rôle déterminant dans l'expression de la réponse. Initiées en quelques minutes, ces étapes de reconnaissance du pathogène par la plante, déclenchent la production de métabolites de structure chimique diverse et complexe, à fonction multiple, d'apparition transitoire souvent et toujours en quantité très faible. En conséquence et pour le moment, il demeure impossible d'identifier l'ensemble des séquences enzymatiques impliquées dans les étapes précoces qui contrôlent l'expression d'une réponse physiologique en provoquant l'activation d'une cible (enzyme, gènes).

Notre travail de thèse a donc porté sur un aspect délicat des relations plantepathogène, puisque il a été focalisé sur les événements de reconnaissance d'un signal par la cellule végétale. Nous avions au départ l'objectif de rechercher et d'identifier des molécules de *Fusarium* capables d'être perçues comme un signal par la plante. Pour se faire, nous avons retenu comme modèle biologique des suspensions de cellules (protoplastes) de *Rubus* et comme "agresseur", donc comme signal potentiel, des fractions isolées du mycelium du champignon *Fusarium*.

Les résultats de ce travail ont été nombreux et très diversifiés grâce à l'approche pluridisciplinaire utilisé. Les principales étapes de cette étude ont porté sur l'isolation, la purification de fractions oligosaccharidiques ainsi que sur la caractérisation structurale de certaines fractions purifiées. Elles ont aussi été axées sur la caractérisation biochimique de marqueurs d'élicitation, en analysant soit des séquences enzymatiques

## LISTE DE PUBLICATIONS

1- <u>MIHAI NITA-LAZAR</u>, " *Mecanisme implicate in procesele de aparare la plante*" St. Cerc. Biochim. 1997, sous presse.

2- <u>MIHAI NITA-LAZAR</u>, " *Metode de determinare a interactiei ligand-receptor*" St. Cerc. Biochim. 1997, sous presse.

3- <u>Mihai NITA-LAZAR</u>, Lionel CHEVOLOT, Shojiro IWAHARA, Kaoru TAKEGAWA, and Yvette LIÉNART, "*Rapid and transient changes in phenylpropanoid pathway elicited in raspberry protoplasts by O-glycans of Fusarium sp. M7-1*". Plant and Cell Physiology, soumis (1998).

4- <u>Mihai NITA-LAZAR</u>, Shojiro IWAHARA, Kaoru TAKEGAWA, and Yvette LIÉNART, "*The active oxygen response of raspberry protoplasts to O-glycans of Fusarium sp. M7-1*. "Plant Physiology, soumis (1998).

5- <u>MIHAI NITA-LAZAR</u>, Yvette Lienart, "O-glycans isolated from fusarium glycoproteins induce a pal complex activity in raspberry protoplats", XIX<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols, 1-4 Septembrie 1998, Lille, Franta.

6- <u>MIHAI NITA-LAZAR</u> and Y. LIENART, "Characterization of an oxidative burst induced in raspberry protoplasts by O-glycans from Fusarium glycoproteins", The First International Meeting of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology", Bucharest, 24-26 September, 1998. 7- <u>MIHAI NITA-LAZAR</u>, Lionel CHEVOLOT, Yvette Lienart, "Induced a PAL complex activity by O-glycans isolated from fusarium glycoproteins", The First International Meeting of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Bucharest, 24-26 September, 1998.

8- <u>Mihai NITA-LAZAR</u>, Carem VARGAS-RECHIA and Yvette LIENART "Signaling events elicited in Rubus fruticosus by defined oligosaccharide structures" 2<sup>nd</sup> Congress of Pharmeceutical Science, 27-31 Mars, accepte 1999.

## REFERENCES
Alber T. (1992). Structure of the leucine zipper. Curr. Opin. Genet. Dev., 2, 205-210.

Albersheim P., Darvill A. (1985). Les oligosaccharines. Pour la science, 18-26.

Albersheim P., Nevins D.J., English P.D., Karr A. (1967). Carbohydr. Res., 5, 340-345.

Alconada T.M., Martinez M.J. (1995). Isolation of protoplasts from vegetable tissus using extracellular lytic enzymes from Fusarium oxysporum f. sp. Rev. Argent. Microb. 27, 191-197.

Aldington S., Fry S.C. (1993). Oligosaccharins. Adv. Bot. Res., 19, 1-100.

Alibert G., Ranjeva R. (1971). Research on the enzymes catalyzing the biosynthesis of phenolic acids in *Quercus pedunculata* I. Formation of the first members of the cinnamic series and benzoic series. *FEBS Lett.* 19,11-14.

Apostol I., Heinstein P.F., Low P.S. (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.*, **90**, 109-116.

Arneson P.A., Durbin R.D. (1967). Hydrolysis of tomatine by Septoria lycopersici; a detoxification mechanism. Phytopathology, 57, 1358-1360.

Arneson P.A., Durbin R.D. (1968). The sensitivity of fungi to  $\alpha$ -tomatine. *Phytopathology*, 58, 536-537

Atkinson M.M., Midland S.L., Sims J.J., Keen N.T. (1996). Syringolide 1 triggers  $Ca^{2+}$  influx, K<sup>+</sup> efflux, and extracellular alkalinisation in soybean cells carrying the disease resistance gene *Rpg*4. *Plant Physiol.*, **112**, 297-302.

Backman K.S., Roberts M., Patterson R. (1995). Allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Fusarium vasinfectum. Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, **152**, 1379-1381.

**Ball** A.M., Ashby A.M., Daniels M.J., Ingram D.S., Johnstone K. (1991). Evidence for the requirement of extracellular protease in pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape. *Physiol. Mol. Plant Pathology*, **38**, 147-161.

Ballio A., Casinovi C.G., Randazzo G., Rossi C. (1970). Characterization of by-products of fusicoccin in culture filtrates of *Fusicoccum amygdali*. *Experientia*, **26**, 349-351.

Barbosa I.P., Kemmelmeier C (1993). Chemical composition of the hyphal wall from Fusarium graminearum. Experimental Mycology, 17, 274-283.

Barrett A.J. (1986). The classes of proteolytic enzymes. In *Plant Proteolytic Enzymes* (Dalling M.J., Ed.), Boca Raton CRC Press, New-York, vol. 1, p. 1-16.

Bartnicki-Garcia S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. Annu. Rev. Microbiol., 22, 87-108.

Basse C.W., Block K., Boller T. (1992). Elicitors and suppressors of the defense response in tomato cells. J. Biol. Chem., 267, 10258-10265.

Basse C.W., Fath A., Boller T. (1993). High-affinity binding of glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. J. Biol. Chem., 268, 14724-14731.

Beck E., Ziegler P. (1989). Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 40, 95-117.

Bellincampi D., Salvi G., Delorenzo G., Cervone F., Marfà V., Eberhard S., Darvill A.G., Albersheim P. (1993). Oligogalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants. *Plant Journal*, 4, 207-213.

Benhamou N., Chamberland H., Pauze F.J. (1990). Implication of pectic components in cells surface interactions between tomato root cells and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant. Physiol.*, **92**, 995-1003.

Benson D.R. (1988). The genus Frankia: actinomycete symbionts of plants. Microbiol. Science, 5, 9-12.

Bent A.F. (1996). Plant disease resistance genes: Function meets structure. Plant Cell, 8, 1757-1771.

Bergmann C.W., Ito Y., Singer D., Albersheim P., Darvill A.G. (1994). Polygalacturonaseinhibiting protein accumulates in *Phaseolus vulgaris* L. in response to wounding, elicitors and fungal infection. *Plant Journal*, 5, 625-634. Binns A.N. (1994). Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45, 173-193.

**Bisgrove** S.R., Simonich M.T., Smith N.M., Sattler A., Innes R.W. (1994). A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for two different pathogen avirulence genes. *Plant Cell*, 6, 927-933.

**Bishop** P.D., Pearce G., Bryant J.E., Ryan C.A. (1984). Isolation and characterization of the proteinase inhibitor-inducing factor from tomato. Identity and activity of poly- and oligogalacturonide fragments. *J. Biol. Chem.*, **259**, 13172-13177.

Bleggi-Torres L.F., de Medeiros B.C., Neto J.Z., Loddo G., Telles F.Q., de Medeiros C.R., Pasquini R. (1996). Disseminated *Fusarium* sp. infection affecting the brain of a child after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **18**, 1013-1015.

Bock K., Pedersen C., Pedersen H. (1984). The carbon-13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 42, 193-225.

Boller T. (1989). Primary signals and second messengers in the reaction of plants to pathogens. In *Second Messengers in Plant Growth and Development* (Boss, W.F. and Morré, D.J., Eds.), Alan R., Press, New York, p. 227-255.

**Bolwell** G.P. (1986). Microsomal arabinosylation of polysaccharide and elicitor-induced carbohydrate-binding glycoprotein in French bean. *Phytochemistry*, **25**, 1807-1813.

**Bolwell** G.P., Dixon R.A (1986). Membrane-bound hydroxylases in elicitor-treated bean cells. Rapid induction of the synthesis of prolyl hydroxylase and a putative cytochrome P-450. *Eur. J.* of *Biochem.*, **159**, 163-169.

Botti M.G., Taylor M.G., Botting N.P. (1995). Studies on the mechanism of myrosinase. Investigation of the effect of glycosyl acceptors on enzyme activity. J. Biol. Chem., 270, 20530-20535.

Bowler C., Van Montagu M., Inzé D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. Ann. Rev. Plant Physiol., 43, 83-116. **Bowyer** P, Clarke B.R., Lunness P., Daniels M.J., Osbourn A.E. (1995). Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science*, **20**, 371-374.

**Bradford** M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principale of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254. **Branca** C., De Lorenzo G., Cervone F. (1988). Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by  $\alpha$ -D-oligogalacturonides in pea stem. *Physiol. Plant.*, 72, 499-504.

**Brecht** J.K., Huber D.J. (1988). Products released from enzymatically active cell wall stimulate ethylene production and ripening in preclimacteric tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) fruit. *Plant Physiol.*, **88**, 1037-1041.

**Breedveld** M.W., Miller K.J. (1994). Cyclic β-glucans of member of the family *Rhizobiaceae*. *Microb Rev.*, 58, 145-161.

Briggs S.P., Johan G.S. (1994). Genetic paterns of plant host-parasite interactions. *Trends Genet.*,10, 12-16.

Briggtman A.O., Zhu X.Z., Morré D.J. (1991). Activation of plasma membrane NADH oxidase activity by products of phospholipase A. *Plant Physiol.*, 96, 1314-1320.

Broekaert W.F., Peumans W.J. (1988). Pectic polysaccharides elicit chitinase accumulation in tobacco. *Plant Physiol.*, 74, 740-744.

**Brosch** G., Ransom R., Lechner T., Walton J.D., Loidl P. (1995). Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*. *Plant Cell*, 7, 1941-1950.

Bruce R.J., West C.A. (1989). Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxydase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol.*, **91**, 889-897.

Bruckner B., Blechschmidt D., Schubert, B. (1989). Fusarium moniliforme Sheld, a fungus producing a broad spectrum of bioactive metabolites. Zentralbl. Mikrobiol., 144, 3-12.

Bruneteau M., Perret J., Rouhier P., Michel G. (1992). Structure of beta-<u>D</u>-glucans from *Fusarium oxysporum. Carbohydr Res.*, 236:345-348.

**Buonocore** V., Petrucci T., Silano V. (1977). Wheat protein inhibitors of  $\alpha$ -amylase. *Phytochemistry*, **16**, 811-820.

**Cabib** E., Bowers B., Sburlati A., Silverman S.J., (1988). Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiological Sciences*, **5**, pp58-75.

**Campbell** M.M., Labavitch J.M., Ellis B.E. (1991). Induction and regulation of ethylene biosynthesis by pectic oligomers in cultured pea cells. *Plant Physiol.*, **97**, 699-705.

**Carlson** R., Sanjuan J., Bhat U.R., Glushka J., Spaink H.P., Wijfjes A.H., van Brussell A.A., Stokkermans T.J., Peters K.N., Stacey G. (1993). The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by type I and II strains of *Bradyrhizobium japonicum. J. Biol. Chem.*, **268**, 18372-18381.

Casercuberta J.M., Raventos D., Puigdomenech P., San Segundo B. (1992). Expression of the gene encoding the PR-like protein PRms in germinating maize embryos. *Mol. Gen. Genet.*, 234, 97-104.

Chen Z., Silva H., Klessig D.F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, **262**, 1883-1886.

**Cheong** J.J., Birberg W., Fugedi P., Pilotti A., Garegg P.J., Hong N., Ogawa T., Hahn M.G. (1991). Structure-activity relationships of oligo- $\beta$ -glucoside elicitor of phytoalexin accumulation in soybean. *Plant Cell*, **3**, 127-136.

**Chevolot** L., Dubois-Dauphin R., Yvin J.C., Liénart Y (1997). High performance liquid chromatography and photodiode array detection of phenylpropanoids and benzoates in *Rubus* protoplasts elicited by kinetin, *Phytochemical analysis*, **8**, 22-26.

Chew F.S. (1988). Biological effects of glucosinolates. In Biologically active natural products-Potential use in agriculture. Proceedings of the ACS Symposium 380, (Cutler H.G., Ed) American Chemical Society, Washington DC, p 155-181. Christakopoulos P., Nerinck W., Krkos D., Macris B., Claeyssens M. (1996). Purification and purification and characterization of two low molecules mass alkaline xylanases from *Fusarium* oxysporum F3. J. Biotechnol., 51, 181-189.

Chu O. (1996). Elevated plasma glycosaminoglycans in chickens with tibial dyschondroplasia induced by a *Fusarium oxysporum* isolate. *Avian Dis*eases, **40**, 715-719.

Cluness M.J., Turner P.D., Clements E., Brown D.T., O'Reilly C. (1993). Purification and properties of cyanide hydratase from *Fusarium lateritium* and analysis of the corresponding *chy1* gene. J. Gen. Microbiol., 139, 1807-1815.

Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Neilsen K.K., Rasmussen U., Vad K. (1993). Plant Chitinases. *Plant Journal*, **3**, 31-40.

**Cosio** E.G., Frey T., Ebel J. (1992). Identification of a high-affinity binding protein for a hepta-βglucoside phytoalexin elicitor in soybean. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 1115-1123.

Côté F., Hahn M.G. (1994). Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Mol. Biol.*, 26, 1379-1411.

Creelman R.A., Mullet J.E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 92, 4114-4119.

Creelman R.A., Tierney M.L., Mullet J.E. (1992) Jasmonic acid and methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4938-4941.

Culver J.N., Dawson W.O. (1989). Tobacco mosaic virus coat protein: an elicitor of the hypersensitive reaction but not required for the development of mosaic symptoms in *Nicotiana* sylvestris. Virology, 173, 755-758.

Dangl J.L. (1994). The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 192, 99-118. **Dangl** J.L, Dietrich R. and Richberg M.H. (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell*, **8**, 1793-1807.

Darvill A.G., Albersheim P. (1984). Phytoalexins and their elicitors. Ann. Rev. Plant Physiol., 35, 243-275.

**Darvill** A.G., Augur C., Bergmann C., Carlson R.W., Cheong J.J., Eberhard S., Hahn M.G., Lo V.M., Marfa V., Meyer B., Mohnen D., O'Neill M., Spiro M.D., Halbeek H.V., York W.S., Albersheim P. (1992). Oligosaccharins- oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiology*, **3**, 181-198.

Davies K.R., Hahlbrock K. (1987). Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiol.*, **85**, 1286-1290.

**Davis** K.R., Hahlbrock K. (1987). Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiol.*, **85**, 1286-1290.

**Davis** R.H. (1991). Glucosinolates. *In Toxic substances in crops plants*, (D'Mello J.P., Duffus C.M. and Duffus J.H., Ed), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p. 202-225.

**De Vries** S.C., Booij H., Janssens R., Vogels R., Saris L., Loschiano F., Terzi M., Van Kammen A. (1988). Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Gen. Develp.*, **2**, 462-476.

Dénarié J., Debellé F., Promé JC. (1996). *Rhizobium* lipochitooligosaccharides nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 503-535.

Dewey R.E., Tomothy D.H., Levings III C.S. (1987). A mitochondrial proteins associated with cytoplasmic male sterility in the T-cytoplasm of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5374-5378.

De Wit P.J.G.M., Kodde E. (1981). Further characterization and cultivar specificity of glycoprotein elicitors from culture filtrates and cell walls of *Cladosporum fluvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiol. Plant Pathol.*, **18**, 297-314.

**Diouf** D., Gherbi H., Prin Y., Franche C., Duhoux E. (1995). Hairy root nodulation of *Casuarina* glauca: a system for the study of symbiotic gene expression in an actinorrhizal tree. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **8**, 532-537.

**Dixon** M.S., Jones D.A., Keddie J.S., Thomas C.M., Harrison K., Jones J.D. (1996). The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell*, **84**, 451-459.

Dixon R.A., Harrison M.J., Lamb C.J. (1994). Early events in the activation of plant defence responses. Ann. Rev. Phytopathol., 32, 479-501.

Dixon R.A. (1986). The phytoalexin reponse: elicitation, signalling and control of the host gene expression. *Biol. Rev.*, **61**, 239-291.

Dixon R.A., Paiva N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.

Doares S.H., Syrovets T., Weiler E.W., Ryan C.A. (1995). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 92, 4085-4098.

**Doke** N. (1983). Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race *Phytophthora infestans* and hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.*, **23**, 345-357.

Doring O., Luthje S. (1996). Molecular components and biochemistry of electron transport in plant plasma membranes. *Mol. Membr. Biol.*, **13**: 127-142.

Drøbak B.K. (1992). The plant phosphoinositide system. Biochem. J., 288, 697-712.

Dwyner S.C., Legendre L., Low P.S., Leto T.L. (1996). Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunologically related proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2: 231-237.

Ebel J. (1986). Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of induction process. Annu. Rev. Phytopathol., 24, 235-264.

Ebel J., Bhagwat A.A., Cosio E.G., Feger M., Kissel U., Mithîfer A., Waldmüller T. (1995). Elicitor-binding proteins and signal transduction in the activation of a phytoalexin defense response. *Can. J. Bot.*, 73, S506-S510.

Ebel J., Cosio E.G. (1994). Elicitors of plant defense responses. Intern. Rev. of Cytology, 148, 1-36.

Ecker J.R. (1995). The ethylene signal transduction pathway in plants. Science, 268, 667-675.

El-Basyouni S.Z., Chen D., Ibrahim R.K., Neish A.C., Towers G.H.N. (1964). The biosynthesis of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Phytochemistry* **3**, 485-492.

Eliason L., Bertell G., Bolander E. (1989). Inhibitory action of auxin on root elongation not mediated by ethylene. *Plant Physiol.*, **91**, 310-314.

Enyedi A.J., Yalpani N., Silverman P., Raskin I. (1992). Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell*, **70**, 879-886.

Fabri S., Caucas V., Abril A. (1996). Infectivity and effectiveness of different strains of *Frankia* spp. on *Atriplex cordobensis* plants. *Rev. Argent. Microbiol.*, 28, 31-38.

Fallick G., Romano J. (1995). Enhanced photodiode array detection. HPLC applications in environmental research, development, and quality assurance using a spectral contrasting technique. *International Laboratory*, **12**, 1-5.

Farmer E.E., Ryan C.A. (1990). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7713-7716.

Felix G., Regenass M., Boller T. (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: Induction of extracellular alkalinisation, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant Journal*, 4, 307-316.

Fenwick G.R., Price K.R., Tsukamota C., Okubo K. (1992). Saponins. In Toxic substances in crops plants. (D'Mello J.P., Duffus C.M. and Duffus J.H., Ed), Riyal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p. 285-327.

Filippini F., Terzi M., Branca C., Bellincampi D., Salvi G., Cervone F. (1992). Oligogalacturonides interact with auxin-binding sites and affect auxin regulated development of cells and tissue explants. *Plant Journal*, 2, 510-517.

Flor H.H. (1971). The current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopatholoy, 9, 275-296.

Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. (1957). J. Biol. Chem., 226, 497.

Fry W.E., Millar R.H. (1972). Cyanide degradation by an enzyme from *Stemphylium loti. Arch.* Biochem Biophys., 151, 468-474

Fry W.E., Myers D.F. (1981). Hydrogen cyanide metabolism by fungal pathogen of cyanogenic plants. *In Cyanide in biology*, (Vennesland B., Knowles C.J., Conn E.E., Westley J. and Wissing F., Ed), Academic Press, London, p. 321-334.

Fry S.C., York S.W., Albersheim P., Darvill A. G., Hayashi T., Joseleau J.P., Kato Y., Lorences E.P., Maclachlan G.A., McNeil M., Mort A.J., Grant Reid J.S., Seitz H.U., Selvendran R.R., Vragen A.G.J., White A.R. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol. Plant.*, **89**, 1-3.

Funk C., Gügler K., Brodelius P. (1987). Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). *Phytochemistry*, **26**, 401-405.

Funk C., Brodelius P. (1992). Influence of the growth regulators and an elicitor on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry*, **29**, 845-848.

Garcia-Olmedo F., Salcedo G., Sanchez-Monge R., Gomez L., Royo J., Carbonero P. (1987). Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and  $\alpha$ -amylases. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, 4, 275-334.

Genghof D.S., Brewer C.F., Hehre E.J. (1978). Preparation and use of  $\alpha$ -maltosyl fluoride as a substrate by beta amylase. *Carbohydr. Res.*, 61, 291-299.

**Geoffroy** P., Legrand M., Fritig B. (1990). Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **3**, 327-333.

Gilchrist D.G., Wang H., Bostock R.M. (1995). Sphingosine-related mycotoxins in plant and animal diseases. Can. J. Bot., 73, S459-S467.

Gilroy S., Jones R.L. (1994). Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.*, **104**, 1185-1192.

Giraudat J. (1995). Abscisic acid signaling. Curr. Opin. Cell Biol., 7, 232-238.

Graham J.S., Hall G., Pearce G., Ryan C.A. (1986). Regulation of synthesis of proteinase inhibitors I and II mRNAs in leaves wound tomato plants. *Planta*, **169**, 399-405.

Grayer R.J., Harborne J.B. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*, **37**, 19-42.

Groom Q.J., Torres M.A., Fordham-Skelton A.P., Hammond-Kosack K.E., Robinson N.J., Jones J.D. (1996) *.rbohA*, a rice homologue of the mammalian *gp 91phox* respiratory burst oxidase gene. *Plant Journal*, **10**, 515-522.

Gundlach H., Muller M.J., Kutchan T.M., Zenk M.H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2389-2393.

**Gvozdeva** E.L., Mitskevich L.G., Mosolov V.V. (1994). Characterization of binding sites of bifonctional protein inhibiting proteinases and  $\alpha$ -amylase. *Biochemistry (Moscow)*, **59**, 1055-1057.

Hadwiger L.A., Ogawa T., Kuyama H. (1994). Chitosan polymer size effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthetized oligomers. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7, 531-553.

Hagendoorn M.J.M., Poortinga A.M., Sang H.W., van der Plas L.H., van Walraven H.S. (1991). Effect of elicitor on the plasma membrane of *Petunia hybrida* cell suspensions. *Plant Physiol.*, 96, 1261-1267.

Hahlbrock K., Scheel D., Logemann E., Nürnberger T., Parniske M., Reinold S., Sacks W.R., Schemelzer E. (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4150-4157.

Hahn M.G., Darvill A.G., Albersheim P. (1981). Host-pathogene interaction. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexine accumulation in soybeans. *Plant Physiol.*, 68, 1161-1169

Halloin J.M., Hagedorn D.J. (1975). Effects of tentoxin on enzymic activities in cucumber and cabbage cotyledons. *Mycopathologia*, 55, 159-162.

Hamm H.E., Gilchrist A. (1996). Heterotrimeric G proteins. Curr. Opin. Cell. Biol., 8, 189-196.

Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. (1988). The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241, 42-52.

Hargreaves J.A., Mansfield J.W., Coxon D.T. (1976). Conversion of wyerone to wyerol by *Botritis cinerea* and *B. fabae in vitro*. *Phytochemistry*, **15**, 651-653.

Harmmond-Kosack K.E., Jones J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defence responses. *The Plant Cell*, 8, 1773-1791.

Harrison M.J. (1996). A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant Journal.*, 9, 491-503.

Harthill W.F.T., Sutton P.G. (1980). Inhibition of germination Mycosphaerella brassicae ascospores on young cabbage and cauliflower leaves. Ann. Appl. Biol., 96, 153-161.

Heller R. (1953). Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég., 14, 1-233.

Hershko A., Ciechanover A., (1982). Mechanisms of intracellular protein breakdown. Annu. Rev. Biochem., 51, 335-364.

Hildebrand D.F. (1989). Lipoxygenases. Physiologia Plantarum, 76, 249-253.

Hiroshi S., Ohashi Y., (1995). Involvement of small GTP-binding proteins in defense signal transduction pathways of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4138-4144.

Horn A., Heinstein P.F., Low P.S. (1989). Receptor-mediated endocytosis in plant cells. The plant cell, 1, 1003-1009.

Howard J., Shannon L., Oki L., Murashige T. (1977). Soybean agglutinin. A mitogen for soybean callus cells. *Exp. Cell Res.*, **107**, 448-450.

Hrazdina G., Jensen R.A. (1992). Spatial organisation of enzymes in plant metabolic pathways. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 43, 241-267.

Huang M.T., Smart R.C., Wong C.Q., Conney A.H. (1988). Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.*, **48**, 5941-5946.

Huber D.J. (1983). Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. J. Am. Soc. Hort. Sci., 108, 405-409.

Huet J.C., Nespoulous C., Pernollet J.C. (1992). Structures of elicitin isoforms secreted by *Phytophthora drechsleri*. *Phytochemistry*, **31**, 1471-1476.

Hughes M.A. (1991). The cyanogenic polymorphism in *Trifolium repens* L. (white clover). *Heredity*, 66, 105-115.

Hunt M.D., Neuenschwander U.H., Delaney T.P., Weymann K.B., Friedrich L.B., Lawton K.A., Steiner H.Y., Ryals J.A. (1996). Recent advances in systemic acquired resistance research. *Gene*, 179, 89-95.

Hustache G., Mollard A., Barnoud F. (1975). Culture illimitée d'une souche anergiée de Rosa glauca par la technique des suspensions cellulaires. C.R. Acad. Sci. Paris, 281, 1381-1384.

Iwahara S., Maeyama T., Mishima T., Jikibara T., Takegawa K., Iwamoto H. (1992). Studies on the uronic acid-containing glycoproteins of *Fusarium* sp. M7-1: IV. Isolation and identification of four novel oligosaccharide units derived from the acidic polysaccharide chain. J. Biochem., 112, 355-359.

Iwahara S., Suemori N., Ramli N., Takegawa K. (1995). Isolation and identification of novel acidic oligosaccharides derived from glycoproteins of *Fusarium* sp. M7-1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59: 1082-1085.

Iwahara S., Suemori N., Takegawa K. (1996). Isolation and identification of a choline-linked mannobiose in the glycoproteins of *Fusarium* sp. M7-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 349-350.

Jackson A.O., CrispinB.T., (1996). Plant-Microbe interactions: Life and death at the interface. The Plant Cell, 8, 1651-1668.

Jacobsen J.V., Beach L.R. (1985). Control of transcription of  $\alpha$ -amylase and rDNA genes in barley aleurone protoplasts by gibberellin and abscisic acid. *Nature*, **316**, 275-277.

Jaeck E., Dumas B., Geoffroy P., Favet N., Inze D., Van Montagu M., Fritig B., Legrand M. (1992). Regulation of enzymes involved in lignin biosynthesis: induction of *O*-methyltransferase mRNAs during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **5**, 294-300.

Jikibara T., Takegawa K., Iwahara S. (1992 a). Studies on the uronic acid-containing glycoproteins of *Fusarium* sp. M7-1: I. Isolation and some properties of the glycoproteins. *J. Biochem.*, 111, 225-229.

Jikibara T., Tada K., Takegawa K., Iwahara S. (1992 b) Studies on the uronic acid-containing glycoproteins of *Fusarium* sp. M7-1: II. The primary structures of the low molecular weight carbohydrate chains of the glycoproteins. *J. Biochem.*, 111, 230-235.

Jikibara T., Takegawa K., Iwahara S. (1992 c). Studies on the uronic acid-containing glycoproteins of *Fusarium* sp. M7-1: III. The primary structures of the acidic polysaccharides of the glycoproteins. *J. Biochem.*, **112**, 236-243.

Johal G.S., Rahe J.E. (1990). Role of phytoalexins in the suppression of resistance of *Phaseolus* vulgaris to *Cochliobolus carbonum* by glyphosphate. *Can. J. Plant Pathol.*, **12**, 225-235.

Johal G.S., Briggs S.P. (1992). Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. *Science*, 258, 985-987.

Jones O.W.T. (1994). The regulation of superoxide production by the NADPH oxidase of neutrophils and other mammalian cells. *Bioassays*, 16, 919-923.

Jones D.H. (1984). Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry*, **23**, 1349-1359.

Jordan E.C.M., Devay J. (1990). Lysosome disruption associated with hypersensitive reaction in the potato *Phytophthora infestans* host-parasite interaction. *Physiol. Mol. Plant, Pathol*, 36, 221-236.

Kamerling J.P., Vliegenthart JF.G. (1989). In clinical biochemistry: principles, methods, applications (Lawson A.M. Ed.), Walter de Gruyter and Co., Berlin, vol. 1, p.175-263.

Kanai R., Edwards G.E. (1973). Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplast from C3, C4 and *Crassulacean* acid metabolism plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two phase system. *Plant Physiol.*, **52**, 484- 490.

Kato T., Shiraishi T., Toyoda K., Saitoh K., Satoh Y., Tahara M., Yamada T., Oku H. (1993). Inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes by fungal suppressors from *Mycosphaerella pinodes* and their peptide moieties. *Plant Cell Physiol.*, **34**, 439-445.

Kauffmann S., Legrand M., Geoffroy P., Fritig B. (1987). Biological function of pathogenesisrelated proteins: four proteins of tobacco have  $\beta$ -1,3-glucanase activity. *EMBO J.*, **6**, 3209-3212.

Kauss H., Jeblick W., Domard A., (1989). The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta*, **178**, 385-392.

Keefe D., Hinz U., Meins F. (1990). The effect of ethylene on the cell-type-specific and intracellular localization of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Planta*, **182**, 43-51.

Khan N.U., Vaidyanathan C.S. (1986). A new simple spectrophotometric assay of phenylalanine ammonia-lyase, *Cur. Sci.*, 55, 391-393.

Kijima M., Yoshida M., Sugita K., Horinouchi S., Beppu T. (1993). Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* **268**, 22429-22435.

Kim S.R., Kim Y., An G. (1993). Identification of methyl jasmonate and salicylic acid response elements from the nopaline synthase (nos) promoter. *Plant Physiol.* ;103, 97-103.

Klement N.T. (1992) Hypersensitivity. In *Phytopathogenic procariotes*, (Mount M.S., Lacy G.H., Ed), New york Academic Press, New york, p. 149-177.

Knogge W., (1996). Fungal infection of plants. The Plant Cell, 8, 1711-1722.

Koga D., Hirata T., Sueshige N., Tanaka S., Ide A. (1992). Induction patterns of chitinases in yam callus by inoculation with autoclaved *Fusarium oxysporum*, ethylene and chitine and chitosan oligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 280-285.

Kogel G., Beissamann B., Reisener H.J., Kogel K. (1988). A single glycoprotein from *Puccinia* graminis f. sp. tritici cell walls elicits the hypersensitive lignification response in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **33**, 173-185.

Kogel G., Beissamann B., Reisener H.J., Kogel K. (1991). Specific binding of a hypersensitive lignification elicitor from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* to the plasma membranes from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta*, **183**, 164-169.

Kondo H., Abe K., Nishimura I., Watanabe H., Emori Y., Arai S. (1990). Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. Molecular cloning, expression, and biochemical studies on oryzacystatin-II. J. Biol. Chem., 265, 15832-1587.

Kuc J.A., Rush J.S. (1985). Phytoalexins. Arch. Biochem. Biophy., 236, 455-472.

Kurantz M.J., Zacharius R.M. (1981). Hypersensitive response in potato tuber: elicitation by combination of non-eliciting components from *Phytophthora infestans*. *Physiological Plant Pathology*, **18**, 67-77.

Kurosaki F., Tsurusawa Y., Nishi A. (1987). The elicitation of phytoalexins by Ca<sup>2+</sup> and cAMP in carrot cells. *Phytochemistry.*, **26**, 1919-1923.

Lairini K., Perez-Espinosa A., Pineda M., Ruiz-Rubio M. (1996). Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. Appl Environ Microbiol, 62, 1604-1609.

Laskowski M., Kato I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. Ann. Rev. Biochem., 49, 593-626. Lawton M.A., Lamb C.J. (1987). Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. Mol. Cell. Biol., 7, 335-341.

Lee H-I., Leon J., Raskin I. (1995). Biosynthesis and metabolism of salicylic acid, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4076-4079.

Legendre L., Heinstein P.F., Low P.S. (1992). Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. J. Biol. Chem. 267: 20140-20147.

Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 973-983.

Leon J., Laxton M.A., Raskin I. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.*, **108**, 1673-1678.

Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Promé J.C., Denarie J. (1990). Symbiotic hostspecific of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344, 781-784.

Lesney M.S. (1989). Growth responses and lignin production in cell suspensions of *Pinus Elliotti* 'elicited' by chitin, chitosan or mycelium of *Cronartium quercum* f. sp. *fusiforme*. *Plant Cell Tiss*. Organ. Cult., 19, 23-31.

Levings I.I.I., Rhoads D.M., Siedow J.N. (1995). Molecular interaction of Bipolaris maydis Ttoxin and maize. Can. J. Bot., 73, S483-S489. Lhomme O., Bruneteau M., Costello C.E., Mas P., Molot P.M., Dell A., Tiller P.R., Michel G. (1990). Structural investigations and biological activity of inositol sphingophospholipids from *Phytophthora capsici. Eur. J. Biochem.*, 191, 203-209.

Li D., Chang K.R., Smith D.A., Schardl C.L. (1995). The *Fusarium solani* encoding kievitone hydratase a secreted enzyme that catalyses detoxification of a bean phytoalexin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **8**, 388-397.

Li N., Parsons B.L., Liu D.R., Mattoo A.K. (1992). Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. *Plant Mol. Biol.*, **18**, 477-487.

Liang C., Brookhat G., Feng G.H., Reeck G.R., Kramer K.J. (1991). Inhibition of digestive proteinases of stored grain coleoptora by oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor from rice seed. *FEBS Lett.*, **278**, 139-142.

Lieberei R., Biehl B., Giesemann A., Junqueira N.T.V. (1989). Cyanogenesis inhibits active defense reactions in plants. *Plant Physiol*, **90**, 33-36.

Liénart Y., Gautier C., Domard A. (1993). Chitosan elicited laminarinase activity in *Rubus* cells or protoplasts. *Phytochemistry*, **34**, 621-624.

Liénart Y., Dubois-Dauphin R., Gautier C., Khitri M., Driguez H. (1992). Membrane binding sites for the human blood group H-type 2 determinant, an inducer of laminarinase activity in protoplasts of *Rubus fruticosus* L. *Planta*, **188**, 506-512.

Linthorst H.J.M., Brederode F.T., Van der Does, C., Bol J.F. (1993). Tobacco proteinase inhibitor I genes are locally, but not systemically induced by stress. *Plant Mol. Biol.*, **21**, 985-992.

Lois R. (1994). Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in Arabidopsis thaliana L. I. Mechanisms of UV-resistance in Arabidopsis. Planta, 194, 498-503.

Long S.R. (1996). Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. Plant Cell, 8, 1885-1898.

Low P.S., Merida L.R. (1995). The oxidative burst in plant defence-function and signal transduction. *Physiol Plant*, 96, 533-542.

Maizel J.V., Burkhardt H.J., Mitchell H.K. (1964). Avenacin, an antimicrobial substance isolated from *Avena sativa*. I. Isolation and antimicrobial activity. *Biochemistry*, **3**, 424-431.

Malamy J., Sanchez-Casas P., Henning A., Guo A., Klessing D.F. (1996). Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9, 474-482.

Mangold H.K., Lamp H., Schlenk H. (1955). J. Am. Chem. Soc., 77, 6070-6075.

Marfà V., Gollin D.J., Eberhard S., Mohnen D., Darvill A.G., Albersheim P. (1991). Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. *Plant Journal*, 1, 217-225.

Margossian L.J., Federman A.D., Giovannoni J.J., Fischer R.L. (1988). Ethylene-regulated expression of tomato fruit ripening gene encoding a proteinase inhibitor I with a glutamic residue at reactive site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8012-8016.

Marra M., Fullone M.R., Fogliano V., Pen J., Mattei M., Masi S., Aducci P. (1994). The 30kilodalton protein present in purified fusicoccin receptor preparations is a 14-3-3-like protein. *Plant Physiol.*, **106**, 1497-1501.

Mathieu Y., Jouanneau J.P., Thomine S., Lapous D., Guern J. (1994). Cytosolic protons as secondary messengers in elicitor-induced defence responses. *Biochem. Soc. Symp.*, **60**, 113-130.

Mathieu Y., Kurkdijan A., Xia H., Guern J., Koller A., Spiro M., O'Neill M., Albersheim P., Darvill A.G. (1991). Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Journal*, 1, 333-343.

McDougall G.J., Fry S.C. (1989). Structure-activity relationships for xyloglucan oligosaccharides with antiauxin activity. *Plant Physiol.*, 89, 883-887.

McDougall G.J., Fry S.C. (1990). Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase. Evidence for a role of cellulase in cell expansion. *Plant Physiol.*, 93, 1042-1048.

Mehdy M.C. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.*, 105, 467-472.

Melcher G.P., McGough D.A., Fothergill A.W., Norris C., Rinaldi M.G. (1993). Disseminated hyalohyphomycosis caused by a novel human pathogen, *Fusarium napiforme*. J. Clin. Microbiol., 31, 1461-1467.

Melotto E., Greve L.C., Labavitch J.M. (1994). Cell wall metabolism in ripening fruit. VII. Biologically active pectin oligomers in ripening tomato (*Lycopersium esculentum* M.) fruits. *Plant Physiol.*, 106, 575-581.

Mergaert P., D'Haeze W., Geelen D., Promé D., Van Montagu M., Geremia RA., Promé JC., Holsters M. (1995). Biosynthesis of *Azorhizobium caulinodans* Nod Factors. Study of the activity of the Nod ABCS proteins by expression of the genes in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 207, 29217-29223.

Messiaen J., Read N.D., Van Custem P., Trewavas A.J. (1993). Cell wall oligogalacturonides increase cytosolic free calcium in carrot protoplasts. *J.Cell Sci.*, **104**, 365-371.

Meyer K., Cusumano J.C., Somerville C., Chapple C.C. (1996). Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 6869-6874.

Milford G.F.J., Fieldsend J.K., Porter A.J.R., Rawlinson C.J., Evans E.J., Bilsborrow P. (1989). Changes in glucosinolate concentrations during the vegetative growth of single-and double-low cultivars of winter oilseed rape. *In Aspects of applied biology*, Vol 23, *Production and protection of oilseed rape and other Brassice crops*, (M.F.B. Dale, A.M. Dewar, R.J. Froud-Williams, T.J. Hocking, D.G. Jones and B.L. Rea, Ed), Association of Applied Biologists, Warwick, UK, p 83-90.

Mindrinos M., Katagiri F., Yu G.L., Ausubel F.M. (1994). The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell*, 78, 1089-1099.

Mithen R., Lewis B.G., Fenwick G.R., Heaney K. (1986). In vitro activity of glucosinolates and their products against Leptosphaeria maculans. Trans. Br. Mycol. Soc., 87, 433-440.

Mithen R. (1992). Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape. *Euphytica*, 63, 71-83.

Moloshok T., Pearce G., Ryan C.A. (1992). Oligouronide signalling of proteinase inhibitor genes in plants: structure-activity relationships of di- and trigalacturonic acids and their derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.*, 294, 731-734.

Montreuil J. (1972). Les glycoprotides ; procédés de détermination de la composition et de la structure de la fraction glucidique. In *Problèmes Actuels de Biochimie Générale* (Boulanger, P. et Polonowski, J., Eds.), Masson et C<sup>ie</sup>, Paris, p. 175-269.

Morel F., Doussiere J., Vignais P.V. (1991). The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells: physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J. Biochem.*, **201**, 523-546.

Nakanishi M., Takihara H., Minoru Y., Yagawa K. (1991). Extracellular ATP itself elicits superoxide generation in guinea pig peritoneal macrophages, *FEBS Letters*, 282, 91-94.

Natsume M., Kamo Y., Hirayama M., Adachi T. (1994). Isolation and characterization of alginate-derived oligosaccharides with root growth-promoting activities. *Carbohydr. Res.*, 258, 187-197.

Neale A.D. Wahleithner J.A., Lund M., Bonnett H.T., Kelly A., Meeks-Wagner D.R., Peacock W.J., Dennis E.S. (1990), Chitinase, beta-1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacoo explants during flower formation. *Plant Cell*, 7, 676-684.

Nelson P.E., Dignani M.C., Anaissie E.J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 7, 479-504.

Neuenschwander U., Friedrich L., Delaney T., Vernooij B., Kessman H., Ryals J. (1995a). Activation of plant disease resistance. *Aspects Appl. Biol.*, 42, 217-225.

Neuenschwander U., Vernooij B., Friedrich L., Uknes S., Kessman H., Ryals J. (1995b). Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant* Journal, 8, 227-233. Ni W., Fahrendorf T., Ballance G.M., Lamb C.J., Dixon R.A. (1996). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Transcriptional activation of phenylpropanoid pathway genes in elicitorinduced cell suspension cultures, *Plant Mol. Biol.*, **30**, 427-438.

Nurnberger T., Wirtz W., Nennstiel D., Hahlbrock K., Jabs T., Zimmermann S., Scheel D. (1997). Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense. J. Recept. Signal Transduct. Res., 17: 127-136.

Nürnberger T., Nennstiel D., Jabs T., Sacks W.R., Hahlbrock K., Schell D. (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell*, **76**, 449-460.

Olson P.D., Varner J.E. (1993). Hydrogene peroxide and lignification. *Plant Journal*, 4, 887-892. Oren A., Gurevich P. (1993). Characterization of the dominant halophilic archaea in a bacterial bloom in the Dead Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 12, 249-256.

Orr J.D., Sumner L.W., Edwards R., Dixon R.A. (1993). Determination of cinnamic acid and 4coumaric acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.) cell suspension cultures by gas chromatography. *Phytochem. Anal.*, 4, 124-130.

Osbourn A.E. (1996). Saponins and plante defence. Trends Plant Sci., 1, 4-9.

**Parker** J.E., Schulte W., Hahlbrock K., Scheel D. (1991). Anextracellular glycoprotein from *Phytophthora megaspeerma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexins synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **4**, 19-27.

Parry D.W., Pegg G.F. (1985). Surface colonisation, penetration and growth of three Fusarium species in lucerne. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **85**, 495-500.

Parthier B., (1990). Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? J. Plant. Growth. Reg., 9,57-63.

Patier P. (1990). Contribution à l'étude des propriétés phytoactives des engrais foliaires d'algues marines: identification de signaux éliciteurs oligo- et polysaccharidiques .*Thèse de l'université J. Fourier*.

**Pearce** G., Strydom D., Johnson S., Ryan C.A. (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*, **253**, 223-225.

**Pegg** G.F., Woodward S. (1986). Synthesis and metabolism of  $\alpha$ -tomatine in tomato isolines in relation to resistance to *Verticilium albo-atrum*. *Physiol Mol Plant Pathol*, **28**, 187-201.

**Pena-Cortez** H., Sanchez-Serrano J., Rocha-Sosa M., Willmitzer L. (1988). Systemic induction of proteinase-inhibitor-II gene expression in tomato plants by wouding. *Planta*, **174**, 84-89.

**Peng** M., Kuc J. (1992). Peroxydase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology*, **82**, 696-699.

Peters N.K., Frost J.W., Long C.R. (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, 233, 977-980.

Poirot J.L., Laporte J.P., Gueho E., Verny A., Gorin N.C., Najman A., Marteau M., Roux P. (1985). Deep mycosis caused by *Fusarium*. *Presse Med.*, 14, 2300-2301.

Popham P., Pike S., Novacky A. (1995). The effect of harpin from *Erwinia amylovora* on the plasmalemma of suspension-cultured tobacco cells. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 47, 39-50.

Promé J.C., Demont N. (1993). Les oligosaccharides, des messagers chez les plantes. *Biofutur*, 193, 25-28.

Prome J.C. (1996). Signalling events elicited in plants by defined oligosaccharide structures. Curr. Opin. Struct. Biol., 6, 671-678.

Rajnchapel-Messai J. (1988). La stimulation des défenses des plantes. Biofutur, 4, 21-29.

Rasmussen J.B., Hammerschmidt R., Zook M.N. (1991). Systemic induction of salicylic acid in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv syringae. *Plant Physiol.*, 97, 1342-1347.

Reinbothe S., Mollenhauer B., Reinbothe C. (1994). JIPs and RIPs: The regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell*, 6, 1197-1209.

Ricci P., Bonnet P., Huet J.C., Sallantin M., Beauvais-Cante F., Bruneteau M., Billard V., Michel G., Pernollet J.C. (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.*, **183**, 555-563.

Riley R.T., Wang E., Schroeder J.J., Smith E.R., Plattner R.D., Abbas H., Yoo H.S., Merrill A.H. Jr. (1996). Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. *Nat. Toxins*, 4, 3-15.

Roche P., Lerouge P., Ponthus C., Prome J.C. (1991). Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the Rhizobium meliloti-alfalfa symbiosis. J. Biol. Chem., 266, 10933-10940.

Roddick J.G. (1974). The steroidal glycoalkaloid  $\alpha$ -tomatine. *Phytochemistry*, 23, 9-25.

Roddick J.G., Drysdale R.B. (1984). Destabilisation of liposome membranes by the steroidal glycoalkaloid  $\alpha$ -tomatine. *Phytochemistry*, 23, 543-547.

Rodriguez-Galvez E., Mendgen K. (1995). Cells wall synthesis in cotton roots after infection with Fusarium oxysporum. Planta, 197: 535-545.

Rogers K.R., Albert F., Anderson A.J. (1988). Lipid peroxidation is a consequence of elicitor activity. *Plant Physiol.*, 86, 547-553.

Rohe M., Gierlich A., Hermann H., Hahn M., Schmidt B., Rosahl S., Knogge W. (1995). The race-specific elicitor, NIP1, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the Rrs1 resistance genotype. *EMBO J.*, **14**, 4168-4177.

Rouhier P., Kopp M., Begot V., Bruneteau M., Fritig B. (1995). Structural feature of fungal  $\beta$ -Dglucans for the efficient inhibition of the initiation of virus infection on *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, **39**, 57-62.

Rouxel T., Sarniguet A., Kollman A., Bosquet J-F. (1989). Accumulation of a phytoalexin in *Brassica ssp.* In relation to a hypersensitive reaction of *Leptoshaeria maculans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 34, 507-517.

Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y., Hunt M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **8**, 1809-1819.

Ryals I., Lawton K., Delaney T.P., Friedrich L., Kessmann U., Uknes S., Vernooij B., Weymann K. (1995). Signal transduction in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4202-4205.

Ryan C.A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopath.*, 28, 425-449.

Ryan C.A. (1992). The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Mol. Biol.*, **19**, 123-133.

Salmeron J.M., Oldroyd G.E., Rommens C.M., Scofield S.R., Kim H.S., Lavelle D.T., Dahlbeck D., Staskawicz B.J. (1996). Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster. *Cell* 86, 123-133.

Sato T., Theologis A., (1989). Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6621-6625.

Schaller A., Ryan C.A. (1996). Systemin -a polypeptide defense signal in plants. *Bioessays*, 18, 27-33.

Schmitt D., Pakusch A.E., Matern U. (1991). Molecular cloning, induction and taxonomic distribution of caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. J. Biol. Chem., 266, 17416-17423.

Scholtens-Toma I.M.J., de Wit. P.J.G.M. (1988). Purification and primary structure of a necrosisinducing peptide from the apoplastic fluids of tomato infected with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **33**, 59-67.

Schönbeck F., Schlösser E. (1976). Preformed substances as potential protectants. In *Physiological Plant Pathology*. (R. Heitefuss and P.H. Williams, Ed), Springer-Verlag, Berlin, p. 653-678.

Segal A.W., Abo A. (1993). The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biol. Sci.*, 18, 43-47.

Sharma Y.K., Leon J., Raskin I., Davis K.R. (1996). Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5099-5104.

Sharon N. (1993). Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends Biochem. Sci.*, 18, 221-226.

Sharp J.K., McNeil M., Albersheim P. (1984a). The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa (beta-<u>D</u>-glucopyranosyl)-<u>D</u>-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*. J. Biol. Chem., **259**, 11321-11336.

Sharp J.K, Valent B., Albersheim P. (1984b). Purification and partial characterization of a betaglucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. J. Biol. Chem., 259, 11312-11320.

Shi J., Gonzales R.A., Bhattacharyya M.K. (1995). Characterization of a plasma membraneassociated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. *Plant Journal.*, **8**, 381-390. Shibuya N., Kaku H., Kuchitsu K., Maliarik M.J. (1993). Identification of a novel high-affinity binding site for *N*-acetylchitooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspensioncultured rice cells. *FEBS Lett.*, **329**, 75-78.

Shiraishi T., Saitoh K., Kim H.M., Kato T., Tahara M., Oku H., Yamada T., Ichinose Y. (1992). Two suppressors, suppressins A and B, secreted by a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.*, 33, 663-667.

Shoda S., Kawasaki T., Obata K., Kobayashi S. (1993). A facile enzymatic synthesis of cellooligosaccharide derivatives using beta-lactosyl fluoride. *Carbohydr. Res.*, 249, 127-137.
Siedow J.N. (1991). Plant lipoxygenases: structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 145-188.

Sietsma J.B., Wessels J.G.H., (1979). Evidence for covalent linkages between chitin and  $\beta$ -glucans in a fungal wall. *Journal of General Microbiology*, 114, 99-108.

Smith C.A., MacHardy W.E. (1982). The significance of tomatine in the host response of susceptible and resistant tomato isolines infected with two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici. Phytopathology*, 72, 415-419.

Somogyi M. (1952). Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., 195, 19-23.

Song W.Y., Wang G.L., Chen L.L., Kim H.S., Pi L.Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W.X., Zhu L.H. (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21. Science*, **270**, 1804-1806.

Stäb M.R., Ebel J. (1987). Effects of Ca<sup>2+</sup> on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 257, 416-423.

Stafford H.A. (1981). Phenylalanine ammonia-lyase. In *The Biochemistry of Plants* (Stumpf, P.K. and Conn, E.E., Eds.), Academic Press, New York, p. 118-137.

Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Weidemann-Merdinoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand M., Fritig B. (1993). Plant "pathogenesis-related" proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75, 687-706.

Stotz H.U., Contos J.J., Powell A.L., Bennett A.B., Labavitch J.M., (1994). Structure and expression of an inhibitor of fungal polygalacturonases from tomato. *Plant Mol. Biol.*, 25, 607-617.

Summerbell R.C., Richardson S.E., Kane J. (1988). Fusarium proliferatum as an agent of disseminated infection in an immunosuppressed patient. J. Clin. Microbiol., 26, 82-87.

Sutherland M.W. (1991). The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **39**, 79-93.

Sztaricskai F., Harris C.M., Neszmelyi A., Harris T.M. (1980). Structural studies of ristocetin A (Ristomycin A): carbohydrate-aglycone linkages. J. Am. Chem. Soc., 102, 7093-7099.

**Takeda** T., Kanemitsu T., Ishiguro M., Ogihara Y., Matsubara M. (1994). Synthesis of glycopeptides with phytoalexin elicitor activity-I. Syntheses of a triglycosyl <u>L</u>-Ser and a triglycosyl <u>L</u>-Ser-<u>L</u>-proline dipeptide. *Carbohydrate Research*, **256**, 59-69.

**Takeda** T., Kanemitsu T., Ogihara Y. (1996). Synthesis of glycopeptides with phytoalexin elicitor activity-III. Syntheses of hexaglycosyl hexapeptides and a nonaglycosyl hexapeptide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **4**, 1873-1880.

**Tang** X., Frederick R.D., Zhou J., Halterman D.A., Jia Y., Martin G.B. (1996). Initiation of Plant Disease Resistance by Physical Interaction of AvrPto and Pto Kinase. *Science*, **274**, 2060-2063.

Taylor D.L., Bruns T.D. (1997). Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4510-4515.

Tenhaken R., Levine A., Brisson LF., Dixon R.A., Lamb C. (1995). Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4158-4163.

**Tepper** C.S., Anderson A.J. (1986). Two cultivars of bean display a differential response to extracellular components from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **29**, 411-420.

Thain J.F., Doherty H.M., Bowles D.J., Wildon D.C. (1990). Oligosaccharides that induce proteinase inhibitor activity in tomato plants cause depolarisation of tomato leaf cells. *Plant Cell Environ.*, 13, 569-574.

**Tognoli** L. (1986). Colombo R Protein phosphorylation in intact cultured sycamore (Acer pseudoplatanus) cells and its response to fusicoccin. Biochem. J., 235, 45-48.

Tran Thanh Van K., Toubart P., Cousson A., Darvill A.G., Gollin D.J., Chelf P., Albersheim P. (1985). Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. *Nature*, **314**, 615-617.

Traut T.W. (1994). The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. *Eur. J. Biochem.*, 22, 9-19.

Trewavas A., Gilroy S. (1991). Signal transduction in plant cells. Trends Genet., 7, 356-361.

**Ueda** J., Kato J., Yamane H., Takahashi N. (1981). Inhibitory effect of methyl jasmonate and its related compounds on kinetin-induced retardation of oat leaf senescence. *Physiol. Plant.*, **52**, 305-309.

Umemoto N., Kakitani M., Iwamatsu A., Yoshikawa M., Yamaoka N., Ishida I. (1997). The structure and function of a soybean beta-glucan-elicitor-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 94, 1029-34.

Vargas-Rechia C., Reicher F., Sierakowski M.R., Heyraud A., Driguez H., Lienart Y. (1998). Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signaling molecule. *Plant Physiol.*, **116**, 1013-1021.

Vera-Estrella R., Blumwald E., Higgins V.J. (1992). Effect of specific elicitors of *Cladosporium* fulvum in tomato suspension cells: evidence for the involvement of active oxygen species. *Plant Physiol.*, **99**, 1208-1215.

Vera-Estrella R., Barkia B.J., Higgins V.J., Blumwald E. (1994). Plant defense response to fungal pathogens: Activation of host-plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol.*, **104**, 209-215.

Vesonder R.F., Hessltine C.W. (1981). Metabolites of Fusarium. In Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy, (Nelson P.E., Toussoun T.A. and Cook R.J., Ed), The Pensylvania State University Press, University Park, London, p. 350-364.

Walker-Simmons M., Ryan C.A. (1977). Wound induced accumulation of trypsin inhibitor activities in plant leaves. *Plant Physiol.*, **59**, 437-439.

Walker-Simmons M., Hadwiger L., Ryan C.A. (1983). Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 194-199.

Walsh T.J., Hiemenz J.W., Anaissie E. (1996). Recent progress and current problems in treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 10, 365-400.

Walton J.D., Panaccione D.G. (1993). Host-selective toxins: Perspective and progress. Annu. Rev. Phytopathol., 31, 275-303.

Ward E.R., Uknes S.J., Williams S.C., Dincher S.S., Wiederhold D.L., Alexander D.C., Ahl-Goy P., Metraux J6P and Ryals J.A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **3**, 1085-1094.

Ward J.M., Pei Z.M., Schroeder J.I. (1995). Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell*, 7: 833-844.

Wei G., Wang H. (1991). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient uptake and synthesis of volatile oil in Schizonepeta tenuifolia briq. *Chung Kuo Chung Yao Tsa. Chin.*, 16, 139-142.

Wei Z.M., Laby R.J., Zumoff C.H., Bauer D.W., He S.Y., Collmer A., Beer S.V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257, 85-88.

Weiler E.W., Kutchan T.M., Gorba T., Brodschelm W., Niesel U., Bublitz F. (1994). The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Lett.*, **345**, 9-13.

Werck-Reichhart D. (1995). Cytochromes P450 in phenylpropanoid metabolism. Drug Metabol Drug Interact., 12, 221-243.

Whitehead I.M., Threfall D.R. (1992). Production of phytoalexins by plant tissue cultures. J. Biotech., 26, 63-81.

Whitham S., Dinesh-Kumar S.P., Choi D., Hehl R., Corr C., Baker B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, **78**, 1101-1115.

Wilkinson E.M., Butt V.S. (1992). Enzyme changes during lignogenesis in pea shoots induced by illumination. J. Exp. Bot., 43, 1259-1265.

Woggon W.D., Fretz H. (1992). Advances in detailed reaction mechanisms (Inc Ed), JAI Press, p 111-147.

Wubben J.P., Price K.R., Daniels M.J., Osbourn A.E. (1996). Detoxification of oat leaf saponins by Septoria avenae. Phytopathology, 86, 986-992.

Yalpani N., Leon J., Lawton M., Raskin I. (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.*, 103, 315-321.

Yang Y., Gabriel D.W. (1995). Xanthomonas avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mololecular Plant-Microbe Interactions*, **8**, 627-631.

York W.S., Darvill A.G., Albersheim P. (1984). Inhibition of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acidstimulated elongation of pea stem segments by xyloglucan oligosaccharide. *Plant Physiol.*, 75, 295-297.

Yu L.M., (1995). Elicitins from *Phytophtora* and basic resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad.* Sci. USA, 92, 4088-4094.

Zaccomer B. (1995). Des gènes qui donnent l'alarme. Biofutur, 114, 29-31.

Zamir L.O., Devor K.A., Nikolakakis A., Sauriol F. (1990). Biosynthesis of *Fusarium culmorum* trichothecenes. The roles of isotrichodermin and 12,13-epoxytrichothec-9-ene. J. Biol. Chem., 265, 6713-6725.

**Zhou** J., Loh Y., Bressan R.A., Martin G.B. (1995). The tomato gene Pti encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by *Pto* and is involved in the hypersensitive response. *Cell*, **83**, 925-935.

Zucker M. (1965). Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue, *Plant Physiol.*, **40**, 779-784.

