



***ETUDE DES MECANISMES DE DEFENSE VEGETALE ASSOCIES A DES  
ATTAQUES DE PUCERONS ET AUTRES PATHOGENES- EVALUATION DE  
RESISTANCES CROISEES***

**Barthélémy Boni YAROU**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER  
COMPLEMENTAIRE EN PROTECTION DES CULTURES TROPICALES ET SUBTROPICALES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2010-2011**

**PROMOTEUR : PROF. Frédéric FRANCIS**

**Copyright :** *Aux termes de la loi belge du 30 Juin 1994 relative au droit d'auteur, il est formellement interdit de procéder à la reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit sans autorisation de l'auteur et des autorités académiques de Gembloux Agro-Bio Tech et de l'Université Catholique de Louvain. Le contenu du présent document n'engage que l'auteur.*

## **Remerciements**

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tout d'abord mon promoteur, le Professeur Frédéric FRANCIS, qui m'a permis de réaliser ce travail de fin d'étude et pour ses conseils avisés.

Je remercie également,

Le Vice recteur, Professeur Eric HAUBRUGE, responsable de l'Unité d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive,

La coopération universitaire de développement (CUD) pour son aide financière.

Je dis un grand merci à William LUWAERT qui m'a prêté main forte tout au long de ce travail.

Je remercie également, Sophie VANDERMOTEN, Nicolas PONCELET, Jaime VERDUGO, Julien BAUWENS, Annelise CASTAIGNE, Aboukacem LEMTIRI et tous ceux qui de loin ou de près ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je dis un grand merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu tout au long de mes études ainsi que mes amis pour leurs encouragements, en particulier Mathieu SAHGUI, Hervé KOMBIENI, Mario YOA, Laura LOKO et Noémie HOUBART.

Je ne finirai pas cette rubrique sans adresser mes reconnaissances aux responsables de cette formation notamment les Professeurs, Philippe LEPOIVRE et Claude BRAGARD et tout le corps enseignant du Master complémentaire en *Protection des cultures tropicales et subtropicales*.

Enfin je rends grâce à Dieu pour les moments difficiles que j'ai pu traverser tout au long de cette formation.

## Résumé

Au cours des interactions plantes agents pathogènes ou insectes phytophages, les plantes mettent en place des mécanismes de défense. L'objectif de ce travail est d'identifier les mécanismes de défense végétale associés à ces interactions. Les effets d'une résistance croisée ainsi que l'application de certaines molécules élicitrices ont été évalués par observation des paramètres biologiques (taux de croissance relatif, fécondité) de *Myzus persicae* Sulzer et le développement nécrotique de *Botrytis cinerea* Pers. Le protéome des cellules d'*Arabidopsis thaliana* (L) Heynh élicitées avec la salive de *M. persicae* et de la diète a été également investigué par la technique d'électrophorèse bidimensionnelle. A l'issue de ces travaux, on a constaté qu'une infection préalable de *B. cinerea* ou des traitements d'acide, salicylique, jasmonique et la surfactine réduisaient le taux de croissance et la fécondité des pucerons (*M. persicae*). Les effets de *B. cinerea*, l'acide jasmonique et de la surfactine sur ces paramètres biologiques ont été significatifs. Mais les traitements préalables avec, *M. persicae*, acide salicylique et jasmonique non pu empêchés le développement de *B. cinerea*. La mesure du pH des cellules d'*A. thaliana* a montré que la salive de *M. persicae* ainsi que la diète provoquaient une alcalinisation du milieu tout comme la surfactine. L'analyse protéomique des cellules d'*A. thaliana* élicitées avec la salive ainsi que celles élicitées avec la diète a révélé une expression différentielle des protéines. Ainsi l'existence d'un éventuel effet éliciteur dans la salive de *M. persicae* ne peut être confirmée qu'après l'identification des protéines exprimées.

*Mots clés : M. persicae, B. cinerea, interaction, mécanisme de défense, protéome.*

## Abstract

During the interactions between plants and microbial pathogens or phytophagous insects, plants set up defense mechanisms. The objective of this work is to identify the plant defense mechanisms associated with these interactions. The effects of cross-resistance as well as the application of some elicitor molecules were evaluated by observation of biological parameters (fecundity and growth rate) of *Myzus persicae* and *Botrytis cinerea* necrotic development. The proteome of *Arabidopsis thaliana* cells was also investigated by two-dimensional electrophoresis.

At the end of this work, it was found that the growth rate and fecundity of *M. Persicae* were reduced by prior infection of *B. cinerea* or treatment with salicylic acid, jasmonic acid and surfactin. The effects of *B. cinerea*, jasmonic acid and surfactin on the biological parameters were significant. But with a prior treatment with *M. persicae*, salicylic and jasmonic acid have not prevented the development of *B. cinerea*. pH measurement of *A. thaliana* cells, showed that *M. persicae* saliva and the diet caused an alkalization of the medium as well as surfactin. Proteomic analysis of *A. thaliana* cells elicited with saliva as well as those elicited with the diet revealed differential expression of proteins. Thus, the existence of a possible elicitor effect in the saliva of *M. persicae* can only be confirmed after the identification of the expressed proteins.

Keywords: *M. persicae*, *B. cinerea*, defense mechanisms, interactions, proteome.

## Table des matières

Remerciements .....	i
Résumé .....	ii
Abstract .....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des abréviations .....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des tableaux .....	ix
INTRODUCTION.....	1
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.1. Généralités sur les pucerons .....	3
1.1.1. <i>Caractères morphologiques des pucerons</i> .....	3
1.1.2. <i>Biologie et cycle de vie des pucerons</i> .....	4
1.1.3. <i>Dégâts occasionnés par les pucerons</i> .....	5
1.1.3.1. <i>Dégâts directs</i> .....	5
1.1.3.2. <i>Dégâts indirects</i> .....	6
1.1.4. <i>Particularités de Myzus persicae Sulzer</i> .....	6
1.2. Mécanismes de défense végétale.....	7
1.2.1. <i>Mécanismes constitutifs ou passifs</i> .....	7
1.2.2. <i>Mécanismes inductibles ou actifs</i> .....	8
1.2.2.1. <i>Résistances spécifiques induites</i> .....	8
1.2.2.2. <i>Résistances non spécifiques induites</i> .....	9
1.2.3. <i>Particularités des mécanismes de défense des plantes face aux insectes</i> .....	10
1.2.4. <i>Substances de défense des plantes</i> .....	12
1.2.4.1. <i>Lectines végétales</i> .....	12
1.2.4.2. <i>Métabolites secondaires</i> .....	14
1.2.4.3. <i>Inhibiteurs de protéases (IPs)</i> .....	15
1.2.5. <i>Eliciteurs biotiques</i> .....	16
1.2.6. <i>Transduction du signal</i> .....	17
1.2.6.1. <i>Signaux précoces</i> .....	18
1.2.6.2. <i>Signaux secondaires</i> .....	20
1.2.6.3. <i>Interactions entre les voies de signalisation</i> .....	22
1.3. Systèmes d'adaptation des pucerons .....	23
1.3.1. <i>Interactions dynamiques plantes-pucerons</i> .....	23

1.3.2. Systèmes de détoxification des pucerons .....	24
1.3.2.1. Cytochrome P450 monooxygénase (MO).....	25
1.3.2.2. Glutathion S-transférase (GST).....	26
1.3.2.3. Glucosinolate-myrosinase .....	27
<b>II. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>28</b>
2.1. Matériel biologique .....	28
2.2. Méthodes expérimentales .....	29
2.2.1. Etude croisée <i>B. cinerea</i> et <i>M. persicae</i> sur <i>A. thaliana</i> .....	29
2.2.1.1. Infection de <i>B. cinerea</i> suivie d'une infestation de <i>M. persicae</i> .....	29
2.2.1.2. Infestation de <i>M. persicae</i> suivie d'une infection de <i>B. cinerea</i> .....	30
2.2.2. Etude croisée <i>B. cinerea</i> et <i>M. persicae</i> sur <i>S. tuberosum</i> .....	30
2.2.2.1. Infection de <i>B. cinerea</i> suivie d'une infestation de <i>M. persicae</i> .....	30
2.2.2.2. Infestation de <i>M. persicae</i> suivie d'une infection de <i>B. cinerea</i> .....	30
2.2.3. Effet de l'acide salicylique (SA) et jasmonique (JA) sur les paramètres biologiques de <i>M. persicae</i> et le développement de <i>B. cinerea</i> .....	31
2.2.3.1. Traitement des plants d' <i>A. thaliana</i> et de <i>S. tuberosum</i> .....	31
2.2.3.1.1. Effet de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique sur <i>M. persicae</i> .....	31
2.2.3.1.2. Effet de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique sur <i>B. cinerea</i> .....	31
2.2.4. Mise en évidence de l'effet inducteur de mécanismes de défense de la surfactine sur <i>A. thaliana</i> contre <i>M. persicae</i> .....	32
2.2.5. Evolution du pH extracellulaire : effet de la salive de <i>M. persicae</i> sur une suspension cellulaire d' <i>A. thaliana</i> .....	33
2.2.5.1. Suspensions cellulaires d' <i>A. thaliana</i> .....	33
2.2.5.2. Collecte de la salive de <i>M. persicae</i> .....	33
2.2.5.3. Mesure du pH extracellulaire et des diètes artificielles .....	33
2.2.6. Approche protéomique .....	34
2.2.6.1. Extraction des protéines au phénol .....	35
2.2.6.2. Quantification et marquages des protéines aux CyDyes <i>TM</i> .....	35
2.2.6.3. Electrophorèse bidimensionnelle (2D-E).....	36
2.2.6.3.1. Préparation des échantillons.....	36
2.2.6.3.2. Séparation des protéines par focalisation isoélectrique .....	36
2.2.6.4.3. Seconde dimension .....	37
2.2.6.4. Révélation des spots protéiques.....	39
2.2.7. Analyses statistiques.....	39
<b>III. RESULTATS .....</b>	<b>41</b>
3.1. Etude croisée <i>B. cinerea</i> et <i>M. persicae</i> sur <i>A. thaliana</i> .....	41

3.1.1. Effet d'une infection de <i>B. cinerea</i> sur les paramètres biologiques de <i>M. persicae</i> .....	41
3.1.2. Effet d'une infestation de <i>M. persicae</i> sur le développement de <i>B. cinerea</i> .....	42
3.1.3 Effet de l'acide salicylique sur les paramètres biologiques de <i>M. persicae</i> .....	43
3.1.4. Effet de l'acide salicylique sur développement de <i>B. cinerea</i> .....	44
3.1.5 Effet de l'acide jasmonique sur les paramètres biologiques de <i>M. persicae</i> .....	45
3.1.6. Effet de l'acide jasmonique sur le développement de <i>B. cinerea</i> .....	47
3.1.7. Effet de la surfactine sur les paramètres biologiques de <i>M. persicae</i> .....	47
3.2. Etude des paramètres biologiques de <i>M. persicae</i> et du développement de <i>B. cinerea</i> sur <i>S. tuberosum</i> .....	49
3.2.1. Etude croisée <i>B. cinerea</i> et <i>M. persicae</i> .....	49
3.2.2. Effet de l'acide salicylique sur les paramètres biologiques de <i>M. persicae</i> .....	49
3.2.3. Effet de traitement avec d'acide jasmonique sur <i>M. persicae</i> .....	50
3.3. Analyse comparée des différents traitements .....	52
3.3.1. Effet comparé des différents traitements sur la fécondité de <i>M. persicae</i> .....	52
3.3.2. Comparaison du pourcentage d'infection de <i>B. cinerea</i> sur <i>A. thaliana</i> .....	53
3.4. Effet de la salive de <i>M. persicae</i> sur le pH extracellulaire d' <i>A. thaliana</i> .....	54
3.5. Approche protéomique: analyse des protéomes des cellules d' <i>A. thaliana</i> .....	56
3.5.1. Quantification des protéines.....	56
3.5.2. Analyse et révélation des spots protéiques .....	56
IV. DISCUSSION .....	58
4.1. Etude croisées <i>B. cinerea</i> et <i>M. persicae</i> .....	58
4.2. Effet de l'acide salicylique et jasmonique sur <i>M. persicae</i> et de <i>B. cinerea</i> .....	59
4.3. Effet de la surfactine sur les paramètres biologiques de <i>M. persicae</i> .....	60
4.4. Effet de la salive de <i>M. persicae</i> sur les cellules d' <i>A. thaliana</i> .....	61
4.5. Expression protéique différentielle chez les cellules d' <i>A. thaliana</i> .....	62
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	64
ANNEXES .....	72

## Liste des abréviations

2D-DIGE	:	2 Dimensions-Differential In Gel Electrophoresis
ACC synthétase	:	Aacide-1-aminocyclopropane-carboxylique
ASA	:	Lectine de l'ail
Con A	:	Concanavaline A
DTT	:	Dithiothreitol
EDTA	:	Ethylène diamine tétra acétique
FAO	:	Formes actives de l'oxygène
GC-MS	:	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GNA	:	<i>Galanthus nivalis</i> agglutinines
GPCR	:	G-Protein Coupled Receptor
GSL	:	Glucosinolate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Peroxyde d'hydrogène
ISR	:	Résistance systémique induite
JA	:	Acide jasmonique
kDa	:	Kilodalton
LCA	:	Lens Culinaris Agglutinin
MAP kinase	:	Mitogen-Activated Proteines Kinase
MO	:	Cytochrome P450 monooxygénase
Ncr Dvlop Sg	:	Nécrose développée de manière significative
Ncr Nn Dvlp	:	Nécrose non développée
PGPR	:	Plant Growth Promoting Rhizobactéria
PGs	:	Protéines G
PHA	:	<i>Phaseolus vulgaris</i> agglutinine
PNA	:	Peanut Agglutinin
PSA	:	<i>Pisum sativum</i> lectin or agglutinin
RLA	:	Résistance locale acquise
ROS	:	Espèces réactives de l'oxygène
RPM	:	Revolutions per minute
SA	:	Acide salicylique
SAR	:	Résistance systémique acquise
SBA	:	<i>Soybean agglutinin</i>
SDS- PAGE	:	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SDS	:	Sodium dodecylsulfate
SOD	:	Superoxyde dismutase
SPME	:	Microextraction en phase solide
UDP-glucose	:	Uridine diphosphate-glucose

## Liste des figures

Figure 1: Morphologie générale d'un puceron ailé .....	4
Figure 2: Cycle biologique type du puceron du soja .....	5
Figure 3: Voies de signalisation déclenchées chez les plantes par des agressions d'insectes phloémophages tels que les pucerons .....	24
Figure 4: Différentes salives secrétées par les pucerons (Cercle plein: salive gélifiante extracellulaire et les cercles vides: salives liquides) .....	25
Figure 5: Exemple de plants d' <i>A. thaliana</i> en culture hydroponique dans des bacs aroponics .....	32
Figure 6: Schémas récapitulatif du principe d'électrophorèse 2D .....	36
Figure 7: Dynamique de population de <i>M. persicae</i> après infection de <i>B. cinerea</i> sur .....	41
Figure 8: Fécondité de <i>M. persicae</i> après infection de <i>B. cinerea</i> sur <i>A. thaliana</i> .....	42
Figure 9: Développement nécrotique de <i>B. cinerea</i> sur <i>A. thaliana</i> (a = nécrose développée de manière significative, b = nécrose non développée). .....	42
Figure 10: Pourcentage de feuilles nécrosées après infestation de <i>M. persicae</i> sur <i>A. thaliana</i> .....	43
Figure 11: Dynamique de population de <i>M. persicae</i> après traitement avec l'acide salicylique sur <i>A.</i> <i>thaliana</i> .....	43
Figure 12: Fécondité de <i>M. persicae</i> après traitement avec l'acide salicylique sur <i>A. thaliana</i> .....	44
Figure 13: Pourcentage de feuilles nécrosées après traitement d' <i>A. thaliana</i> avec l'acide salicylique. 45	
Figure 14 : Dynamique de population de <i>M. persicae</i> après traitement d' <i>A. thaliana</i> avec l'acide jasmonique .....	46
Figure 15 : Fécondité de <i>M. persicae</i> après traitement d' <i>A. thaliana</i> avec l'acide jasmonique .....	46
Figure 16: Pourcentage de feuilles nécrosées après traitement d' <i>A. thaliana</i> avec l'acide jasmonique 47	
Figure 17: Dynamique de population de <i>M. persicae</i> après traitement d' <i>A. thaliana</i> avec la surfactine .....	48
Figure 18: Fécondité de <i>M. persicae</i> après traitement d' <i>A. thaliana</i> à la surfactine .....	48
Figure 19: Dynamique de population de <i>M. persicae</i> après traitement de <i>S. tuberosum</i> avec l'acide salicylique .....	49
Figure 20 : Fécondité de <i>M. Persicae</i> après traitement avec l'acide salicylique .....	50
Figure 21 : Dynamique de populations de <i>M. persicae</i> après traitement de <i>S. tuberosum</i> avec l'acide jasmonique .....	51
Figure 22: Fécondité de <i>M. persicae</i> après traitement avec l'acide jasmonique sur .....	51
Figure 23: Comparaison des fécondités de <i>M. persicae</i> en fonction des différents traitements .....	53
Figure 24 : Différence entre les plants d' <i>A. thaliana</i> en culture hydroponique (a) et culture sur terreau (b) .....	53
Figure 25: Comparaison des taux d'infections de <i>B. cinerea</i> en fonction des traitements sur .....	54
Figure 26: Evolution du pH extracellulaire après élicitation avec la salive de <i>M. persicae</i> .....	54
Figure 27: Variation de pH des cellules suivant les différents traitements .....	56
Figure 28: Gel 2D présentant les protéines exprimées de manière différentielle chez les cellules d' <i>A.</i> <i>thaliana</i> élicitées avec la salive de <i>M. persicae</i> ainsi que les cellules élicitées avec la diète .....	57

**Liste des tableaux**

Tableau 1 II: Solutions d'équilibration des strips..... 38  
Tableau 2: Programme de fonctionnement du HPE- FlatTop Tower pour 4 gels ..... 38  
Tableau 3 : Composition de la solution de fixation des gels ..... 39  
Tableau 4: Caractéristiques des fluorophores..... 39

## INTRODUCTION

A l'heure actuelle, une partie importante de l'alimentation de notre société est assurée grâce à la production végétale. Mais cette production est confrontée aussi bien à des problèmes d'ordre abiotique que biotique. Dans le cas des contraintes biotiques, il n'est plus à démontrer que les végétaux et plus particulièrement les plantes cultivées ne cessent d'être la cible de nombreux bio-agresseurs (champignons, nématodes et insectes phytophages). Ces différents bio-agresseurs constituent ainsi l'une des sources des baisses de rendement des cultures. Les champignons, comme *Botrytis cinerea* ou *Phytophthora infestans* par exemple causent des pourritures sur de nombreuses cultures. Les pucerons causent également de nombreux dégâts d'importances économiques sur les cultures, notamment via la transmission de virus. (Blackman et Eastop, 2000).

Pour faire face à ce panel de bio-agresseurs, les produits chimiques de synthèse sont largement utilisés. Bien que cette stratégie soit la plus efficace actuellement, les problèmes de pollution et de santé des populations qui y sont liés sont de moins en moins tolérés par la société. Il est donc souhaitable de développer de nouvelles stratégies d'intervention permettant d'assurer une protection efficace et fiable des cultures tout en réduisant l'impact nocif des pesticides.

Ces dernières années, de nombreuses études se sont focalisées sur les interactions entre les plantes et les pathogènes afin de mieux comprendre ces relations. Ces travaux ont notamment montré que la reconnaissance entre une plante et son agresseur se fait par l'intermédiaire de certains composés appelés éliciteurs. Les relations plantes-pathogènes reposent sur un dialogue permanent et complexe au cours duquel s'expriment des stratégies de survie parasitaire et des mécanismes de défense des plantes hôtes (Benhamou, 2009). Suite aux diverses agressions, les plantes développent différentes formes de défense telles que les résistances induites et locales, la production des protéines de défenses ou les phytoalexines. Parallèlement, ces nuisibles développent aussi des systèmes leur permettant de s'adapter aux réactions défensives des végétaux et cela, dans un système de coévolution.

Une meilleure compréhension des interactions entre plantes, agents pathogènes et insectes phytophages ainsi que l'identification d'éliciteurs de mécanismes de défense pourraient être des atouts dans la mise en place de nouvelles stratégies pour le contrôle des agents pathogènes et insectes phytophages des cultures. En effet, une application préventive d'un éliciteur connu

pour sa capacité à induire des mécanismes de défense, pourrait conduire à l'augmentation de la résistance des plantes face à des nuisibles et donc, de diminuer les quantités de pesticides nécessaire à la protection des cultures.

L'hypothèse d'une induction de protéines de défense végétale suite à l'alimentation des pucerons menant à une capacité à réduire le développement de champignons pathogènes et vis versa ainsi que l'effet de certains éliciteurs sera ainsi vérifiée au cours de ce présent travail par une étude des mécanismes de défense induits chez les plantes contre *Botrytis cinerea* et *Myzus persicae*.

Il sera donc question d'identifier les différents mécanismes de défense induits chez les plantes. Pour ce, nous allons de manière spécifique :

- ❖ étudier l'effet d'une résistance croisée *B. cinerea*/*M. persicae* sur les paramètres biologiques de *M. persicae* et vice versa ;
- ❖ évaluer l'effet de l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et de la surfactine sur les paramètres biologiques de *M. persicae* et du développement de *B. cinerea* ;
- ❖ évaluer l'activité élicitrice de la salive de *M. persicae* sur les cellules d'*Arabidopsis thaliana* par mesure des variations de pH ;
- ❖ comparer les protéomes<sup>1</sup> des cellules d'*A. thaliana* élicitées avec la salive de *M. persicae* ainsi que des cellules élicitées avec de la diète sans salive et enfin
- ❖ identifier les protéines induites chez les plantes.

---

<sup>1</sup>Ensemble des protéines exprimées dans une cellule, une partie d'une cellule ou un groupe de cellules dans des conditions données et à un moment donné.

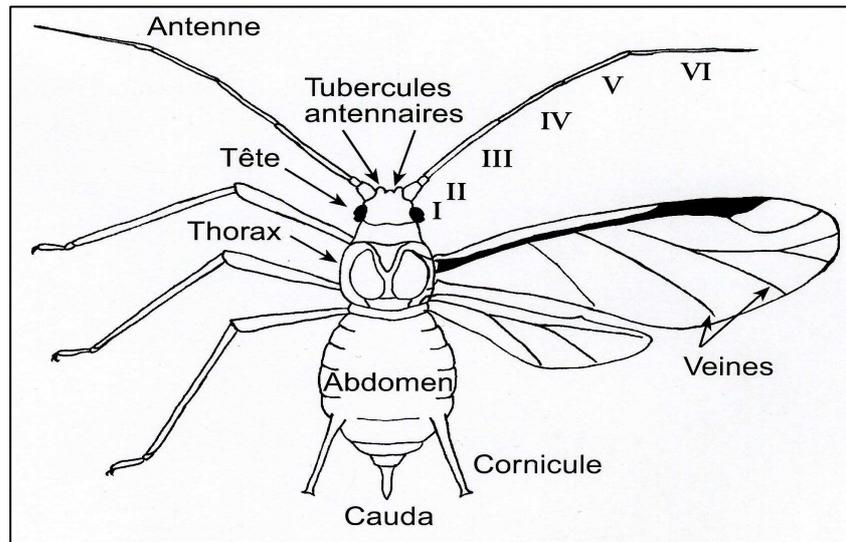
## I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1. Généralités sur les pucerons

Les pucerons sont des insectes appartenant à l'ordre des Homoptères. Cet ordre comprend d'autres insectes tels que les cigales, les cochenilles et les aleurodes (Hullé *et al.*, 1999). Ils sont répartis au sein de trois familles: Phylloxéridae et les Adelgidae caractérisées par l'absence, de générations vivipares, de cornicules et une nervation alaire très réduite ; les Aphididae dont les ailes antérieures portent au moins 4 nervures obliques (Chinery, 2000). Les Aphididae constituent la famille la plus importante portant le plus grand intérêt agricole. Les pucerons constituent le groupe d'insecte le plus répandu dans le monde et qui s'est diversifié parallèlement à celui des plantes à fleurs dont presque toutes les espèces sont hôtes des pucerons. On estime à plus de 4700 espèces connues de pucerons dans le monde dont 900 en Europe (Hullé, 1998). La majorité d'entre eux vivent en zones tempérées, mais on en trouve également dans les régions tropicales et subarctiques.

#### 1.1.1. Caractères morphologiques des pucerons

Les pucerons ou aphides sont des insectes au corps mou dont la taille est comprise entre 2 et 5mm. La tête porte des pièces buccales de type piqueur-suceur. Chez les adultes, elle porte des antennes sur lesquelles apparaissent des organes olfactifs et dont le dernier article est prolongé par un flagelle (Hullé, 1999). Le thorax est composé de trois segments. Il porte trois paires de pattes et deux paires d'ailes membraneuses et transparentes chez les espèces ailées. L'abdomen comporte neuf segments difficiles à différencier dont le cinquième porte les cornicules et le dernier le cauda (Hullé, 1999). Les critères morphologiques tels que la longueur des antennes et du flagelle, la forme des cornicules et du cauda, la présence de stries, de bandes, de sclérites sur l'abdomen, etc. permettent de caractériser les différentes espèces de pucerons. Néanmoins la morphologie générale est la même pour toutes les espèces comme indiqué sur la figure 1.



Source : Godin et Boivin, 2000

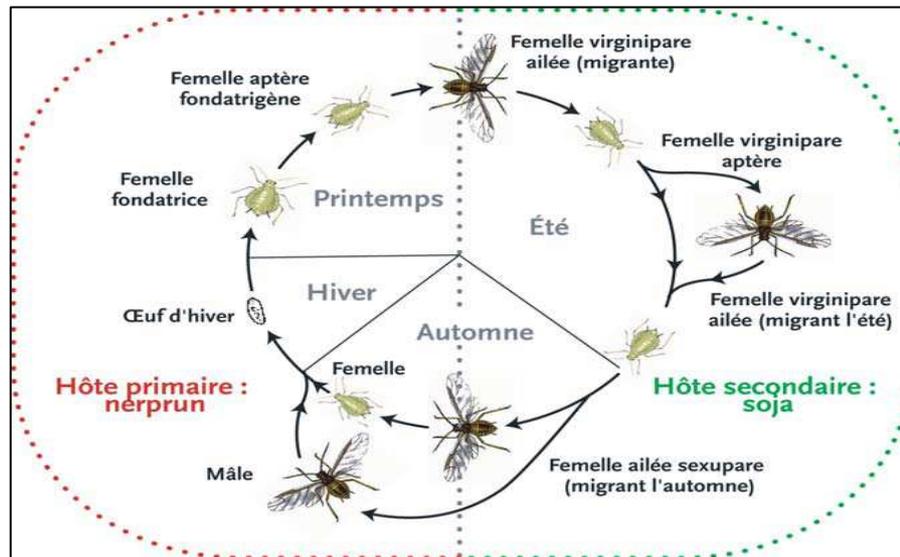
**Figure 1: Morphologie générale d'un puceron ailé**

### ***1.1.2. Biologie et cycle de vie des pucerons***

Deux formes de reproduction s'observent chez les pucerons: la reproduction sexuée et la parthénogenèse<sup>2</sup>. Dans le cas de la parthénogenèse, une femelle donne directement naissance à d'autres femelles parthénogénétiques, sans avoir été fécondée par des mâles: ce sont des espèces dites anholocycliques. Chez d'autres espèces, la multiplication parthénogénétique est entrecoupée d'une phase de reproduction sexuée: ce sont des espèces holocycliques (Leclant, 2000). Dans ce dernier cas, des individus mâles et femelles fécondables apparaissent à l'automne. Après fécondation, les œufs sont déposés sur la plante hôte où ils vont passer tout l'hiver offrant ainsi une forme de résistance au froid (Hullé *et al.*, 1999). Mis à part ces deux modes de reproduction, on observe également des espèces dites monœciques qui vivent toute l'année sur un même type de plantes alors que d'autres, dites diœciques, alternent entre deux types de plantes. Cette alternance est souvent liée à la reproduction sexuée. Beaucoup d'espèces ne peuvent en effet se reproduire sexuellement que sur une plante hôte particulière, en générale pérenne qualifiée d'hôtes primaire. Les plantes herbacées sur lesquelles l'espèce migre au printemps et passe la belle saison sont alors qualifiées d'hôtes secondaires (Leclant, 2000).

<sup>2</sup> Mode de reproduction des animaux dans lequel le mâle n'intervient pas.

L'une des caractéristiques la plus remarquable chez le puceron est le polymorphisme, c'est-à-dire la succession sur des plantes fort différentes des formes aptères et ailées, des individus sexués (mâles et femelles) et parthénogénétiques ainsi que des femelles vivipares (Fraval, 2006). L'un des exemples typiques est celui du puceron du soja (figure 2).



Source : Fraval, 2006

**Figure 2: Cycle biologique type du puceron du soja**

### 1.1.3. Dégâts occasionnés par les pucerons

Les pucerons représentent certainement le groupe le plus important des homoptères non pas en raison de l'importance du nombre des espèces mais pour leurs incidences économiques (Blackman et Eastop, 2000). Deux types de dégâts sont occasionnés par ces pucerons: les dégâts directs et les dégâts indirects.

#### 1.1.3.1. Dégâts directs

Les pucerons se nourrissent essentiellement de la sève, privant les organes attaqués d'eau et d'éléments nutritifs et entraînant un affaiblissement général de la plante (Dedryver *et al.*, 2010). Ces dégâts n'apparaissent qu'en présence d'une importante population de pucerons et sont généralement peu visibles sur les plantes ligneuses. Par contre, sur les plantes herbacées et potagères en particulier, on peut observer un ralentissement de croissance. La perforation des feuilles et l'injection de salive dans les tissus végétaux peuvent avoir des effets toxiques responsables de perturbations de natures physiologiques se traduisant par la formation de galles, de crispations, la dépigmentation des feuilles, etc. (Harmel *et al.*, 2008).

### **1.1.3.2. Dégâts indirects**

Au cours de leur alimentation, les pucerons excrètent le miellat. Bien que non toxique pour les plantes, ce dernier favorise le développement de la fumagine (Dedryver *et al.*, 2010). Cette dernière forme un enduit noir parfois très abondant à la surface des feuilles et peut entraver la photosynthèse (Leroy *et al.*, 2009). Elle peut également réduire la qualité des organes consommables, les rendant ainsi impropres à la commercialisation.

Par leur mode d'alimentation, ils transmettent des agents pathogènes aux plantes, essentiellement des virus de plantes. Ainsi, les coûts indirects des dommages causés par les pucerons grâce à la transmission de virus dépassent souvent de loin leurs impacts directs sur les cultures (Dedryver *et al.*, 2010). Généralement on distingue les transmissions persistantes et non persistantes. Néanmoins, une transmission dite semi-persistante peut s'observer dans certains cas.

### **1.1.4. Particularités de *Myzus persicae* Sulzer**

*Myzus persicae* mesure 1,2 à 2,5 mm de long. Sa couleur est très variable allant du vert clair au vert jaunâtre. La tête porte à sa base des tubercules frontaux convergents. Chez les ailés la tête et le thorax sont de couleur brun noirâtre. Les cornicules sont longues et claires (aptères) ou sombres (ailés) et renflées. L'abdomen présente des plaques discales sombres, échancrées latéralement et perforées par des sclérites marginaux; il porte également un cauda (Alford, 1994).

La biologie de *M. persicae* dépend des conditions climatiques et en particulier de la température. C'est une espèce qui présente deux types de cycles. Un cycle holocyclique dioécique avec alternance entre les hôtes primaires (le pêcher) et secondaires herbacés, et un autre anholocyclique sur l'hôte secondaire lorsque l'hôte primaire est absent ou que le climat lui permet de survivre par parthénogenèse (Anonyme 1, 2011). Les fondatrices naissent après éclosion des œufs d'hiver et engendrent des larves devenant des adultes ailés ou aptères. En fonction des conditions climatiques, les formes ailées émigrent sur les plantes hôtes secondaires après trois générations (Alford, 1994). Sur ces plantes se succèdent les femelles parthénogénétiques vivipares ailées et aptères. Ensuite, les sexupares ailés apparaissent et retournent sur la plante-hôte primaire et y engendrent des femelles sexuées. Au même moment les mâles apparaissent également sur les hôtes secondaires (Anonyme 1, 2011).

Très polyphage, ce puceron est nuisible à presque toutes les plantes cultivées sous serre et en plein champs (Anonyme 1, 2011). Il cause des dégâts directs et indirects surtout par transmission de virus. *M. persicae* peut transmettre un grand nombre de virus de façon persistante ou non. Par exemple, sur la pomme de terre, il transmet le PVY (Potato virus Y) de façon persistante et celui de l'enroulement (Potato leaf roll virus) de façon non persistante (Hullé *et al.*, 1999).

## **1.2. Mécanismes de défense végétale**

Les plantes sont continuellement exposées aux agents pathogènes et aux insectes, mais elles restent saines pour la plupart du temps. Ces observations suggèrent que les plantes résistent aux attaques de ces différents agresseurs (Nasraoui, 2006). Ces relations hôte-parasite reposent sur un dialogue permanent et complexe au cours duquel s'expriment les stratégies de survie parasitaire et les mécanismes de défense de la plante hôte (Benhamou, 2009). Ces mécanismes de défense incluent la production de signaux par l'environnement, la plante et les organismes agresseurs. Il s'en suit une cascade de réponses cellulaires qui mettent en jeu des phénomènes de perception et de transduction des signaux menant à une activation de gènes codant pour un éventail de molécules de défense dont la synthèse et l'accumulation sont, le plus souvent coordonnées dans l'espace et le temps (Benhamou, 1996). Généralement, les mécanismes de défense des plantes sont regroupés en deux catégories: les défenses constitutives et les défenses inductibles (Nasraoui, 2006 ; Chen, 2008).

### ***1.2.1. Mécanismes constitutifs ou passifs***

Les mécanismes passives responsables de la protection des plantes envers les pathogènes et insectes phytophages existent chez toutes les plantes, mais à des degrés divers. Il s'agit des barrières structurales constitutives et des substances chimiques préformées (Nasraoui, 2006; Chen, 2008).

***Les barrières structurales constitutives*** des plantes sont les épines, les trichomes, les poils, etc. Les tissus de revêtement tels que, l'écorce, la cuticule, etc. interviennent également dans la défense des plantes. Ces différentes structures constituent pour la plante, la première étape de défense contre ces agresseurs (Nasraoui, 2006).

***Les barrières chimiques constitutives*** sont essentiellement des métabolites secondaires (composés phénoliques et azotés) produits par la plante et qui peuvent être toxiques pour ces agresseurs. Ce sont pour l'essentiel des flavones, des acides chlorogéniques, des quinones, des

lactones, des saponines, des huiles, des composés organo-sulfurés, etc. Ces molécules de défense sont produites, transportées et stockées dans différentes parties de la plante de façon continue même en l'absence d'agents pathogènes (Benhamou, 2009).

### **1.2.2. Mécanismes inductibles ou actifs**

Lorsque certains pathogènes arrivent à contourner les barrières passives et s'introduisent dans la plante, les systèmes de défense actifs se mettent en place. Ces derniers se déroulent en trois étapes: (1) la perception qui correspond à la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante; (2) la signalisation qui est la phase d'activation d'une cascade de signaux dans les cellules attaquées et la transmission des signaux d'alerte aux cellules environnantes et à la plante entière et (3) l'expression des mécanismes de défense (Benhamou, 2009).

#### **1.2.2.1. Résistances spécifiques induites**

Le principe de cette résistance repose sur la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante. Selon la théorie «gène pour gène» (Flor, 1971), ce mécanisme de résistance est induit chez une plante hôte lorsque le produit d'un gène de résistance (R) de la plante reconnaît le produit d'un gène d'avirulence (Avr) de l'agent pathogène. Ainsi l'interaction entre ces deux gènes (R-Avr) conduit à une résistance spécifique se traduisant par une réaction d'hypersensibilité (RH) (Benhamou, 2009) qui s'apparente à la mort cellulaire programmée (apoptose) chez les animaux (Durand-Tardif et Pelletier, 2003). Dans la plupart du temps cette résistance se traduit par une nécrose de cellules autour du site d'infection. Aujourd'hui, plus d'une trentaine de gènes Avr a été clonée chez différents microorganismes. C'est l'exemple du gène Rep du virus de la mosaïque du tabac ou encore les gènes Avr-2, Avr-4, Avr-5, etc. de *Cladosporium fulvum*. Les gènes R ont été également l'objet de nombreuses études chez les plantes. Le gène Pto conférant une résistance à la tomate contre *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* exprimant le gène d'avirulence Avr fut le premier gène cloné (Martin *et al.*, 1993). Le gène Rx de la pomme de terre (contre le virus X de la pomme de terre) et les gènes Cf-2, Cf-4, Cf-9 de la tomate (contre *C. fulvum*) sont d'autres gènes qui ont été clonés par la suite (Benhamou, 2009).

### 1.2.2.2. Résistances non spécifiques induites

Lorsque les plantes perçoivent un signal de stress, elles activent certains mécanismes généraux que sont: les résistances locales acquises, systémiques acquises et systémiques induites. Ces résistances ne ciblent pas uniquement l'agresseur ayant déclenché la machinerie, mais plutôt contre tous les agresseurs: on parle alors de résistance généralisée (Benhamou, 2009).

**La résistance locale acquise (RLA)** est une forme de résistance qui s'exprime aux sites de pénétration de l'agent pathogène. Elle agit au niveau des nécroses et limite le développement de l'agent pathogène (Hopkins et Evard, 2003). Dans la zone de nécrose, la paroi est renforcée par des dépôts de lignine et de callose. Cette activité locale se caractérise par la synthèse et l'accumulation de métabolites antimicrobiens (flavonoïdes, coumarines, terpènes, anthocyanines, etc.).

**La résistance systémique acquise ou SAR (Systemic Acquired Resistance)** se met en place suite à une RH de la plante hôte (Nasraoui, 2006). Elle apparaît généralement 30 minutes (min) voire plusieurs heures après l'infestation initiale et protège la plante des infestations ultérieures contre les bactéries, les champignons, etc. (Klarzynski et Fritig, 2001). L'expression de cette résistance à distance des cellules attaquées nécessiterait une diffusion du message de stress en direction des tissus sains de la plante (Benhamou, 2009). La SAR se traduit par la synthèse des phytoalexines, des métabolites antimicrobiens accompagnée d'une accumulation de l'acide salicylique (SA) et de protéines liées à la pathogénicité (PR: Pathogenesis Related Proteins) (Durand-Tardif et Pelletier, 2003; Adam, 2008). Suite à une infection par des pathogènes par exemple, la concentration de la SA augmente dans toutes les cellules des feuilles non infectées de la plante. Cette accumulation paraît nécessaire à l'établissement de la SAR. Molders *et al.* (1996) ont étudié le transport de l'acide salicylique dans le concombre (*Cucumis sativus*) en injectant de l'acide benzoïque marqué au carbone ( $^{14}\text{C}$ ) dans les cotylédons au moment de l'inoculation. Ils ont montré par ces expériences qu'une inoculation primaire par le virus de la nécrose du tabac sur les cotylédons conduisait à l'induction de la résistance systémique de la première feuille au-dessus du cotylédon primaire contre *Colletotrichum lagenarium* trois jours après inoculation. Beaucoup d'autres études (Rasmussen *et al.*, 1991; Durand-Tardif et Pelletier, 2003) ont pu démontrer l'implication de la SA dans la SAR même si l'avis des chercheurs reste plus ou moins partagé sur ce point.

**La résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)** est une forme de défense stimulée par des microorganismes variés et plus particulièrement les rhizobactéries (Jourdan *et al.*, 2008). Toutes les bactéries ayant un rôle positif dans le développement de la plante par le biais d'une stimulation de ces mécanismes de défense tel que l'ISR sont regroupées sous le terme de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes ou PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Marcado-blanco et Bakker, 2007). En effet, pour agir efficacement en tant qu'inducteurs de résistance, les PGPR devraient avoir la capacité de coloniser les tissus racinaires sans causer de dommages structuraux. C'est l'exemple des racines, qui infectées par *Pseudomonas* non pathogène, induisent des réactions de défense à une infection ultérieure par un pathogène sur une partie de la plante autre que la racine (Durand-Tardif et Pelletier, 2003). L'inoculation subséquente des racines de pois avec les champignons pathogènes *Pythium ultimum* Trow et *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *pisi* a révélé des différences substantielles en termes de taux de colonisation fongique. Alors que dans les racines non traitées avec les PGPR le champignon progressait très rapidement d'un tissu à l'autre causant des dommages irréparables aux parois végétales, la croissance et le développement des hyphes mycéliens dans les racines prétraitées avec les PGPR étaient limités à l'épiderme et au cortex externe. Ces réactions incluaient non seulement la formation de barrières structurales enrichies en callose et lignine, mais aussi l'accumulation de composés phénoliques à potentiel antifongique direct (Benhamou et Picard, 1999). L'ISR réduit l'impact des maladies dû aux champignons racinaires (*Fusarium*, *Pythium*) ou aériens (*Botrytis cinerea*), aux virus et certains nématodes (Ongena *et al.*, 2006). Dans l'ISR, on observe la mise en place des régulateurs de croissance tels la jasmonate et éthylène plutôt que la synthèse des protéines-PR (Durand-Tardif et Pelletier, 2003). Bien que similaire à la SAR, le mécanisme d'expression de l'ISR présente certaines divergences. Elle est principalement divisée en trois étapes: (1) l'élicitation: les PGPRs interagissent avec les racines de l'hôte et produisent des éliciteurs qui sont perçus par la plante; (2) la transmission du signal dans toute la plante après réception des éliciteurs et (3) l'expression des mécanismes de défense de l'hôte (Jourdan *et al.*, 2008).

### **1.2.3. Particularités des mécanismes de défense des plantes face aux insectes**

Même si ces insectes provoquent des dégâts physiques de faible importance sur les plantes, ils induisent néanmoins de robustes réactions défensives (De vos et Jander, 2010). Ces dernières sont soit directement liées à la sensibilité de la plante hôte aux attaques des insectes soit

indirectement liées à l'attraction d'ennemis naturels des insectes phytophages par la plante (Chen, 2008).

Les mécanismes directs consistent en une limitation de l'alimentation par le renforcement de la paroi cellulaire et la production de substances toxiques (Chen, 2008). De multiples travaux ont démontré le rôle des trichomes dans la défense directe contre les attaques des insectes phytophages. *Solanum berthaultii* présente deux types de trichomes. Les types B secrètent un liquide visqueux qui piège les insectes au cours de leur atterrissage sur les feuilles. Contenant des sesquiterpènes, cet exsudat excite l'insecte qui déchire les têtes des trichomes de type A contenant des composés toxiques qui l'immobilisent (Benhamou, 2009).

Certaines plantes vont répondre aux attaques des insectes par la production d'inhibiteurs de protéases (IPs) digestives des insectes. Les IPs inhibent les processus digestifs et entraînent des perturbations physiologiques parfois létales pour l'insecte (Ryan, 1999). Chez la tomate par exemple, la systémine est libérée au niveau des blessures. L'interaction avec son récepteur conduit dans un premier temps à un flux d'ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) et l'activation d'une MAP kinase (Mitogen-Activated Proteines Kinase). Quelques minutes (15min) après, l'acide jasmonique (JA) est synthétisé suivi de l'activation des gènes codant pour les inhibiteurs de protéases (Bonnemain et Chollet, 2003). Un autre exemple d'IP est celui de la protéase à cystéine dans le maïs (Pechan *et al.*, 2000) qui s'accumule très rapidement au site d'alimentation des insectes et qui après injection par l'insecte inhibe sa croissance et son développement.

Par l'intermédiaire de son phloème qui contient des protéines P (Phloem protein), la plante peut agir localement. Ces protéines interviennent dans le colmatage des blessures du phloème. Les protéines telles que les forisomes vont ainsi se lier au calcium pour former des structures protéiques capables d'obstruer les tubes criblés, stoppant immédiatement le flux de nutriments (Giordanengo *et al.*, 2007).

Une autre forme de défense des plantes est l'induction de composés volatils responsables des défenses directes ou indirectes par l'attraction des prédateurs et parasitoïdes (Harmel *et al.*, 2008). Par exemple lors d'une infestation de pucerons, les plantes libèrent des composés volatils qui attirent les coccinelles, les hyménoptères parasitoïdes et d'autres prédateurs aphidiphages (De vos et Jander, 2010). Sur les feuilles de cotonnier, les attaques de chenilles de *Spodoptera exigua* libèrent des substances volatiles (Paré et Tumlinson, 1999) comme les terpènes, l'idole, etc. Ces composés agissent comme des signaux et font appel aux hyménoptères parasites de cette chenille (Bonnemain et Chollet, 2003). Le (E)- $\beta$ -farnésène

(EBF) est un composé volatil libéré par beaucoup de plantes et qui agit comme molécule de défense des plantes contre les infestations de pucerons. Les travaux de microextraction en phase solide (SPME) et de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) des composés volatils de la pomme de terre effectués par Harmel *et al.* (2007) ont montré que l'EBF émise par la pomme de terre infestée par *Myzus persicae* induisait un comportement de recherche alimentaire et de ponte très élevé chez *Episyrhus balteatus* un prédateur aphidiphage.

D'autres plantes vont présenter une antibiose<sup>3</sup> ou antixénose<sup>4</sup>. Par exemple certaines espèces sauvages de *Solanum* apparentées à la pomme de terre cultivée présentent une antixénose vis-à-vis de *Myzus persicae* (Le Roux, 2007). D'autres études ont montré également que des taux élevés de  $\alpha$ -chaconine et  $\alpha$ -solanine présentait un effet négatif sur l'alimentation et la fécondité de *M. persicae* (Fragoyiannis *et al.*, 1998).

#### **1.2.4. Substances de défense des plantes**

En réponse aux attaques des pathogènes et des insectes phytophages, les plantes produisent de nombreuses substances de défense. Les lectines, les métabolites secondaires, les inhibiteurs de protéases, les éliciteurs, etc. sont quelques unes de ces substances de défense.

##### **1.2.4.1. Lectines végétales**

Les lectines ou agglutinines sont des protéines ou des glycoprotéines présentes aussi bien chez les végétaux que chez les animaux et les bactéries (Meite *et al.*, 2006). Chez les végétaux, elles représentent un groupe très hétérogène de protéines qui peuvent reconnaître et se lier spécifiquement et de façon réversible à des structures glucidiques même liés à des lipides ou protéines (Wilhelm Nultsch, 1998). Les lectines peuvent causer une réduction voire un arrêt de croissance conduisant à la mort des nuisibles; mais l'efficacité est fonction de la température et de la durée du traitement (Meite *et al.*, 2006).

En fonction du nombre de liaisons qu'elles peuvent établir, les lectines végétales sont réparties en quatre groupes. Les mérolectines à une seule liaison en hydrates de carbone; les hololectines à deux ou plusieurs liaisons aux glucides identiques ou très homologues; les chimérolectines composées d'un domaine de liaison aux glucides et d'un autre domaine

---

<sup>3</sup> Association antagoniste entre un organisme et les substances métaboliques produites par un autre organisme.

<sup>4</sup> Interaction biologique dans laquelle un insecte est repoussé par une plante ou réduit les dommages qu'il pourrait occasionner sur la plante

indépendant et les superlectines composés d'au moins deux domaines d'hydrates de carbone (Van Damme *et al.*, 1998). Les lectines végétales sont en majorité des hololectines et se retrouvent essentiellement dans les légumineuses (lentilles, fèves, pois, etc.), mais aussi dans la pomme de terre et le ricin (Wilhelm Nultsch, 1998). Chez les légumineuses, on distingue les lectines galactose spécifiques (arachide [PNA], soja [SBA], etc.) et les lectines mannose spécifiques (pois [PSA], lentille [LCA], etc.) (Rougé *et al.*, 2010). Les fortes concentrations de ces lectines s'observent dans les graines ou divers organes de stockage végétatifs comme les tubercules, les bulbes, etc. (Van Damme *et al.*, 1998). C'est l'exemple de *Phaseolus vulgaris* agglutinine (PHA) dans les graines de haricot, du *Galanthus nivalis* agglutinines (GNA) présent dans les bulbes de perce-neige, etc. La plupart de ces lectines sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs qui deviennent actifs seulement après la séquestration dans des organites spécialisés. Elles jouent non seulement un rôle de défense générale contre les nuisibles, mais également comme protéines de réserve pour la croissance et le développement de la plante. Les plus étudiées sont la concanavaline A (Con A) isolé du pois sabre (*Concavalia ensiformis*) et l'agglutinine du germe de blé isolé des embryons du blé (*Triticum spp*) (Hopkin et Evrard, 2003).

Ces dernières années, les propriétés entomotoxiques pour de nombreux lectines végétales ont été démontrées. Sadeghi *et al.* (2009) ont pu comparer l'activité de trois lectines végétales (APA issue du poireau, GNA de perce-neige et ASA d'ail) ayant une spécificité pour le mannose sur la sensibilité d'*Acyrtosiphon pisum* (Harris). Les résultats obtenus montrent que des tests de longue durée avec des faibles doses de l'APA réduisent la survie et la fécondité des adultes d'une manière significative. Sauvion *et al.* (2003) ont étudié également les modifications induites chez *A. pisum* par la ConA. Ils ont conclu que les changements comportementaux observés chez ce puceron seraient dûs à la toxicité de cette lectine.

Les cibles potentielles des lectines chez les insectes sont les structures de l'intestin. Des études sur l'organisation ultrastructurale de l'intestin des insectes ont pu détecté des anomalies dans les structures des microvillosités (Vandenborre *et al.*, 2011). D'autres travaux ont montré également que ces lectines pouvaient se retrouver dans d'autres compartiments de l'insecte tel que l'hémolymphe, le tube de malpighi etc. C'est l'exemple de la GNA retrouvée dans l'hémolymphe, les tissus adipeux et les ovarioles de la cicadelle brune du riz après ingestion de cette lectine (Powell *et al.*, 1998). En effet, ayant une affinité pour les glycanes, les glycoprotéines sont toutes de potentielles cibles pour la fixation des lectines végétales

(Vandenborre *et al.*, 2011). Chez *A. pisum*, la GNA et la ConA, se fixent à une aminopetidase de l'intestin moyen (Cristofolletti *et al.*, 2006). De ce point de vue, un mécanisme antinutritionnel, peut résulter des interactions entre lectines et enzymes digestives et ou protéines de transport dans la lumière intestinale des insectes (Vandenborre *et al.*, 2011).

Même si les lectines végétales ont été largement étudiées, leur rôle physiologique dans la plante reste à éclaircir. Néanmoins, elles peuvent être considérées comme faisant partie de l'état naturel des réactions de défense des plantes contre les insectes phytophages. Par contre, il est encore difficile de prévoir si le pouvoir toxique d'une lectine sera actif contre un insecte ravageur et/ou non-cible (Vandenborre *et al.*, 2011).

#### **1.2.4.2. Métabolites secondaires**

Les composés phénoliques sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les coumarines, les anthocyanines, les quinones etc. Ils sont synthétisés principalement par le sentier des métabolites shikimiques<sup>5</sup> et stockés dans la plante sous forme de complexes inactifs incorporés à la paroi (Benhamou, 2009). Ils peuvent augmenter la teneur en lignine des barrières physiques pour permettre une meilleure protection de la plante. C'est l'exemple de jeunes fruits de tomate qui en réponse à une blessure produit en 48h des métabolites phénoliques conduisant à une forte augmentation de différentes activités enzymatiques et à la mise en place de lignine dites de blessure (Macheix *et al.*, 2005). Une forte concentration de composés phénoliques dans de jeunes plants assure leur résistance à certains pathogènes comme *Botrytis* (Nasraoui, 2006). Généralement ces composés présentent des effets délétères sur la germination des spores, la croissance du mycélium, la détoxification des toxines fongiques. C'est ainsi que l'acide protocatéchuïque et la catéchol participent à la résistance de l'oignon contre les attaques de *Colletotrichum circinus* en inhibant la germination des spores (Benhamou, 2009). La teneur initiale élevée en ces composés et/ou leur augmentation plus intense et plus rapide permettent souvent de différencier les espèces résistantes ou sensible à un agent nuisible (Macheix *et al.*, 2005).

Les composés azotés (CA) regroupent: les composés cyanogènes dont la durrhine (chez le sorgho) et la linamarine chez le trèfle sont les plus étudiés (Benhamou, 2009). Les saponines sont des stéroïdes, glycosylés, alcaloïdes ou des triterpènes. L' $\alpha$ -tomatine est l'une des saponines dont l'activité antifongique a été largement étudiée. C'est l'exemple de fruits de

---

<sup>5</sup> Qualifie un acide intervenant dans la synthèse des composés phénoliques.

tomates mûres qui peuvent être parasités par *Fusarium solani* contrairement aux fruits verts qui ne sont pas parasités par le même champignon à cause de leur forte concentration en  $\alpha$ -tomatine (Benhamou, 2009). La tomatinase est une enzyme sécrétée par certains champignons comme *Alternaria tomato* et *Septoria lycopersici* ayant la capacité d'hydrolyser l' $\alpha$ -tomatine en un composé moins toxique (Martin-Hernandez *et al.*, 2000).

#### **1.2.4.3. Inhibiteurs de protéases (IPs)**

Les IPs sont de petites protéines très courantes et présentes dans tous les organismes vivants. La majorité des IPs étudiés dans le règne végétal proviennent de trois familles (Légumineuses, Solanaceae, et Graminées) (Brzin et Kidric, 1995). Ils sont localisés généralement dans les organes de stockage (graines, tubercules, etc.). Leur taille varie entre 4 à 85 kDa, avec une moyenne de 8 à 20 kDa (Hung *et al.*, 2003). Ils se caractérisent par leur capacité à inhiber les protéases digestives des insectes ou sécrétées par des micro-organismes, provoquant ainsi une diminution de la disponibilité des acides aminés nécessaires à leur croissance et développement (De Leo *et al.*, 2002). Ils jouent également un rôle de stockage des protéines (Shewry, 2003). Ils interfèrent également avec les processus physiologiques importants des insectes et autres agents pathogènes, tels que l'activation des enzymes protéolytiques, la mue des insectes ou la réplication de virus (Gutierrez- Campos *et al.*, 1999). Chez les insectes, ils peuvent former des complexes en se liant aux protéases, inhibant ainsi leur activité. C'est ainsi que certaines plantes libèrent des IPs en réponse aux attaques d'insectes, les obligeant à jeuner par inactivation de leurs enzymes digestives (Voet et Voet, 2005). Les principales familles des IPs sont: les IPs à sérine spécifiques à la trypsine et chymotrypsine; les IPs à cystéine spécifiques à la papaine et bromaléine, les IPs de protéases acides spécifiques à la cathepsine D et les IPs de métalloprotéases spécifique aux carboxipeptidases (Benhamou, 2009).

Les IPs à sérine sont très répandus et les plus étudiés (Mello *et al.*, 2002). Ils jouent un rôle important dans la physiologie de la plante par une réglementation des protéases endogènes, une mobilisation des protéines de réserve, et la protection contre les enzymes protéolytiques des pathogènes et insectes (Fan et Wu, 2005). Les IPs à sérine de type I et II sont les premiers à être isolés sur les tubercules de pomme de terre. Le type I isolé de la tomate et de la pomme de terre est très actif sur la chymotrypsine par contre le type II isolé des mêmes plantes est plutôt actif à la fois sur la chymotrypsine et la trypsine, ce qui montre la diversité du spectre d'action des différents IPs d'une plante (Ryan, 1990).

Les IPs à cystéines sont principalement des cystatines. Elles renferment généralement deux ponts disulfures qui forment deux boucles à proximité de l'extrémité C-terminale de l'IP (Benhamou, 2009). Les cystatines de types II sont les plus rencontrées chez les plantes. Oryzacystatine I (OCTI) et oryzacystatine II (OCTII) sont les deux premières phycystatines découvertes par Abe (1985) notamment chez le riz. Le processus d'inhibition de toutes les cystatines se fait de façon non covalente (Soares-Costa *et al.*, 2002). Elles régulent les protéases à cystéine, protègent la plante contre les nuisibles et dans certains cas contrôlent l'hydrolyse des protéines de réserves (Brown et Dziegielewska, 1997).

Les IPs à métalloprotéases et de protéases acides sont très peu rencontrés chez les plantes. Ils sont caractérisés par un domaine C-terminal exposant cinq boucles qui forment le site inhibiteur venant interagir avec le site actif de l'enzyme et un domaine N-terminal qui forme des liaisons de coordination avec l'atome de zinc catalytique (Gomez *et al.*, 1997). La capacité de l'IP d'acide caractérisé dans la courge à inhiber une protéase acide synthétisée par un champignon pathogène des Cucurbitacées suggère qu'il pourrait jouer un rôle de défense contre les champignons pathogènes de la courge. (Christeller *et al.*, 1998).

La protection contre les agents pathogènes, les insectes phytophages et la régulation des protéines endogènes sont les grandes fonctions des IPs (Mosolov et Valueva, 2005). Avec les métabolites secondaires, les IPs jouent un rôle important dans la défense des plantes (Schimoler-O'Rourke *et al.*, 2001).

### **1.2.5. Eliciteurs biotiques**

Les éliciteurs sont des composés capables de déclencher les réactions de défenses chez les plantes (Jourdan *et al.*, 2008). On distingue généralement les éliciteurs biotiques et abiotiques. Les éliciteurs biotiques sont soit exogènes soit endogènes. Ils peuvent être de nature saccharidique, glycoprotéique, protéique ou lipidique. Les exogènes sont pour la plupart d'origine fongique et bactérienne, néanmoins certaines proviennent des virus et même de certains insectes phytophages (Benhamou, 2009).

Les  $\beta$ -glucanes (oligosaccharides) constituants majeurs des parois fongiques et bactériennes sont les tous premiers éliciteurs isolés chez *Phytophthora megasperma* (Darwill et Albersheim, 1984). L'incubation des parois de *P. megasperma* f. sp. *glycinea*, en présence d'une préparation enzymatique de cotylédons de soja, entraîne la libération de fragments oligosaccharidiques ayant pour propriété de stimuler la synthèse de phytoalexines chez certaines plantes. Les oligomères de chitine provenant des parois fongiques et le chitosane

sont également des oligosaccharides présentant des activités élicitrices pour la synthèse des phytoalexines (Lepoivre, 2003).

Les élicitines sont de petites protéines d'environ 10Kda capables de migrer dans la plante via le système vasculaire contrairement à la plupart des éliciteurs connus (Benhamou, 2009). Elles sont sécrétées par des champignons des genres *Phytophthora* et *Pythium*, et induisent une réaction de type hypersensible chez des plantes comme le tabac. Selon qu'ils soient basique ( $\beta$ ) ou acide ( $\alpha$ ), elles présentent des effets nécrotiques différents et induisent des mécanismes de défenses indépendants (Aymes et Pernollet, 1997). La cryptogéine ( $\beta$ ) et la capsicéine ( $\alpha$ ), ont fait l'objet de nombreuses études quant à leur capacité à induire des réactions de défense chez le tabac. Une étude comparée de leur mode d'action dans l'activation de diverses voies métaboliques impliquées dans les réactions de défenses des plantes a montré que dans des feuilles de tabac, elles induisent différenciellement, en fonction de leur nature et de leur dose, la production d'acide salicylique et d'acide jasmonique (Aymes et Pernollet, 1997). D'autres travaux menés sur le tabac ont pu montrer que ces protéines provoquaient toute une cascade d'événements précédant l'établissement de la résistance. C'est l'exemple des travaux de Bourque *et al.* (1999) qui ont montré que quelle que soit la nature chimique des élicitines, elles induisaient un influx de  $Ca^{2+}$ , l'alcalinisation du milieu extracellulaire et une production de FAO.

Les éliciteurs endogènes sont produits à partir de la plante suite à la présence du pathogène. Leurs structures sont moins définies contrairement aux éliciteurs fongiques qui présentent une très haute spécificité structurale (Aldington et Fry, 1993). En plus de la fonction de défense, elles peuvent réguler le mûrissement des fruits ou encore l'élongation cellulaire (Benhamou, 2009). Libérés par l'action des enzymes bactériennes ou fongiques, les éliciteurs oligogalacturonides induisent à leur tour la synthèse de phytoalexines (Lepoivre, 2003). En termes d'activité biologique les éliciteurs endogènes sont considérés comme étant les plus efficaces (Côté et Hahn, 1994).

### **1.2.6. Transduction du signal**

Les réactions de défense de plante se mettent en place lorsqu'il y a reconnaissance spécifique d'un éliciteur exogène par la plante. Il s'en suit alors l'activation d'une série d'éléments destinés à transmettre le signal à l'ensemble de la plante. Ainsi on peut distinguer les signaux précoces et les signaux secondaires.

### 1.2.6.1. Signaux précoces

L'activation des protéines G, les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation des protéines, les flux ioniques et la modification oxydatives, sont les messagers précoces les plus importants des mécanismes de défense des végétaux.

Les protéines G (PGs) représentent l'une des classes des protéines très conservées chez les eucaryotes. Elles sont les principaux effecteurs des récepteurs membranaires ou GPCR (G-Protein Coupled Receptor). A l'état actif, les PGs comportent trois sous unités ( $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ ) et sont pour la plupart des hétérotrimériques<sup>6</sup> (Benhamou, 2009). La liaison d'un ligand sur son récepteur et l'activation de la PG représentent les premières étapes indispensables à la transmission d'un signal à l'intérieur de la cellule (Benhamou, 2009). Les PGs sont fortement impliquées dans les voies de signalisation par leur capacité de transmettre le signal de stress aux canaux ioniques ou aux phospholipides membranaires qui à leur tour induisent une cascade d'évènements menant par exemple à l'entrée massive de calcium ou de nitrate et de protons (Ross *et al.*, 1999). Zhao et Wang (2004) ont identifié une interaction directe entre la sous-unité  $G\alpha$  d'une PG et une phospholipase D chez le tabac et Arabidopsis. Cette sous-unité serait impliquée dans l'activation des phospholipides membranaires permettant ainsi la libération de précurseurs tels que l'acide jasmonique. L'inhibition des PGs montre que ces protéines interviennent aussi dans la biosynthèse de phytoalexines chez les plantes (Ortégua *et al.*, 2002). L'association entre un récepteur kinase-like et des PGs est indispensable à l'établissement de la résistance aux champignons nécrotrophes (*Plectosphaerella cucumerina*). Ce rôle a été prouvé chez Arabidopsis (Llorente *et al.*, 2005).

Les modifications ioniques concernent principalement des efflux d'ions potassium ( $K^+$ ), nitrate ( $NO_3^-$ ) et chlorure ( $Cl^-$ ) et des influx d'ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) et de proton ( $H^+$ ) (Bonnemain et Chollet, 2003). Ils constituent les réactions les plus précoces à la reconnaissance d'un agent pathogène menant à l'expression d'une résistance. En étudiant les modifications des flux ioniques chez Arabidopsis, Clough *et al* (2000) ont montré que ces flux pouvaient inhiber l'expression de la HR. Dans un modèle hypothétique des évènements précoces basés sur la reconnaissance de la cryptogéine<sup>7</sup> par les cellules de tabac, Jourdan *et al.* (2008) ont montré que l'influx de calcium intracellulaire entraîne entre autre une dépolarisation de la membrane plasmique, la production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et

<sup>6</sup> Se dit d'une protéine composée de trois sous-unités distinctes

<sup>7</sup> Protéine isolée de *Phytophthora cryptogea* capable d'induire une résistance systémique chez le tabac.

l'activation des MAPs kinase. Les MAPs Kinase ainsi que l'augmentation du calcium dans le noyau de la cellule déclencheraient l'expression des gènes de défense. Mais l'augmentation prolongée du taux de calcium intracellulaire est toxique pour la plante. Il est donc régulé dans la cellule grâce à des protéines affines (calcium-binding-proteines) capable de le fixer (Benhamou, 2009). L'utilisation des inhibiteurs de canaux calcique comme l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), des ions ionophores à  $\text{Ca}^{2+}$  montre que le calcium est impliqué dans la transduction du signal de stress (Sasabe *et al.*, 2000).

Les formes actives de l'oxygène (FAO) sont produites dans les mitochondries et les chloroplastes des cellules végétales (Lepoivre, 2003). Dans les conditions normales, les FAOs sont produites en petite quantité et de façon équilibrée dans la plante. Leur surproduction lors d'une HR entrainerait un déséquilibre qui se traduit par un stress oxydatif. La cellule va ainsi accumuler les radicaux toxiques pour se défendre au risque de s'intoxiquer elle-même (Benhamou, 2009). Le stress oxydatif se définit alors comme un déséquilibre du ratio FAO-enzymes oxydants. Ces enzymes antioxydants (catalase, peroxydase, etc.) vont non seulement réguler l'activité des FAOs mais aussi neutraliser certains dérivés toxiques de l'oxygène (Benhamou, 2009). La synthèse des FAOs est associée a une montée transitoire de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et de la mise en place ultérieure des mécanismes de défenses associés aux HRs, à la synthèse des phytoalexines et à des protéines de défenses (Lepoivre, 2003). Parmi les formes réactives de l'oxygène, on distingue, le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) et le radical hydroxyle (HO). Par une dismutation spontanée de  $\text{H}_2\text{O}$  ou après la catalyse par le superoxyde dismutase (SOD),  $\text{O}_2$  peut donner le  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Le glucose-oxydase et les amines-oxydases peuvent également réduire l' $\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dans la cellule végétale, le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est régulé par différentes enzymes dont les principales sont le l'ascorbate-peroxydase et le glutathion-peroxydase (Lepoivre, 2003). En présence des ions ferreux ( $\text{Fe}^{3+}$ ), le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est convertit en OH par une fixation supplémentaire d'électron sous l'action de la dismutate oxydative. L'action anti-microbienne directe (Lamb et Dixon, 1997), le renforcement de la paroi (Bradley *et al.*, 1992) et l'induction des gènes de défense et de protection (Tenhaken *et al.*, 1995) seraient les plus grandes fonctions des FAOs. La phosphorylation est une modification post-traductionnelle des protéines qui interviennent dans un grand nombre de processus cellulaires et particulièrement dans la signalisation. Elle induit des modifications structurales et fonctionnelles des protéines cibles et est reversée par la déphosphorylation catalysée par les phosphatases (Benhamou, 2009). La phosphorylation/déphosphorylation est donc un mécanisme biochimique important dans la

régulation des protéines cellulaires qui augment l'efficacité du signal initial et des interconnexions pour l'activation de plusieurs voies de défense (Benhamou, 2009). Le traitement de cellules de tomate et de tabac, en cultures avec des oligogalacturonates ou des élicites montre que la phosphorylation des protéines est induite très précocement (Viard *et al.*, 1994). Ainsi le rôle de cette phosphorylation dans la régulation de l'activité cellulaire a été confirmé par l'utilisation d'inhibiteurs de phosphorylation telle la staurosporine (Romeis *et al.*, 1999). Les MAPK sont impliquées dans ce processus et amplifient le signal initial pour l'activation des voies de défense. Ils transforment ainsi les signaux extracellulaires en réponses intracellulaires. Les protéines kinase et les protéines phosphatases constituent un couple inséparable dans les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation (Benhamou, 2009). Suite à la perception de signal de stress, les protéines kinase déclenchent une phosphorylation en cascade jusqu'à la transmission du signal dans toute la cellule. Cette cascade ne peut être inhibée que par l'activation des phosphatases (Benhamou, 2009).

#### **1.2.6.2. Signaux secondaires**

L'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) sont les principaux messagers intracellulaire lors des interactions plantes/agresseurs. Ces molécules constituent le relai entre les événements précoces de signalisation et l'activation des réponses de défense induites. Les études faites sur le rôle de ces trois molécules signaux dans la résistance des plantes aux agents pathogènes montrent que les voies de signalisation de l'ET et du JA interviennent généralement dans la résistance aux agents nécrotrophes contrairement à l'SA qui intervient plutôt contre les agents biotrophes (Glazebrook, 2005).

L'acide salicylique est un dérivé de la phénylalanine issu du sentier des phénylpropaoïdes (Verberne *et al.*, 1999). Il joue un rôle de messenger dans la mise en place des défenses induites de la plante. Il participe au confinement de l'agresseur et à la mise en place de SAR. Il déclenche également l'expression des protéines PR et participerait à la HR des cellules. Ainsi, lorsqu'on bloque précocement son accumulation dans une plante de tabac attaquée par le virus de la mosaïque du tabac, l'apoptose cellulaire est retardée (Hopkins et Evard, 2003). D'autres expériences ont montré que les plantes de tabac et d'*A. thaliana* transgénique n'exprimant pas la salicylate hydroxylase une enzyme bactérienne, ne pouvaient pas accumuler la SA. De ce fait, elles étaient non seulement incapables d'induire une SAR, mais elles étaient aussi attaquées par d'autres agents pathogènes (Delaney *et al.*, 1994). Mais à des concentrations supérieures à 0,1µM, la SA devient phytotoxique. Ainsi lorsqu'il est

nouvellement synthétisé, il est converti en SA-glucoside par l'UDP-glucose. La SA-glucoside est inactive et apparait comme un inducteur de protéine PR. La SA est donc en faible concentration dans les cellules et peut être stocké par la AS-glucoside. Sa libération progressive permettrait ainsi de maintenir plus longtemps la résistance systémique induite (Anonyme 2, 2011). Bien que plusieurs travaux aient pu démontrer l'implication de l'SA dans la SAR (Ward *et al.*, 1991; Cameron *et al.*, 1994) certains travaux remettent en cause cette implication (Rasmussen *et al.*, 1991 ; Vernooij *et al.*, 1994).

L'acide jasmonique (JA) synthétisé à partir de l'acide linoléique, régule non seulement le développement et la croissance des plantes mais aussi l'activité des métabolites dans les systèmes de défense des plantes (Schaller *et al.*, 2004). Accumulé dans les plantes blessées, il active de nombreux gènes qui codent pour des protéines ayant des propriétés antifongiques (Hopkin et Evrard, 2003). Il peut aussi être métabolisé en un composé volatil, le méthyl-jasmonate (MeJA), une molécule diffusible importante dans les communications intra et inter-plantes. Les enzymes de biosynthèse et du métabolisme de la JA pourrait avoir une fonction de régulation dans le contrôle de l'activité et de la teneur des différentes molécules de signalisation dans le développement de la plante et l'adaptation aux stress environnementaux (Schaller *et al.*, 2004). Une étude des voies de signalisation chez la tomate en réponse aux attaques des agresseurs indique que la systémine et la prosystémine, sont des composantes en amont d'une cascade de signalisation intercellulaire qui exige la biosynthèse et l'action de la JA. La localisation des enzymes de biosynthèse de la JA au sein des cellules criblées des faisceaux vasculaires, ainsi que son accumulation dans les tissus vasculaires, suggère son rôle de médiateur dans le phloème (Dinant, 2008). Pendant longtemps, l'activité de l'acide jasmonique a été liée à la défense contre les insectes phytophages (Creelman et Mullet, 1997). A présent, son implication dans la résistance contre les agents pathogènes n'est plus à démontrer (Framer *et al.*, 2003). Ce métabolite module l'ISR des plantes. Il peut également interférer avec le métabolisme de l'acide salicylique (Malek *et al.*, 2000) qui pourrait inhiber sa biosynthèse en interagissant dans sa voie de signalisation (Kim *et al.*, 2003).

L'éthylène est une phytohormone volatile impliquée non seulement dans les processus de développement de la plante tels que la maturation des fruits, la chute de feuilles, etc. (Abeles *et al.*, 1992) mais aussi dans les mécanismes de défense (Lepoivre, 2003). Il est synthétisé à partir de la méthionine. Mise à part l'ACC synthétase (acide-1-aminocyclopropane-carboxylique), sa synthèse peut être activée par des blessures, des agents pathogènes, etc. (Benhamou, 2009). En association avec la JA, l'ET intervient dans la régulation de l'ISR. Son

rôle dans la signalisation cellulaire comme inducteur de mécanisme de résistance a fait l'objet de nombreuses études et de controverses.

### **1.2.6.3. Interactions entre les voies de signalisation**

Les mécanismes de défense des plantes sont sous le contrôle d'un réseau de signalisation au sein duquel s'entrecroisent les voies du SA, du JA et du ET. Entre ces différentes voies, il existe des interactions positives ou antagonistes dont la compréhension est très complexe (Benhamou, 2009). La SA semble être le centre des voies de signalisation. Par exemple la production de FAO est stimulée par la SA au cours du métabolisme oxydatif (Blée *et al.*, 2004). Plusieurs autres études ont pu démontrer une activité antagoniste entre la SA et la biosynthèse de la JA. Spoel *et al.* (2003) ont montré que chez les plants d'*Arabidopsis* transgénique NahG qui ne sont plus capables de synthétiser la SA, la JA s'accumule massivement. De plus ces plantes n'exprimaient pas la SAR, ce qui explique bien le rôle de la SA dans la SAR. Ces mêmes auteurs ont pu montrer en 2007, que l'infection des plantes par *Pseudomonas syringae* (pathogène biotrophe) induit la médiation de la SA et rend les plantes plus sensibles à l'attaque *Alternaria brassicicola* (pathogène nécrotrophe) par la suppression de la JA. Par contre *P. syringae* pv. *tomato* (Pst), pathogène biotrophe des feuilles peut simultanément induire la synthèse de la SA et de la JA (Spoel *et al.*, 2003). Ce qui montre que les voies de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique ne sont pas toujours activées exclusivement en réponse des attaques des biotrophes ou nécrotrophes (Glazebrook, 2005).

La figure 4 ci-dessous traduit les différentes voies de signalisation et les interactions possibles lors d'une attaque de la plante par un insecte phytophage comme le puceron. Sur cette figure «les métabolites clefs de signalisation figurent en noir (SA; ET; NO: oxyde nitrique; ABA: acide abscissique; GA: acide gibbérellique; ROS: espèces réactives de l'oxygène; MeJA: ester méthylique et de l'acide jasmonique). Certains gènes de résistance (gènes R) contrôlant le déclenchement des cascades de défenses sont mentionnés en vert. Les points d'interrogation symbolisent des inconnues ou la non caractérisation d'une voie» Giordanengo *et al.*, 2007).

### 1.3. Systèmes d'adaptation des pucerons

Au cours de la coévolution<sup>8</sup> (Ehrlich et Raven, 1964) entre plantes et insectes phytophages, les plantes ont développé différents mécanismes pour se défendre. Réciproquement, les insectes se sont adaptés à ces mécanismes en développant des stratégies leur permettant d'amoindrir les effets de ces mécanismes de défenses.

#### 1.3.1. Interactions dynamiques plantes-pucerons

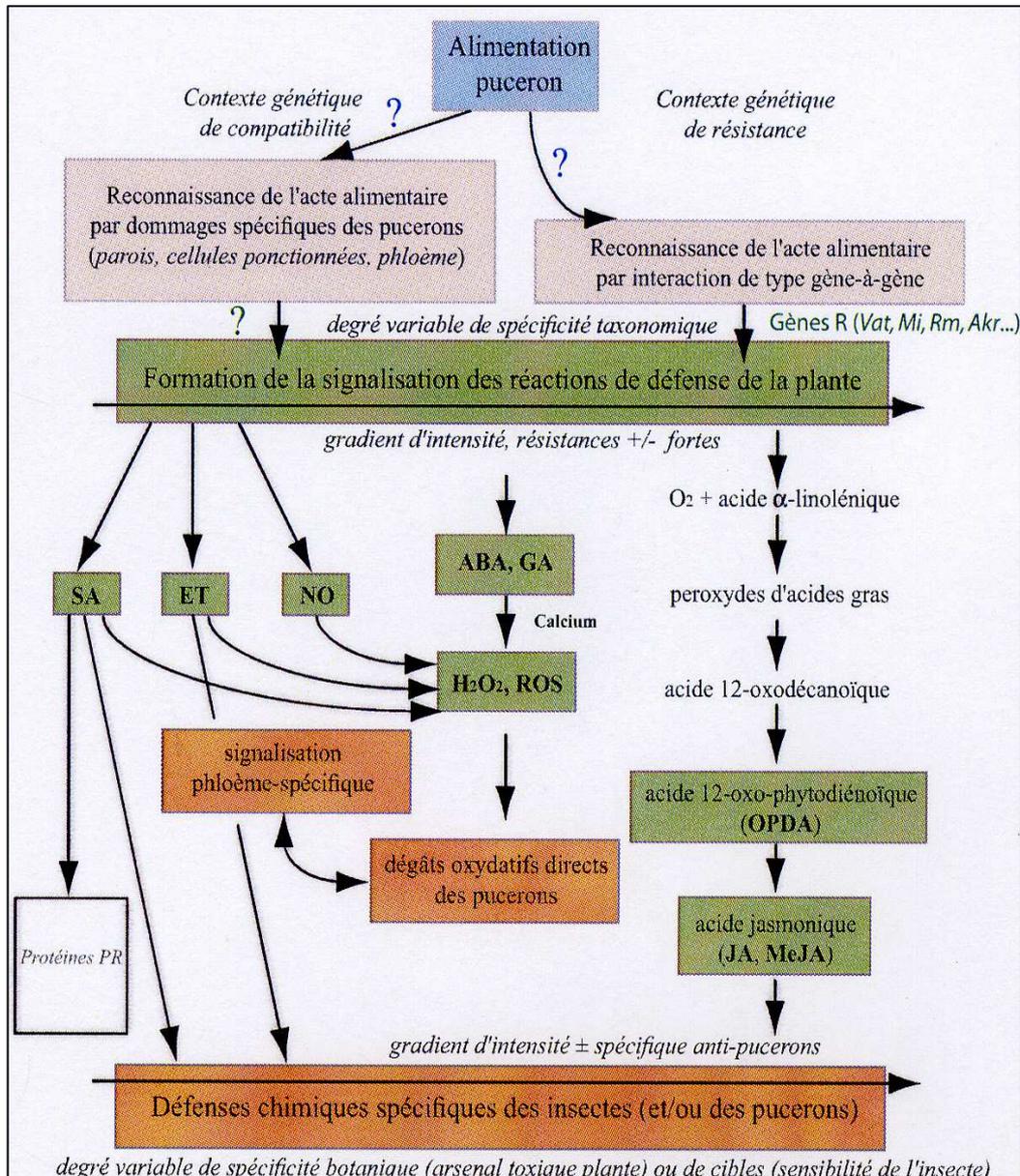
Pour accéder à la sève phloémienne, les pucerons ont développé une stratégie furtive, leur permettant d'introduire leurs stylets souples entre les cellules des plantes (Giordanengo *et al.*, 2010). Suite à ces attaques, les plantes produisent des métabolites secondaires qui déclenchent des réactions de défense par sécrétion des composés phénoliques toxiques pour les pucerons (Figure 3). Parallèlement, les pucerons manipulent le métabolisme primaire de leur plante hôte afin que la composition de la sève qu'ils ingèrent couvre mieux leurs besoins nutritionnels. Ainsi leur survie est conditionnée par leur capacité à accéder aux faisceaux phloémiques, en évitant ou en déviant les réponses de défense des plantes, et de retirer leur diète tout en gardant les cellules du phloème vivantes (Giordanengo *et al.*, 2010).

La fluidité intracellulaire, la carence en protéines, l'absence de lipides, l'abondance de sucres, le déséquilibre en acides aminés, etc. sont autant de caractéristiques de cette sève phloémienne qui conditionnent l'ensemble des adaptations métaboliques des pucerons (Giordanengo *et al.*, 2007). Ces adaptations se traduisent par la sécrétion de salive contenant des enzymes pouvant neutraliser les réactions défensives de la plante. Deux types de salives se distinguent chez les pucerons: une salive gélatineuse et une salive liquide (Figure 4). La salive gélifiante composée de protéines (peroxydases, pectinases,  $\beta$ -glucosidases), de phospholipides, etc. est sécrétée en continu et délimite un canal qui isole les stylets du puceron des cellules de la plante (Giordanengo *et al.*, 2007).

Cette salive aurait un rôle non seulement mécanique mais de barrière chimique qui limitent les flux calciques transmembranaires impliqués dans la réponse rapide des plantes à la pénétration des stylets dans les vaisseaux phloémiques. La salive liquide intervient par contre dans la détoxification des composés défensifs émis par la plante (Giordanengo *et al.*, 2007).

---

<sup>8</sup> Transformations qui se produisent au cours de l'évolution de deux espèces vivantes suite à leurs influences réciproques.

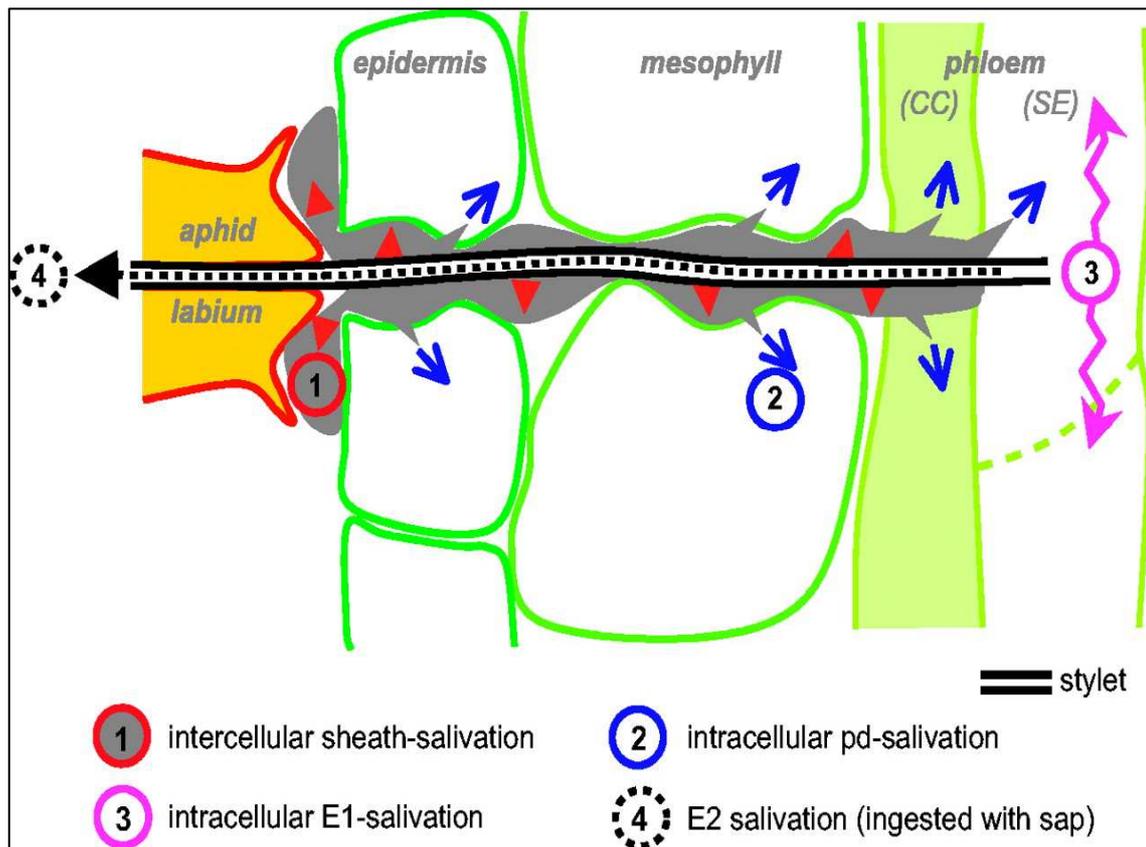


Source : D'après Smith et Boyko, 2007

Figure 3: Voies de signalisation déclenchées chez les plantes par des agressions d'insectes phloémophages tels que les pucerons

### 1.3.2. Systèmes de détoxification des pucerons

Certains insectes ont pu mettre au point des systèmes enzymatiques dont la fonction principale est la transformation des composés liposolubles en composés hydrosolubles excrétables (Nicole, 2002). Ainsi les systèmes de détoxification les mieux connus chez les insectes sont: le cytochrome P450 monooxygénase (MO), le glutathion S-transférases (GST) et le glucosinolate-myrosinase.



Source : <http://jxb.oxfordjournals.org/content/57/4/739/F4.expansion>

Figure 4: Différentes salives secrétées par les pucerons (Cercle plein: salive gélifiante extracellulaire et les cercles vides: salives liquides)

### 1.3.2.1. Cytochrome P450 monooxygénase (MO)

Le cytochrome P450 monooxygénase est une enzyme qu'on retrouve aussi bien chez les animaux que chez les plantes. Certains sont connus pour réaliser des réactions essentielles telles que la synthèse et la dégradation des hormones (ecdystéroïdes et des hormones juvéniles). D'autres interagissent avec les produits chimiques exogènes d'origine naturelle ou synthétique (Feyereisen, 2006) et constituent une composante importante dans les mécanismes de détoxification des substances xénobiotiques (Baldwin *et al.*, 2009). Le MO constitue l'une des classes les plus fonctionnelles et diversifiées des enzymes de détoxification des insectes (Li *et al.*, 2007). Il est impliqué dans la détoxification oxydative des furanocoumarines, alcaloïdes, de nombreux métabolites secondaires, etc. (Mao *et al.*, 2006).

Le MO contenant des gènes CYP4 associés à la résistance aux insecticides chez beaucoup d'insectes à pu être identifié chez *M. persicae* (Figuroa *et al.*, 2007). Une activité très élevée de ce MO a été observé chez *Sitobion avenae* sur les cultivars de blé présentant des niveaux élevés d'acides hydroxamique (Loayza-Muro *et al.*, 2000). En étudiant l'effet du transfert sur l'activité du MO de *M. persicae nicotianae* et *M. persicae S. S* du tabac au poivron, Cabrera-Brandt *et al.* (2010) ont montré qu'il n'y avait pas une différence d'activité significative du MO chez les deux sous-espèces de *Myzus* quelle que soit la plante-hôte. De plus cette activité était fortement diminuée 72 h après le transfert de la plante-hôte. Chez d'autres types d'insectes comme les larves de *Papilio multicaudatus* nourries avec des feuilles de Rutacées contenant 0,3% de xanthotoxine, aucun effet n'était détectable sur le taux de croissance et de consommation de ces larves. Mais l'analyse des excréments des larves a révélé la présence de deux métabolites: le 6-(7-hydroxy-8-methoxycoumaryl) et le 6-(7-hydroxy-8-methoxycoumaryl)-hydroxyethanol. Ce qui prouve que la xanthotoxine a été métabolisée par cette enzyme (Mao *et al.*, 2006).

### **1.3.2.2. Glutathion S-transférase (GST)**

Les glucosinolates sont des métabolites secondaires présente dans la plante et libérés lors d'une attaque d'insectes phytophages. Ils sont hydrolysés en composés actifs (isothiocyanates, thiocyanates, les indoles, nitriles, etc.) (Enayati *et al.*, 2005) sous l'action de la myrosinase lorsque les tissus de la plantes sont endommagés (Pal Vig *et al.*, 2009). Les produits d'hydrolyse les mieux étudiés des glucosinolates sont les isothiocyanates (ITC). Ils constituent un moyen de défense efficace de la plante contre les attaques d'insectes (Wittstock *et al.*, 2003). Cependant, le principe de coévolution a permis à certains insectes de s'adapter à ce système de défense des plantes.

Le glutathion S-transférase (GST) est l'une des enzymes qui intervient dans les mécanismes de détoxification des pucerons. Il catalyse la conjugaison du glutathion avec un certain nombre de composés hydrophobes. La présence des GSLs et des ITCs stimule l'activité des GSTs qui va ainsi les métaboliser en composés non toxiques pour les insectes. La grande capacité de métaboliser de nombreuses substances toxiques par leur activité, implique que la détoxification peut mener une résistance à de nombreuses molécules chimiques (Clark, 1990). Chez les pucerons l'activité enzymatique des GSTs peut varier en fonction de la plante hôte et même d'une espèce à l'autre. Cette activité augmente en fonction de la teneur en GLS de la plante hôte chez *M. persicae*. Par exemple, elle est plus élevée sur *Sinapis alba L.* que *Vicia*.

*Faba L.* et *Brassica napus L* (Francis, 2003). Cette variation d'activité des GSTs a été également confirmée par l'alimentation des pucerons avec des diètes contenant différentes substances secondaires contenues dans les Brassicaceae (sinigrin, allyl-isothiocyanates, ou benzyl-isothiocyanate) (Francis *et al.*, 2005). Une autre expérience menée chez *S. avenae* nourri avec des diètes artificielles contenant différentes concentrations de graminées a montré que l'activité de détoxification par les GSTs était fortement corrélée avec la concentration de graminée (Cai *et al.*, 2009). Une augmentation du GST chez *M. persicae* lui permet de détoxifier les glucosinolates, de les métaboliser et de les excréter par le miellat (Francis, 2003). Mais à partir d'une certaine valeur de xénobiotiques, l'activité des GSTs est limitée. A partir d'une concentration de 0,25 ppm en ITC par exemple, l'activité des GSTs reste constante et entraîne une mortalité des pucerons (Francis, 2003). Cette diminution de l'activité des GSTs a été également observée chez *M. persicae nicotianae* et *M. persicae S.S* 72 h après qu'ils soient transférés du tabac au poivron (Cabrera-Brandt *et al.*, 2010).

### **1.3.2.3. Glucosinolate-myrosinase**

Le glucosinolate-myrosinase est un autre système de détoxification rencontré chez les pucerons. Il s'observe généralement chez les espèces de pucerons inféodées au Brassicaceae comme *Brevicoryne brassicae L.* Contrairement à *M. persicae* qui induit l'activité des GSTs, cette espèce métabolise plutôt les GSLs. En plus de cette métabolisation, elle a développé tout comme sa plante hôte le système glucosinolate-myrosinase pour échapper à ses prédateurs (Francis, 2003). En effet, elle détourne les défenses des plantes en stockant les composés toxiques. Lorsqu'elle subit des attaques de prédateurs, ces molécules entrent en contact avec la myrosinase qu'elle synthétise, et sont dégradées en isothiocyanates toxiques pour son prédateur *Adalia bipunctata* (Francis, 2003).

## II. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Matériel biologique

Les fèves (*Vicia fabae* L.) sont semées dans un mélange de perlite et de vermiculite (v : v ; 50 : 50) contenu dans des pots en polystyrène (8 X 8 X 9 cm). Ces pots sont disposés par lot de six dans un bac en plastique (30 X 20 X 6 cm). Un arrosage à intervalle régulier est effectué pour permettre le développement des plants.

Le puceron *M. persicae* est élevé sur les plants de fève. La souche utilisée provient de l'université catholique Louvain la Neuve. Les fèves sont infestées dès l'apparition des premières feuilles. Le bac contenant les pots de plants est introduit dans une cage en tulle pour empêcher la dissémination des pucerons. Ce dispositif est placé dans un phytotron (Snyders Scientific) sous une photopériode de 16/8 grâce à des tubes néons de 40 Watts. La température du phytotron est de  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  et l'humidité relative (HR) de 60%. Ce sont les conditions idéales pour le développement de *M. persicae*. Le dispositif est renouvelé chaque semaine afin de maintenir l'élevage des pucerons.

Pour la culture des plants d'*A. thaliana* (Ecotype Columbia), les semences sont placées en serre dans des pots contenant du terreau (Potgrond terreau). Les jeunes pousses d'environ 2 semaines sont repiquées individuellement dans de nouveaux pots (6 X 6 X 7cm) contenant le même terreau. Pour éviter une éventuelle infestation avant le début de l'expérience, les plants sont déposés dans des bacs en plastique recouverts d'un couvercle transparent permettant ainsi le passage de la lumière. Ils sont ensuite maintenus sous une photopériode de 16/8 à une température de  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  avec une HR de 60 %. Un arrosage régulier est réalisé avec une solution nutritive (Flora Series) dont le rapport azote (N) phosphate (P) potassium (K) est de 5:0:2. Cette solution permet le développement des feuilles. Les plants sont utilisés après 4 semaines environ depuis la mise en serre. Des plants d'*A. thaliana* en culture hydroponique provenant du Centre de Recherche Agricole de la Région Wallonne (CRA-W) ont été utilisés également.

Les plants de pommes de terre (*Solanum tuberosum* L.) utilisés pour nos expériences sont cultivés à une température de  $25^{\circ}\text{C} \pm 3$  avec une photopériode de 16/8 fournie par 21 lampes de 36 W chacune et 6 lampes de 58 W. Les semences de pomme de terre (variété bintje) sont semées dans des pots de 15 cm de diamètre et 12 cm de hauteur contenant du terreau. Un tubercule est semé par pot. Les tests sont réalisés sur les plants d'environ deux semaines.

Le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* est responsable de la pourriture grise sur de nombreuses cultures. Il nous a été approvisionné par le service de bioindustrie de la Faculté de Gembloux Agro-Bio-Tech sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) en boîte de Pétri. Pour maintenir la culture, il est repiqué après 21 jours sur un nouveau milieu PDA tout en prenant soin de mettre le mycélium en contact avec le milieu. Le repiquage est réalisé en conditions stériles sous hotte. Pour préparer la solution conidienne, les spores d'une culture âgée d'un minimum de deux semaines sont mises en suspension avec 10 ml d'une solution de PDB (Potato Dextrose Broth) à l'aide d'une anse en plastique. La solution conidienne ainsi obtenue est filtrée sur de la gaze stérile afin d'éliminer le mycélium. Le dénombrement des spores présents dans la suspension conidienne est réalisé à l'aide d'une cellule de Bürker afin d'ajuster la concentration de suspension à  $6 \text{ à } 7.10^5$  spores  $\text{ml}^{-1}$ .

## 2.2. Méthodes expérimentales

### 2.2.1. Etude croisée *B. cinerea* et *M. persicae* sur *A. thaliana*

#### 2.2.1.1. Infection de *B. cinerea* suivie d'une infestation de *M. persicae*

Pour cette expérience, nous considérons un lot de 16 plants (8 traités, 8 témoins). Les plants traités sont infectés avec une suspension de  $6.10^5$  spores  $\text{ml}^{-1}$ . Sur chaque plant, la moitié des feuilles est inoculée avec une goutte de  $5\mu\text{l}$  de la suspension de spores par feuille. Cinq (5) jours après l'inoculation avec le champignon, les deux lots de plants (traités et témoins) sont infestés avec *M. persicae*. Les pucerons adultes sont transférés des plants de fève sur les plants d'*A. thaliana* à l'aide d'un pinceau à raison de 5 pucerons/plant. Dès le lendemain, le nombre total d'individus est dénombré quotidiennement sur chaque plant. Le nombre de nymphes est également compté chaque jour. Ces observations ont été réalisées pendant cinq jours et ont permis d'évaluer l'effet d'une infection préalable de *B. cinerea* sur les paramètres biologiques (fécondité et taux de croissance relatif) de *M. persicae*. Le taux de croissance relatif (TCR) est calculé à partir de la formule suivante : 
$$TCR = \frac{\ln N2 - \ln N1}{T2 - T1}$$
 (Zehnder and Hunter, 2008).

$\ln N2$  est le logarithme népérien de la population finale,  $\ln N1$  celui de la population initiale et  $(T2 - T1)$  la durée de l'expérience.

### **2.2.1.2. Infestation de *M. persicae* suivie d'une infection de *B. cinerea***

Pour cette expérience, nous considérons un lot de 12 plants (6 traités, 6 témoins). Les plants traités sont infestés par *M. persicae* à raison de 10 pucerons par plant. 3 jours après infestation, les deux lots de plants sont infectés par *B. cinerea*. Sur chaque plant, la moitié des feuilles (4 à 5 feuilles) est inoculée avec la suspension de spores. Les feuilles sont inoculées chacune avec 5µl de  $7.10^5$  spores ml<sup>-1</sup>. Le taux d'infection est quantifié en dénombrant les lésions s'étendant de manière significativement plus large que la surface correspondant à la goutte de dépôt par rapport au nombre total des points inoculés (Adam, 2008). Mais dans le cas où un plant est entièrement attaqué par le champignon, le nombre de feuilles inoculées sera considéré comme étant infecté à 100%. Les observations sont faites au terme du septième jour après l'infection par le champignon.

### **2.2.2. Etude croisée *B. cinerea* et *M. persicae* sur *S. tuberosum***

#### **2.2.2.1. Infection de *B. cinerea* suivie d'une infestation de *M. persicae***

Un lot de 12 plants est considéré pour cette expérience (6 traités, 6 témoins). Les plants traités sont infectés par *B. cinerea* suivant la méthode utilisée avec les plants d'*A. thaliana*. La concentration en spores de la suspension de champignon utilisée est de  $7.10^5$  spores ml<sup>-1</sup>. Les plants sont infestés avec *M. Persicae* à raison de 5 pucerons/plant 5 jours après infection. Les différents paramètres biologiques ont été évalués selon la méthode décrite dans la section 2.2.1.1.

#### **2.2.2.2. Infestation de *M. persicae* suivie d'une infection de *B. cinerea***

Pour cette expérience, nous considérons un lot de 6 plants (3 traité, 3 témoins). Les plants de *S. tuberosum* traités sont infestés par *M. persicae*. 3 jours après l'infestation, les deux lots de plants sont infectés par *B. cinerea*. 2 à (3) gouttes sont inoculées de manière distante (2 à 3cm) l'une de l'autre par feuille. Ensuite le pourcentage de nécroses est évalué après sept (7) jours.

### **2.2.3. Effet de l'acide salicylique (SA) et jasmonique (JA) sur les paramètres biologiques de *M. persicae* et le développement de *B. cinerea***

#### **2.2.3.1. Traitement des plants d'*A. thaliana* et de *S. tuberosum***

L'application foliaire de SA et de JA sur les plants d'*A. thaliana* et *S. tuberosum* a pour objectif la mise en place d'une résistance induite préalable a une infestation de *M. persicae* et/ou une infection de *B. cinerea*. Les solutions sont préparées en dissolvant la SA et le JA dans de l'eau et l'éthanol respectivement afin d'obtenir une concentration de 2 millimolaire (mM).

##### **2.2.3.1.1. Effet de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique sur *M. persicae***

Pour cette expérience, nous considérons 12 plants (6 traités et 6 témoins) par traitement (SA/JA) et par espèce (*A. thaliana*/ *S. tuberosum*). Ces plants sont traités avec 3ml de solution 2 mM de SA et de JA à l'aide d'un micro pulvérisateur.

Après 3 jours d'incubation les plants sont infestés par transfert de pucerons adultes des fèves sur les plants à raison de 5 pucerons/plant. Les observations sont réalisées dès le lendemain de l'infestation pendant 5 jours. A chaque observation, le nombre total d'individus ainsi que le nombre de nymphe est dénombré par plant. Les paramètres biologiques sont ainsi évalués par la méthode décrite dans la section 2.2.1.1.

##### **2.2.3.1.2. Effet de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique sur *B. cinerea***

Un lot de 12 plants d'*A. thaliana* (6 témoins et 6 traités) par traitement sont considérés pour cette expérience. Ces plants sont traités avec 3 ml de solution 2 mM de SA et de JA. Trois jours après traitement, tous les plants (témoins et traités) sont infectés par le *B. cinerea*. Sur les plants d'*A. thaliana*, la moitié des feuilles de chaque plant est inoculée avec une goutte de  $5\mu\text{l}$  de  $6.10^5$  spores  $\text{ml}^{-1}$  de la suspension conidienne.

#### 2.2.4. Mise en évidence de l'effet inducteur de mécanismes de défense de la surfactine sur *A. thaliana* contre *M. persicae*

Cette expérience est réalisée avec des plants d'*A. thaliana* en culture hydroponique. Les plants sont contenus dans des bacs aroponics en plastique contenant 850 ml de solution nutritive. Deux lots de 6 plants par bac sont traités chacune avec une solution de surfactine de 0,5 mM. Dans cette expérience les plants sont traités via les racines. Pour éviter toute contamination par les pucerons, les plants sont mis dans des bacs plus grands et protégés par un couvercle transparent qui permet le passage de la lumière. Après 5 jours d'incubation, les plants traités et témoins sont infestés par transfert des pucerons (*M. persicae*) des fèves sur les plants de *A. thaliana*. Chaque plant est infesté avec 5 pucerons. Le nombre total d'individus et celui des nymphes est dénombré quotidiennement pendant 5 jours afin d'évaluer les paramètres biologiques de *M. persicae*.



Figure 5: Exemple de plants d'*A. thaliana* en culture hydroponique dans des bacs aroponics

## **2.2.5. Evolution du pH extracellulaire : effet de la salive de *M. persicae* sur une suspension cellulaire d'*A. thaliana***

### **2.2.5.1. Suspensions cellulaires d'*A. thaliana***

Les cellules d'*Arabidopsis* sont fournies par l'Université Catholique de Louvain la Neuve (UCL) dans un milieu nutritif nécessaire à leur développement. Elles sont repiquées chaque semaine en condition stérile dans un nouveau milieu de culture dont le pH est ajusté à 5,7 avec du KOH. Pour le repiquage, 5 ml de suspension cellulaire sont ensemencées dans 45 ml de milieu contenus dans des erlenmeyers de 250 ml. Ces derniers sont recouverts avec du papier aluminium pour éviter l'effet de la lumière sur les cellules. Ensuite, elles sont mises en agitation permanente à 110 RPM sur 360° (Multi-Shaker PSU 20) à une température de 23±2°C. La composition du milieu de culture des cellules est présentée en annexe.

### **2.2.5.2. Collecte de la salive de *M. persicae***

La salive de *M. persicae* est récoltée à l'aide d'un système de diètes artificielles constitué à partir des tubes PVC de 3 cm de hauteur et 4 cm de diamètre. L'une des faces des tubes est couverte d'un carré de Parafilm™ étiré afin de permettre la pénétration du stylet des pucerons. La diète est préalablement préparée et conservée à – 20°C. Elle est composée de 15% (w/v) de sucrose. Un volume de 400µl de cette diète est déposé sur le Parafilm™ à l'aide d'une micropipette. La diète est ensuite recouverte délicatement avec un second carré de Parafilm™ étiré. Les pucerons sont transférés des plants de fèves dans les tubes contenant les diètes à raison de 50 pucerons par tube. Afin d'avoir la quantité de salive nécessaire pour le traitement des cellules, dix diètes ont été réalisées. Les diètes contenant les pucerons sont déposés dans un bac en plastique puis placés dans un phytotron correspondant aux conditions d'élevage de *M. persicae*.

Après 48 h, les diètes sont récupérées à l'aide de la micropipette et placées dans un tube de falcon de 15 ml. Ainsi la diète peut être utilisée immédiatement pour les mesures ou congelée dans un surgélateur à –20°C.

### **2.2.5.3. Mesure du pH extracellulaire et des diètes artificielles**

La suspension de cellules utilisée pour les mesures de pH est âgée d'un minimum de 5 jours comptés à partir de la date de repiquage. L'évolution du pH extracellulaire est mesuré à l'aide

d'une sonde pH (pH 3310, WTW GmbH). Le pH mètre est préalablement calibré avec deux solutions tampon de pH 7 et 4,01. Les mesures sont effectuées dans de petits tubes en verre entourés d'un papier d'aluminium pour empêcher une exposition des cellules à la lumière. La sonde du pH mètre est introduite dans le tube placé de manière à être agité en permanence à 110 RPM, même pendant la mesure.

Pour chaque mesure du pH des cellules, 10 ml de suspension cellulaire sont utilisés. Cette quantité est prélevée à l'aide d'une pipette stérile et déposée délicatement au fond du tube sous flux laminaire. Avant d'effectuer les mesures, les cellules sont mises au repos en agitation pendant une heure environ pour éviter l'effet du stress. Les mesures effectuées sont les suivantes:

- ❖ pH de la diète seule
- ❖ pH de la diète plus salive
- ❖ pH des cellules d'*A. thaliana* seules
- ❖ pH des cellules d'*A. thaliana* plus diète seule
- ❖ pH des cellules d'*A. thaliana* plus diète contenant la salive
- ❖ pH des cellules d'*A. thaliana* plus surfactine

Après chaque mesure, l'électrode du pH mètre est rincée avec de l'eau distillée. Mis à part le pH de la diète seule et la diète plus salive qui ont été mesurés en une seule prise, les autres mesures de pH sont faites de façon continue toutes les 30 secondes pendant 60 minutes.

### **2.2.6. Approche protéomique**

Dans cette approche, on envisage d'étudier les protéomes des cellules d'*A. thaliana* élicitées avec la diète sans salive ainsi que les cellules élicitées avec la diète contenant la salive de *M. persicae*. Les deux protéomes sont comparés grâce à la technique du 2D-DIGE (2-Dimensional Differential in-Gel Electrophoresis). C'est une méthode qui permet l'étude des variations d'abondances relatives de chaque protéine et ce, simultanément sur des centaines de protéines. Le principe de cette technique est basé sur le marquage des échantillons par des sondes fluorescentes (CyDyes™). Ces marqueurs fluorescents sont au nombre de trois: Cy2™, Cy3™, Cy5™ (Amersham Biosciences) et sont spectralement discernables. Ils donnent la possibilité de marquer deux extraits protéiques avec des sondes différentes et de les charger sur un même gel. La variabilité entre les gels est donc éliminée. Sur chaque gel, on ajoute également un standard interne (constitué d'un mélange d'une quantité égale en protéines de chaque échantillon), ce qui permet une normalisation des données et aura pour

conséquence de permettre des comparaisons inter-gels fiables et de pouvoir effectuer une analyse statistique rigoureuse.

### **2.2.6.1. Extraction des protéines au phénol**

Vingt (20) ml de cellules d'*A. thaliana* élicitées par la diète seule ainsi que 20 ml de cellules élicitées par la diète contenant la salive de *M. persicae* sont centrifugées pour éliminer le surnageant. Les culots sont recueillis dans des falcons de 50 ml dans lesquelles sont ajoutés 2,5 X en volume de tampon d'extraction. Le mélange est vortexé et agité à 4°C pendant 10 min. 2,5 X en volume de phénol saturé en tris sont ajoutés et le mélange est vortexé puis agité pendant 10 mn à température ambiante et centrifugé à 5000 g pendant 20 min à 4°C. La phase supérieure contenant du phénol est placée dans un nouveau falcon de 50 ml et un équivalent de tampon d'extraction y est ajouté. Le mélange est vortexé et agité pendant 10 mn à température ambiante. Cette étape est répétée une fois. Après la dernière extraction les protéines sont précipitées par ajout d'un équivalent de méthanol et incubées à -80°C toute la nuit.

Les échantillons sont ensuite centrifugés à 5000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est écarté et le culot est lavé avec un équivalent de méthanol. Cette étape est répétée une seconde fois et le surnageant est écarté sans toucher le culot. Ce dernier est ensuite lavé avec 5 ml d'acétone (80 %) et centrifugé à 5000 g pendant 5 min à 4°C. Au second lavage les solutions sont séparées dans des eppendorfs de 2 ml. 100 µl de tampon UT-tris sont ajoutés dans chaque eppendorf afin de réhydrater les culots protéiques et les échantillons sont mis à agiter pendant 3 heures puis conservés à -20°C.

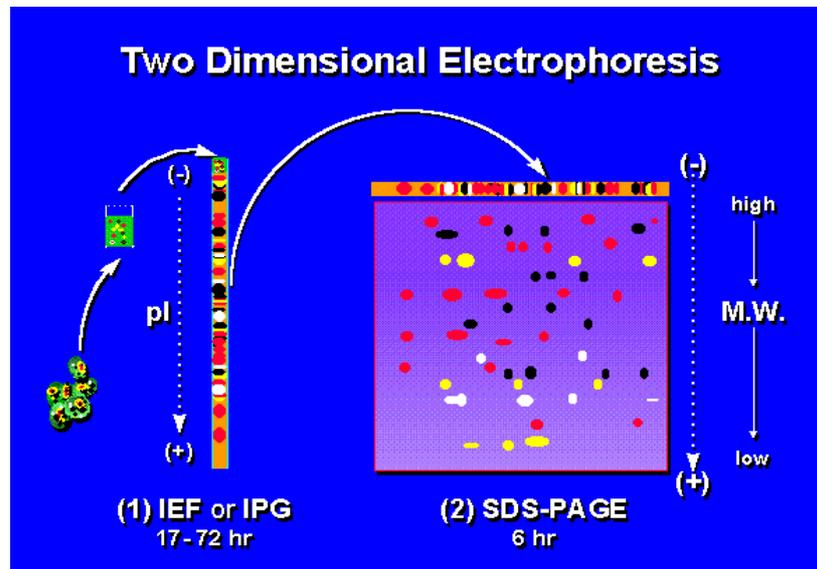
### **2.2.6.2. Quantification et marquages des protéines aux CyDyes™**

La quantification est effectuée au moyen du kit RC/DC Protein Assay (Bio-Rad) en utilisant comme étalon 4 solutions de sérum bovine albumine (BSA) ayant des concentrations de 0,2 à 1,5 mg/ml. Une fois la quantification réalisée, l'absorbance des échantillons est mesurée à 750 nm après 15 mn d'incubation.

Pour marquer des protéines, nous avons utilisé des solutions stock de CyDye™ diluées à une concentration de 100 pmol/µl et conservées à -80°C. La concentration de tous les échantillons protéiques est portée à 5 µg/µl. 12,5 µg d'échantillons sont marqués par 1 µl de CyDye™ pendant 30 minutes à l'obscurité. Ensuite 1 µl de lysine 10 mM est ajouté pour stopper la réaction. Cette étape dure également 30 minutes à l'obscurité

### 2.2.6.3. Electrophorèse bidimensionnelle (2D-E)

Après dosage et marquage, les protéines sont séparées par l'électrophorèse bidimensionnelle (2D-E) afin de permettre leur identification. Son principe consiste à effectuer dans un premier temps, une séparation des protéines en fonction de leur charge grâce à l'isoélectrofocalisation (IEF), puis dans un second temps, une séparation selon leur poids moléculaire.



Source : [http://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein\\_Separations-\\_Electrophoresis/Two\\_Dimensional\\_Polyacrylamide\\_Gel\\_Electrophoresis%282D-PAGE%29](http://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein_Separations-_Electrophoresis/Two_Dimensional_Polyacrylamide_Gel_Electrophoresis%282D-PAGE%29)

Figure 6: Schémas récapitulatif du principe d'électrophorèse 2D

#### 2.2.6.3.1. Préparation des échantillons

Les 3 échantillons de chaque gel sont réunis par groupe de deux dans des eppendorfs de 0,5 ml. Après 20 min à l'obscurité en présence de 10% DDT (dithiothreitol) et d'IPG buffer 2%, le volume des échantillons est porté à 440  $\mu$ l avec du tampon de réhydratation (Urée thiourée) coloré avec une goutte de bleu de bromophénol.

#### 2.2.6.3.2. Séparation des protéines par focalisation isoélectrique

Le principe de cette focalisation est basé sur la création d'un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les protéines soumises à un champ électrique. Sous l'effet de ce gradient de pH, chaque protéine migre à travers le gradient jusqu'à atteindre son point isoélectrique<sup>9</sup> (Ip) où elle s'immobilise. Les protéines pourront ainsi être séparées. Cette séparation des protéines s'effectue sur un gel de polyacrylamide fixé sur une bandelette plastique (IPG-strip)

<sup>9</sup> Le point isoélectrique d'une protéine est le pH auquel la charge globale de la protéine est nulle.

Des papiers Whatman découpé de façon à ce qu'ils occupent la largeur de l'électrode sont imbibés du tampon IEF et placés sur les électrodes du plateau. Leur rôle est de capter les sels des échantillons qui pourraient empêcher la migration des protéines. Chaque échantillon est reparti tout au long d'une rainure du plateau. Les strips (Immobiline<sup>TM</sup> DryStrip pH 3-11) préalablement stockés à - 20°C sont déposés individuellement dans les échantillons de manière à ce que le côté gel soit en contact avec l'échantillon tout en évitant d'emprisonner des bulles d'air. Les strips sont ensuite recouverts d'huile minérale (cover fluid for IEF) pour empêcher leur dessèchement. Le programme de voltage appliqué pour la focalisation isoélectrique est décrit dans le tableau I.

Tableau I : Programme de focalisation électrique

Phase	Voltage	Durée
Réhydratation passive	0 V	9 h
Dessalage	200 V	2 h monté rapide
	200 V -> 1000 V	4 h montée linéaire
	1000 V -> 10000 V	1 h montée linéaire
Focalisation	10000 V	5 h 30

#### 2.2.6.4.3. Seconde dimension

Elle consiste à séparer les protéines selon leur poids moléculaire sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes perpendiculairement à l'IEF.

##### a. Equilibration des strips

Après la séparation des protéines suivant leur pI, les strips sont rincés à l'eau distillée et disposés dans le strip holder. Ils sont ensuite submergés d'une solution de DTT et mis à agiter pendant 15mn à l'obscurité. Cette première étape consiste à réduire les protéines en rompant les ponts disulfures grâce au DTT. Après cette première étape les strips sont rincés à l'eau distillée et subissent une alkylation dans une solution d'iodoacétamide (IAA). Elle empêche la reformation des ponts disulfures et dure également 15mn. La composition de ces solutions est présentée dans le tableau II.

Tableau II: Solutions d'équilibration des strips

Constituant	Solution de DTT	Solution d'IAA
Urée (g)	7,2	7,2
DTT (mg)	200	*
IAA (mg)	*	500
Tampon d'équilibration (ml)	20	20
Volume total (ml)	25	25

### ***b. Séparation des protéines selon leur poids moléculaire***

Pour la séparation des protéines selon leur poids moléculaire, nous avons utilisé le HPE-FlatTop Tower (Gelcompany). Cet appareil est constitué d'un système de plaques sur lesquelles les gels sont déposés afin de poursuivre la séparation via la 2<sup>ème</sup> dimension. Ces plaques sont disposées horizontalement. L'appareil est relié à un second dispositif qui régule la température (15°C) et évite la condensation de l'eau à la surface des gels lors de la migration des protéines. Avec ce type d'appareil, on utilise des gels préfabriqués (2D-large-Gel flatbed NF 12,5%) (Gelcompany). Ces gels sont conservés au frigo avant leur utilisation. Avant de déposer les gels sur les plaques, un tampon de refroidissement est appliqué au centre de la plaque. Le gel est ensuite déposé délicatement sur la plaque côté gel vers le haut de manière à ne pas emprisonner des bulles d'air. Des mèches préalablement imbibées séparément avec des tampons d'électrodes (anode et cathode) sont placés à 2 mm des bords du gel dans le sens la migration des protéines. Ensuite chaque strip est placé sur la fente du gel côté gel vers le bas. Après que les gels soient recouverts, on connecte les électrodes et l'appareil est mis en marche. L'appareil est stoppé après 1 h 10 min pour enlever les strips. Ensuite, il est redémarré et les voltages des différentes phases de migration sont réglés. Le programme de voltage est décrit dans le tableau III.

Tableau III: Programme de fonctionnement du HPE- FlatTop Tower pour 4 gels

Phases	Voltage (V)	Ampère (mA)	Puissance (W)	Temps
S1	100	28	4	30 mn
S2	200	52	12	30 mn
S3	300	80	20	10 mn
S4	1500	160	120	3 h 50 mn

Après migration des protéines, les gels sont immergés dans une solution de fixation des protéines. Cette fixation dure au minimum 1 h. La composition de la solution de fixation est décrite dans le tableau IV.

Tableau IV: Composition de la solution de fixation des gels

Réactif	Concentration	Quantité pour 1l
Méthanol	40 % v/v	400 ml
Acide acétique	10% v/v	100 ml
Eau distillée	50% v/v	500 ml

#### 2.2.6.4. Révélation des spots protéiques

Après séparation et la fixation des protéines, les gels sont scannés grâce au Typhoon 9100 (GE Healthcare) relié à un ordinateur qui permet d'effectuer différents réglages. Il est constitué d'un système de lasers qui excite différemment les CyDyes<sup>TM</sup> à des longueurs d'onde d'émission et d'excitation différentes (Tableau V). Afin d'éviter la saturation des spots protéiques, les voltages PMT (Photo Multiplier Tubes) sont réglés tout en maximisant leur intensité.

Tableau V: Caractéristiques des fluorphores

CyDyes <sup>TM</sup>	Filtre d'excitation	Filtre d'émission	Laser	Voltage
Cy2	480/30 (nm)	530/40 (nm)	Bleu 488	665 V
Cy3	540/25 (nm)	595/25 (nm)	Vert 532	660 V
Cy5	635/30 (nm)	680/30 (nm)	Rouge 633	660 V

#### 2.2.7. Analyses statistiques

Les données relatives à l'étude des paramètres biologiques de *M. persicae* et du développement nécrotique de *B. cinerea* sont analysées par le logiciel MINITAB. 16. Par le biais de ce logiciel le test t pour la comparaison de deux moyennes, le test non paramétrique (Kruska wallis) et test de Khi2 ont été effectués. Le test t est utilisé pour la comparaison des moyennes de la population ainsi que la fécondité des pucerons en fonction des traitements. La comparaison entre les différents traitements est réalisée par le test non paramétrique. Pour comparer le taux d'infection de *B. cinerea*, le test de Khi2 a été effectué. Ces tests sont réalisés à 95% de confiance.

Pour l'analyse et picking des spots protéiques, les images obtenues après scannage sont analysées grâce au programme Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics). Ce programme permet l'analyse des spots protéiques qui se sont exprimées de manière différente statistiquement entre les cellules élicitées avec la salive de *M. persicae* et celles élicitées avec de la diète seule. Ainsi les protéines présentant un intérêt quelconque seront identifiées ultérieurement.

La mise en œuvre de cette méthodologie a permis d'aboutir à un certain nombre de résultats concluants.

### III. RESULTATS

#### 3.1. Etude croisée *B. cinerea* et *M. persicae* sur *A. thaliana*

##### 3.1.1. Effet d'une infection de *B. cinerea* sur les paramètres biologiques de *M. persicae*

Les résultats de cette expérience sont présentés aux figures 7 et 8. La figure 7 traduit la dynamique de la population de *M. persicae* en fonction du temps. Sur cette figure on observe que la population de pucerons a augmenté dès le lendemain de l'infestation des plants sur les deux traitements (témoin et traité). Cependant, l'accroissement de la population est plus rapide sur les plants témoins que sur les plants traités. De plus sur les plants traités, on observe un ralentissement de la croissance après le quatrième jour. Le taux de croissance relatif est de 0,18 pour les plants traités tandis qu'il est de 0,31 pour les plants témoins. A la fin des observations, 25 individus par plant en moyenne sont comptés sur les témoins contre 13 individus par plant en moyenne sur les traités. Le test t pour la comparaison de deux moyennes montre qu'il y a une différence hautement significative entre les plants témoins et les plants traités ( $t = 4,12$ ;  $dl = 68$ ;  $P < 0,001$ ).

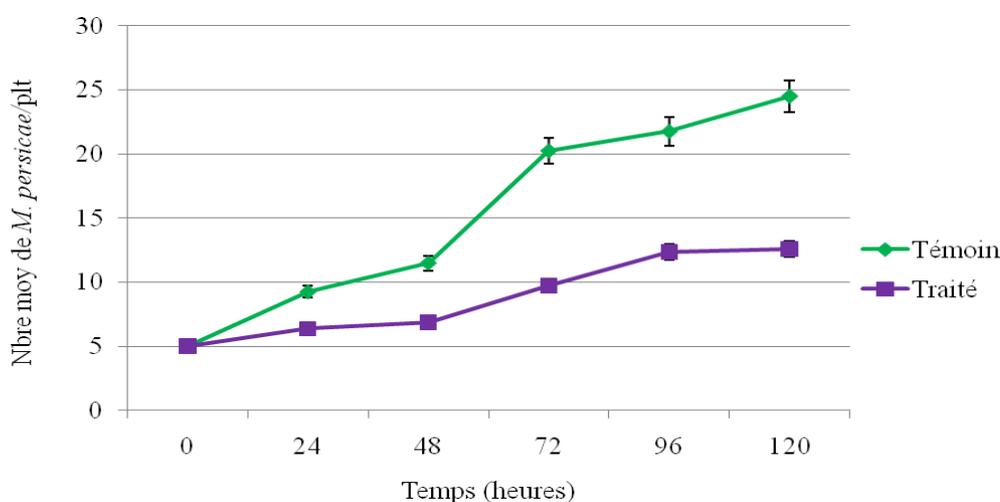


Figure 7: Dynamique de population de *M. persicae* après infection de *B. cinerea* sur *A. thaliana*

Pour évaluer la fécondité de *M. persicae* le nombre moyen de nymphe par plant est dénombré à chaque observation. Les résultats obtenus au terme des 5 jours d'observation sont représentés par la figure 8. Sur cette dernière, on remarque que la fécondité à chaque observation est environ deux fois plus élevée sur le témoin que sur le traité. A la fin des

observations, 15 nymphes en moyenne ont été dénombrées par plant témoin et 7 nymphes en moyenne par plant traité. La comparaison de moyenne (test t) entre le témoin et le traité montre également qu'il y a une différence hautement significative ( $t = 4,19$  ;  $dl = 67$  ;  $p < 0,001$ ).

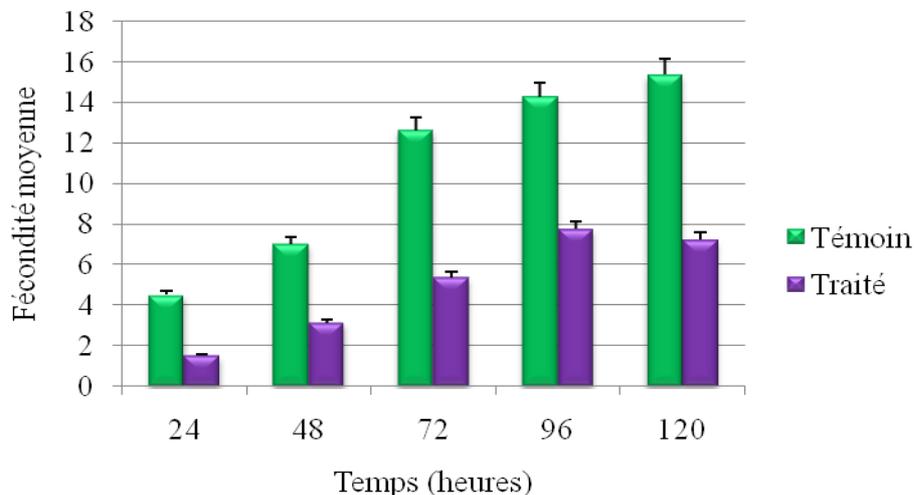


Figure 8: Fécondité de *M. persicae* après infection de *B. cinerea* sur *A. thaliana*

### 3.1.2. Effet d'une infestation de *M. persicae* sur le développement de *B. cinerea*

Après une semaine d'infection, le nombre de feuilles présentant une nécrose développée de manière significative (NcrDvlpSg) ou non (NcrNnDvlp) est compté.

Les résultats obtenus sont traduits en pourcentage de nécrose et présentés par la figure 10. Sur cette dernière on remarque que le pourcentage de feuilles nécrosées de manière significative est plus élevé sur les plants traités (47,43%) que sur les plants témoins (40,47%).



Figure 9: Développement nécrotique de *B. cinerea* sur *A. thaliana* (a = nécrose développée de manière significative, b = nécrose non développée).

Le test du  $\chi^2$  montre qu'il n'y a pas de différence significative entre le témoin et le traité ( $\chi^2 = 0,310$  ;  $df = 1$  ;  $P > 0,05$ )

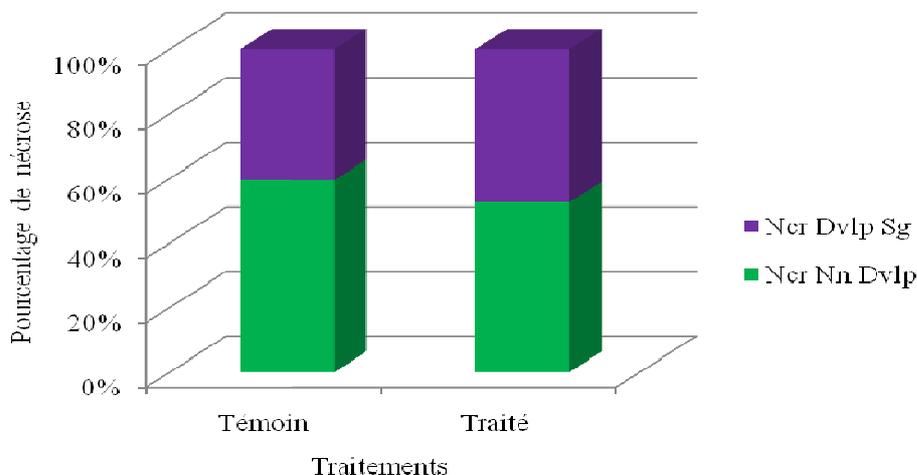


Figure 10: Pourcentage de feuilles nécrosées après infestation de *M. persicae* sur *A. thaliana*

### 3.1.3 Effet de l'acide salicylique sur les paramètres biologiques de *M. persicae*

Au terme de 5 jours d'observations les résultats de cette expérience sont résumés par les figures, 11 et 12. La figure 11 montre l'évolution de la population des pucerons en fonction du temps. Sur cette dernière on constate que la population de pucerons a augmentée dès 24 h après infestation. Cette croissance est plus rapide sur les plants témoins que sur les plants traités avec un taux de croissance de 0,29 sur le témoin et 0,20 sur le traité. A la fin de l'expérience, le nombre moyen d'individus par plant est de 14 et 22 sur les plants traités et les plants témoins.

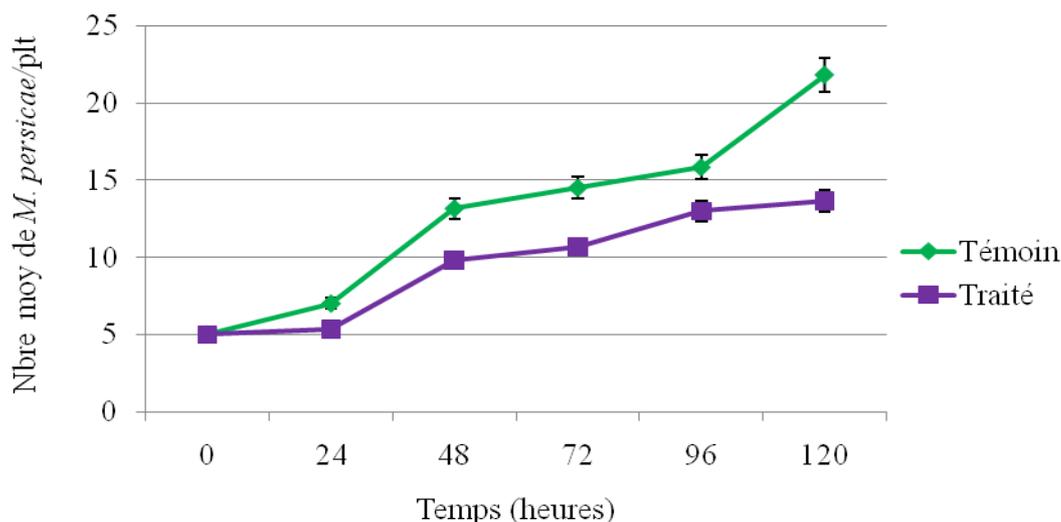


Figure 11: Dynamique de population de *M. persicae* après traitement avec l'acide salicylique sur *A. thaliana*

L'analyse statistique (test t) donne le résultat suivant : ( $t = 1,91$  ;  $dl = 57$  ;  $P = 0,061$ ). Ce résultat montre que statistiquement il n'y a pas de différence significative pour la population de puceron entre les plants témoins et les plants traités.

La figure 12 exprime la fécondité moyenne de *M. persicae* obtenue à chaque observation. 24 h après l'infestation, on remarque que la fécondité moyenne des pucerons sur les plants témoins est deux fois plus élevée que celle obtenue sur les plants traités. A 48 h, elle ne diffère presque pas pour les deux traitements. Ensuite, elle augmente très lentement chez les individus traités pour atteindre 8 nymphes en moyenne par plant à la fin de l'expérience. Par contre sur les plants témoins elle augmente plus rapidement et celle ci atteint 13 nymphes en moyenne par plant à la fin de l'expérience.

Le test t montre également qu'il n'a pas de différence entre le témoin et le traité ( $t = 1,82$  ;  $dl = 55$  ;  $P = 0,075$ ).

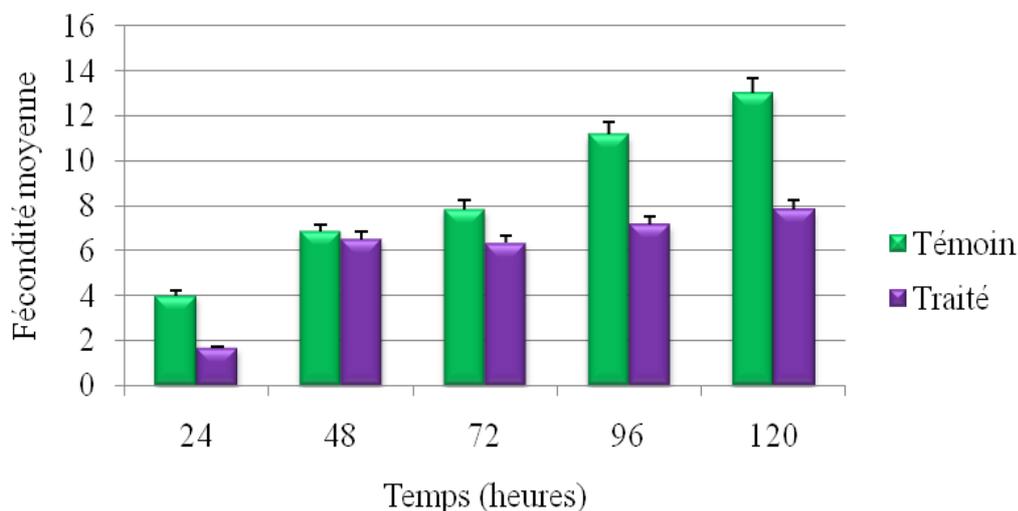


Figure 12: Fécondité de *M. persicae* après traitement avec l'acide salicylique sur *A. thaliana*

### 3.1.4. Effet de l'acide salicylique sur développement de *B. cinerea*

La quantification des nécroses sur les feuilles est faite 7 jours après l'inoculation du champignon. Les résultats obtenus au terme de cette expérience sont présentés par la figure 13. Le pourcentage de feuilles nécrosées de manière significative représente 60% des feuilles infectées sur les plants témoins. Ce pourcentage est légèrement supérieur à celui obtenu sur les plants traités qui est de 55%. Mais le test du  $\chi^2$  montre qu'il n'y a pas de différence significative ( $\chi^2 = 0,024$  ;  $dl = 1$  ;  $p = 0,877$ ) entre le témoin et le traité.

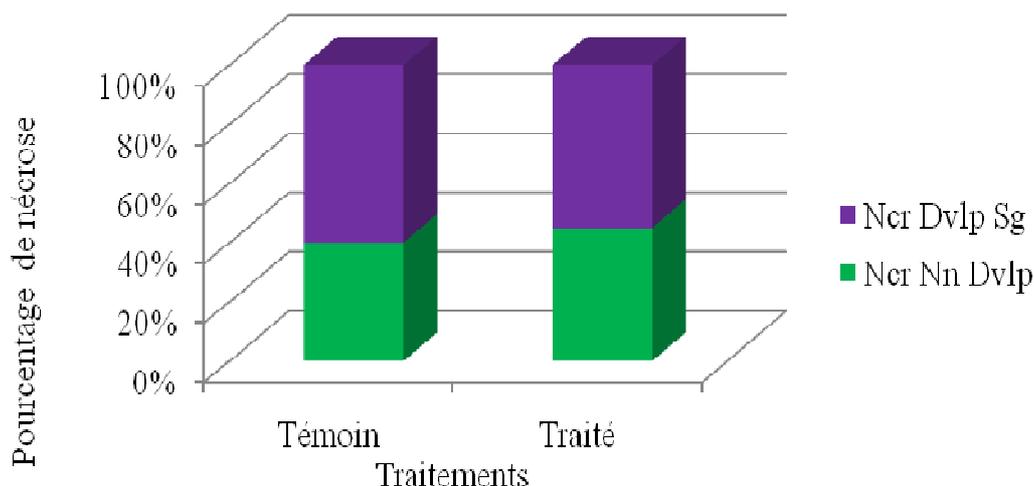


Figure 13: Pourcentage de feuilles nécrosées après traitement d'*A. thaliana* avec l'acide salicylique

### 3.1.5 Effet de l'acide jasmonique sur les paramètres biologiques de *M. persicae*

Les résultats obtenus pour cette expérience sont mis en relief par les figures, 14 et 15. Les courbes de la figure 14 traduisent la dynamique de population de *M. persicae* en fonction du temps entre les plants traités et les plants témoins. On remarque sur cette figure que le nombre moyen d'individu augmente de manière constante sur les plants témoins pour atteindre 21 individus en moyenne par plant à la fin de l'expérience. Sur les plants traités, le nombre d'individus reste constant durant les 24 premières heures, puis augmente progressivement jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour (96 h) et diminue jusqu'à la fin de l'expérience, soit 13 individus en moyenne par plant. Le taux de croissance relatif de la population est plus faible (0,18) sur les plants traités que sur les plants témoins (0,28). La comparaison des moyennes (test t) montre qu'il y a une différence significative ( $t = 2,66$  ;  $dl = 56$  ;  $p < 0,05$ ) entre les plants traités et les plants témoins.

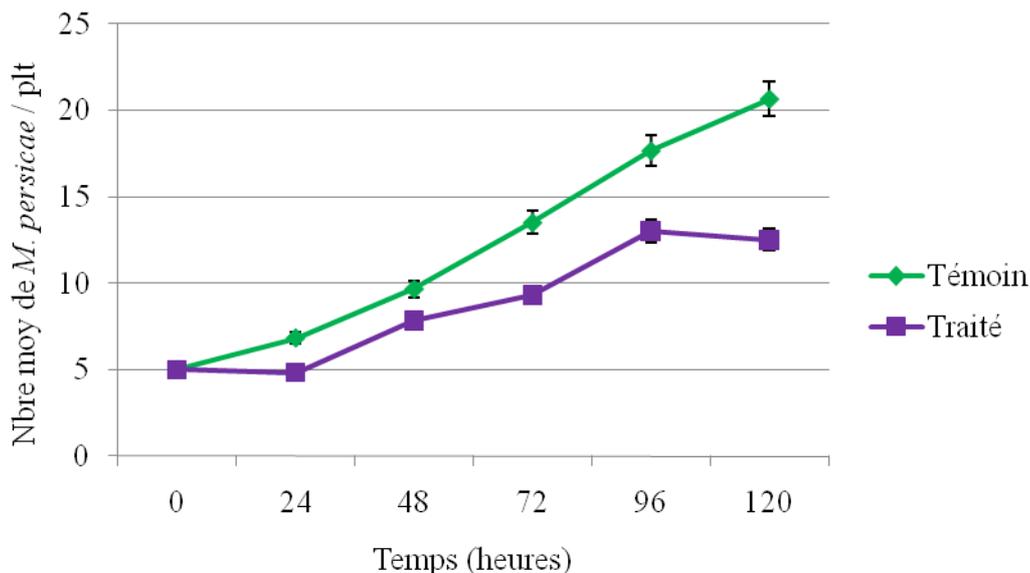


Figure 14 : Dynamique de population de *M. persicae* après traitement d'*A. thaliana* avec l'acide jasmonique

Sur la figure 15 exposant la fécondité moyenne de *M. persicae* après traitement à l'acide jasmonique on constate qu'à chaque observation le nombre de nymphes dénombré en moyenne sur les plants traités est toujours inférieur à celui obtenu sur les plants témoins. Pendant que cette fécondité augmente de façon continue sur le témoin jusqu'à la fin de l'expérience (11 nymphes en moyenne par plant), elle reste stable entre le 2ème (48 h) et le 3ème (72 h) jours sur le traité. Elle augmente ensuite légèrement jusqu'à la fin de l'expérience (7 nymphes en moyenne/plant). Une différence également significative ( $t = 2,01$  ;  $dl = 54$  ;  $p < 0,05$ ) est obtenue entre les plants traités et les témoins

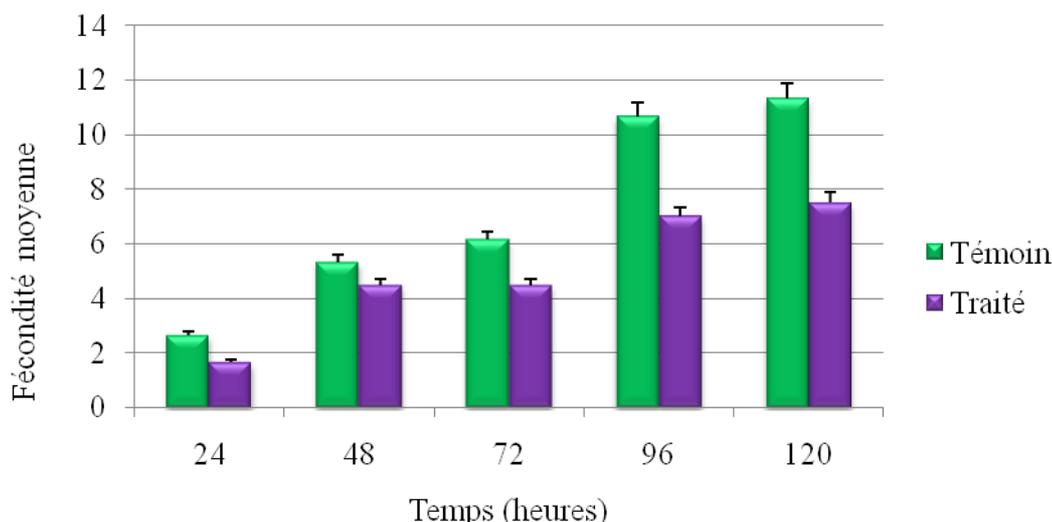


Figure 15 : Fécondité de *M. persicae* après traitement d'*A. thaliana* avec l'acide jasmonique

### 3.1.6. Effet de l'acide jasmonique sur le développement de *B. cinerea*

La figure 16 traduit le pourcentage de feuilles présentant des nécroses développées de manière significative ou non par rapport au nombre total de feuilles inoculées. Ce pourcentage est de 86,36 % sur le traité et 76,47 % sur le témoin. Le test de Khi 2 ne révèle aucune différence significative entre le témoin et le traité (Khi2 = 0,010; dl = 1; p = 0,921). Ce qui signifie que le taux d'infection de *B. cinerea* est statistiquement le même pour les deux traitements.

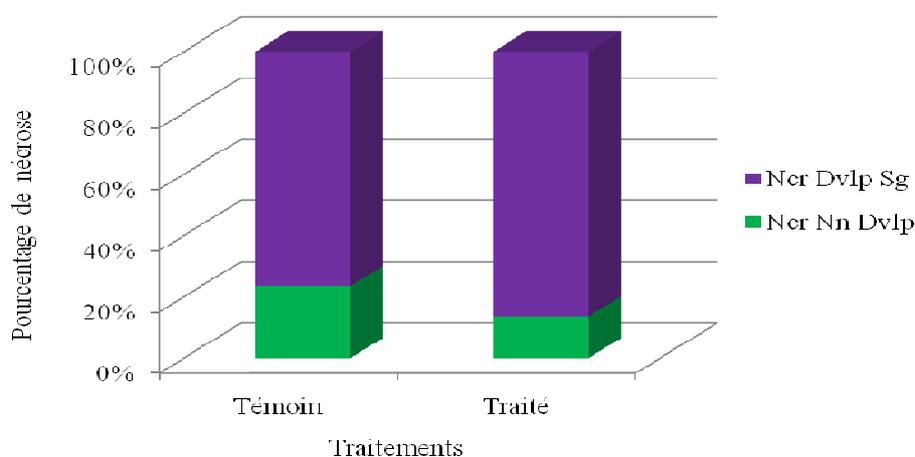


Figure 16: Pourcentage de feuilles nécrosées après traitement d'*A. thaliana* avec l'acide jasmonique

### 3.1.7. Effet de la surfactine sur les paramètres biologiques de *M. persicae*

Les plants d'*A. thaliana*, cultivés en hydroponie et préalablement traités avec la surfactine, sont infestés par *M. Persicae* 5 jours après le début du traitement. Les résultats obtenus au terme des 5 jours d'observation sont représentés aux figures 17 et 18. Les courbes de la figure 17 traduisent la dynamique de population de *M. persicae* en fonction du temps entre les plants témoins et les plants traités. Sur cette figure on remarque que la population des pucerons a doublé aussi bien sur les plants témoins que sur les plants traités 24h après l'infestation et que la population de puceron croit plus vite sur les plants témoins que sur les plants traités. Le taux de croissance relatif est de 0,38 et 0,45 respectivement pour les plants traités et les plants témoins. A la fin de l'expérience, le nombre moyen d'individu sur les plants témoins était de 48 pucerons par plant contre 34 pucerons par plant sur les plants traités. L'analyse comparée des moyennes (test t) montre qu'il y a une différence hautement significative ( $t = 4,20$  ; dl = 108 ;  $p < 0,001$ ) entre les plants traités et les plants témoins.

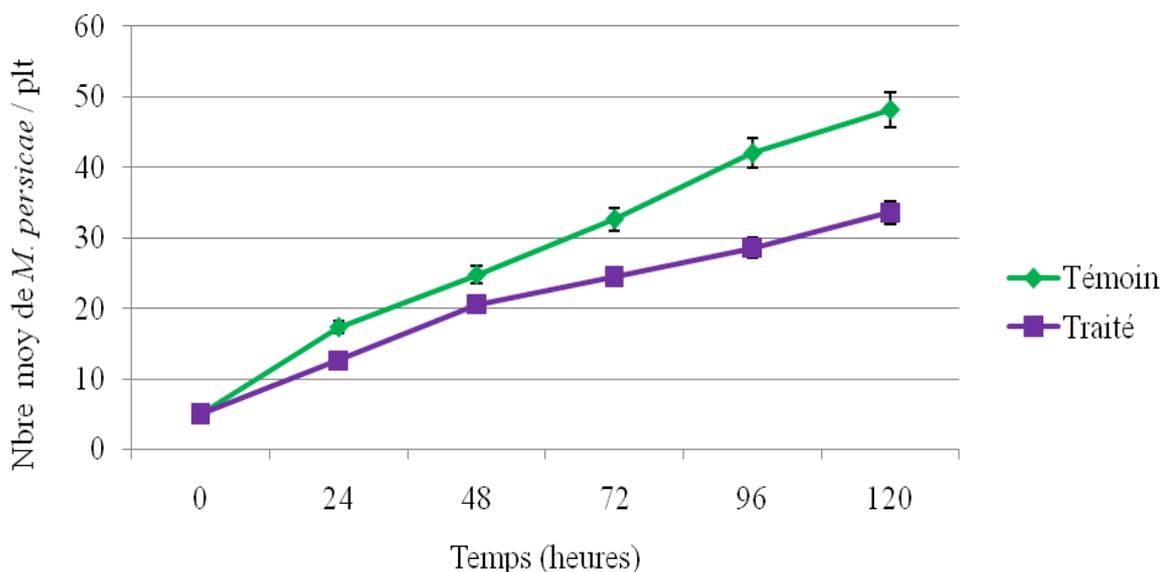


Figure 17: Dynamique de population de *M. persicae* après traitement d'*A. thaliana* avec la surfactine

Sur la figure 18, on observe également que la fécondité est croissante aussi bien sur les plants témoins que sur les plants traités. Cependant, elle est plus élevée sur les plants témoins que sur les plants traités. De 13 nymphes sur le témoin et 8 nymphes sur le traité dès le lendemain de l'infestation, la fécondité est passée à 41 et 26 nymphes en moyenne par plant respectivement pour le témoin et le traité. Une différence hautement significative est également observée entre les traitements ( $t = 4,37$  ;  $dl = 104$  ;  $p < 0,001$ ). Ces résultats montrent que le traitement à la surfactine aurait un effet négatif sur les paramètres biologiques de *M. persicae*.

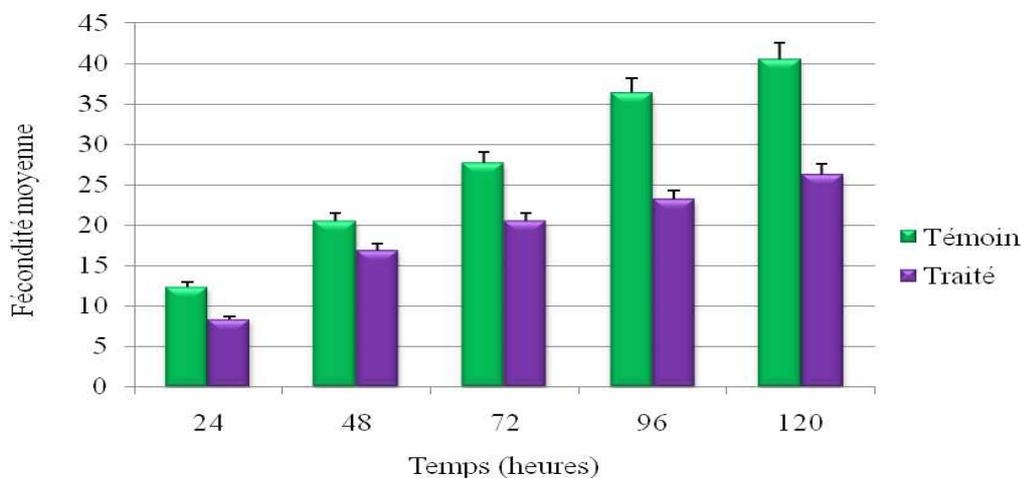


Figure 18: Fécondité de *M. persicae* après traitement d'*A. thaliana* à la surfactine

### 3.2. Etude des paramètres biologiques de *M. persicae* et du développement de *B. cinerea* sur *S. tuberosum*

#### 3.2.1. Etude croisée *B. cinerea* et *M. persicae*

Pour cette expérience, nous avons testé l'infection préalable de *B. cinerea* suivi d'une infestation de *M. persicae* et vice versa. Les résultats de ces expériences ne se sont cependant pas montrés concluants. En effet, dans les 2 combinaisons, l'inoculation du champignon sur *S. tuberosum* n'a pas entraîné le développement de nécroses. Aucun résultat n'a donc été obtenu. Il est donc souhaitable de refaire ces tests ou dans une autre mesure de travailler avec un champignon spécifique de *S. tuberosum* (*Phytophthora infestans* par exemple).

#### 3.2.2. Effet de l'acide salicylique sur les paramètres biologiques de *M. persicae*

La figure 19 présente les résultats obtenus au terme de 5 jours d'observation. Elle traduit la dynamique de la population de *M. persicae* suivant les traitements en fonction du temps. Mais le nombre d'individus augmente plus vite sur les plants témoins que sur les plants traités. Le taux de croissance relatif est de 0,30 sur les plants traités et 0,34 sur les plants témoins. A la fin de l'expérimentation, le nombre moyen d'individu était de 28 pucerons par plant sur les témoins contre 23 pucerons par plant sur les traités. La comparaison des moyennes (test t) entre les populations du témoin et du traité montre qu'il n'y a pas de différence significative entre ces deux traitements ( $t = 1,12$  ;  $dl = 50$  ;  $p = 0,270$ ).

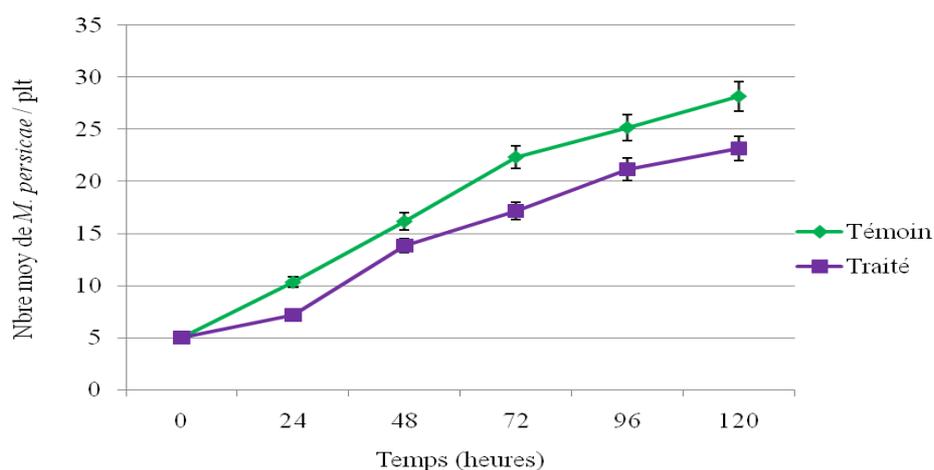


Figure 19: Dynamique de population de *M. persicae* après traitement de *S. tuberosum* avec l'acide salicylique.

Les fécondités moyennes de *M. persicae* obtenues quotidiennement pendant 5 jours sont présentées par la figure 20. Ces observations montrent que pour chaque observation, la fécondité de *M. persicae* est plus élevée sur les plants témoins que sur les plants traités. On remarque également une diminution de la fécondité pour les 2 traitements après 72 et 96 heures pour les plants témoins et les plants traités respectivement. De plus, l'analyse montre que statistiquement, il n'y a pas de différence significative entre le témoin et le traité ( $t = 1,14$  ;  $dl = 46$  ;  $p = 0,261$ ).

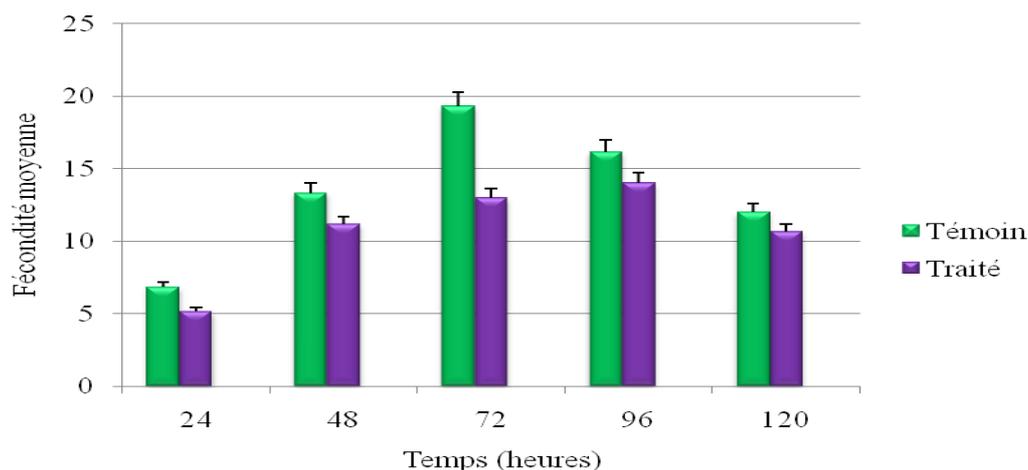


Figure 20 : Fécondité de *M. Persicae* après traitement avec l'acide salicylique.

### 3.2.3. Effet de traitement avec d'acide jasmonique sur *M. persicae*

Les plants ont été infestés avec *M. persicae* 3 jours après le traitement à l'acide jasmonique. Ensuite, le nombre total d'individus est relevé quotidiennement pendant 5 jours. Les résultats au terme de ces 5 jours observations sont résumés par la figure 21. Les courbes de la figure traduisent la dynamique de population de *M. persicae* suivant les traitements en fonction du temps. Sur les plants témoins, le nombre d'individus augmente rapidement jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour (96 h) puis diminue légèrement pour atteindre 22 individus en moyenne par plant à la fin de l'expérience. Sur les plants traités, la population des pucerons augmente également mais moins vite que sur les plants témoins jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour (96 h). Ensuite, il reste stable (18 individus en moyenne par plant) jusqu'à la fin de l'expérience. Les taux de croissance relatif de la population est de 0,29 et 0,25 respectivement pour les plants témoins et les plants traités. Le test t de comparaison de deux moyennes montre qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les plants témoins et les plants traités ( $t = 1,52$  ;  $dl = 53$  ;  $p = 0,135$ ).

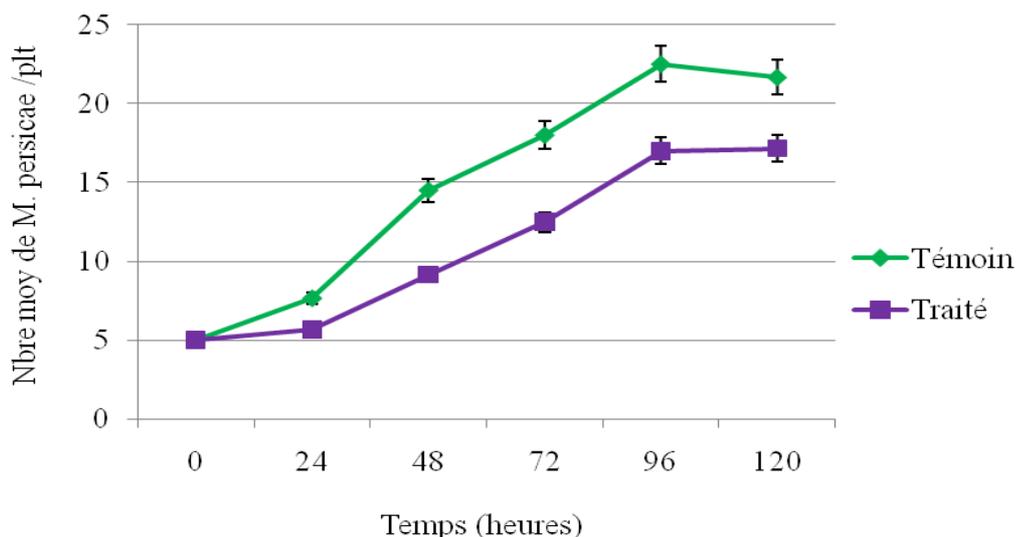


Figure 21 : Dynamique de populations de *M. persicae* après traitement de *S. tuberosum* avec l'acide jasmonique.

En plus de la dynamique des populations, la fécondité journalière moyenne de *M. persicae* a été évaluée (Figure 22). Comme dans les expériences précédentes, on remarque qu'elle est plus élevée sur le témoin que sur le traité. Sur les plants témoins, elle augmente jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour (72 h) puis ne varie plus jusqu'à la fin de l'expérience (15 nymphes en moyenne par plant). Par contre sur les plants traités, elle augmente jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour (96 h) puis diminue vers la fin de l'expérience (10 nymphes en moyenne par plant). L'analyse comparée des moyennes (test t) entre le témoin et le traité montre également que les fécondités ne diffèrent pas entre les traitements ( $t = 1,46$  ;  $dl = 55$  ;  $p = 0,149$ ).

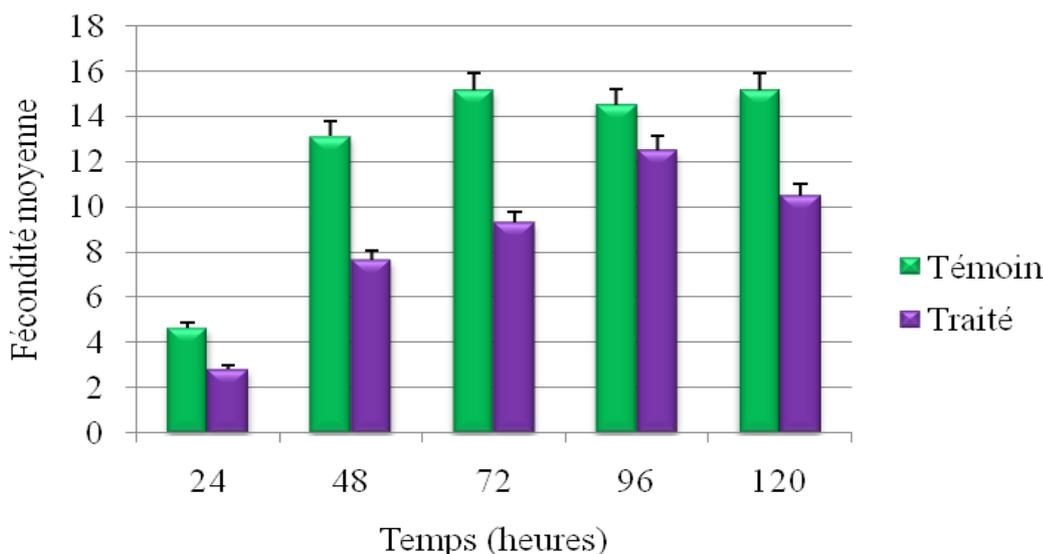


Figure 22: Fécondité de *M. persicae* après traitement avec l'acide jasmonique sur *S. tuberosum*.

### 3.3. Analyse comparée des différents traitements

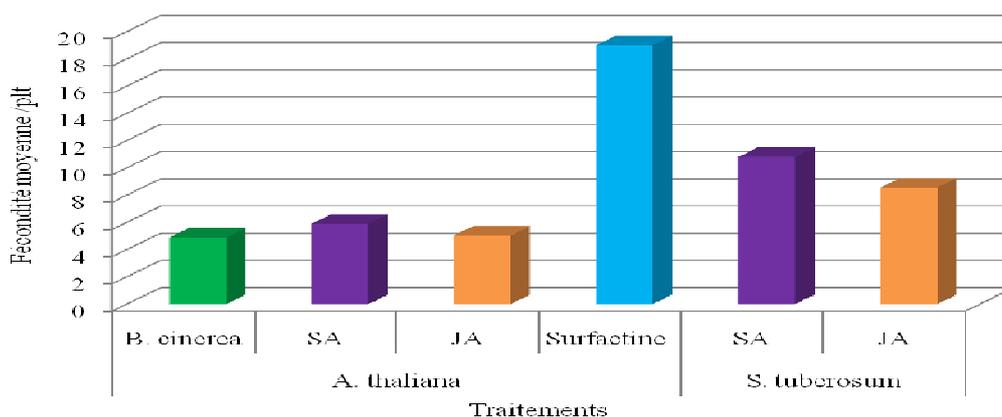
Cette analyse consiste à comparer les fécondités de *M. persicae* entre les différents traitements ainsi que le pourcentage de nécroses de *B. cinerea*.

#### 3.3.1. Effet comparé des différents traitements sur la fécondité de *M. persicae*

Les fécondités moyennes journalières par plant de *M. persicae* obtenues suite aux différents traitements sur les deux espèces de plantes étudiées sont comparées sur la figure 23. Sur *A. thaliana*, il y a peu de différence entre les différents traitements sauf avec la surfactine où la fécondité est d'environ 3 fois plus élevée.

Le test de Kruskal-Wallis sur la fécondité entre les plants traités avec *B. cinerea*, l'acide salicylique, l'acide jasmonique et la surfactine donne une différence hautement significative ( $H = 83,25$  ;  $dl = 3$  ;  $p < 0,001$ ) entre les traitements. Mais on remarque que les rangs moyens de *B. cinerea* (51,6), de l'acide salicylique (58,4) et de l'acide jasmonique (55,2) sont plus proches du rang moyen total du test (80,5) que celui de la surfactine (123,5). Les fécondités obtenues pour ces trois traitements ne diffèrent pas entre elles mais sont différentes chacune de la fécondité obtenue avec la surfactine. En résumé on pourrait dire que les traitements avec *B. cinerea*, l'acide salicylique et l'acide jasmonique ont plus d'effet sur la fécondité de *M. persicae* que la surfactine. Mais il faut noter que les plants n'ont pas été cultivés dans les mêmes conditions (Figure 24). Cela pourrait expliquer donc cette forte différence de fécondité.

Sur *S. tuberosum* la différence de fécondité entre l'acide salicylique et jasmonique n'est pas aussi grande. De plus l'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative entre ces deux traitements ( $t = 1,27$  ;  $dl = 57$  ;  $p = 0,208$ ).



**Figure 23: Comparaison des fécondités de *M. persicae* en fonction des différents traitements.**



Figure 24 : Différence entre les plants d'*A. thaliana* en culture hydroponique (a) et culture sur terreau (b).

### 3.3.2. Comparaison du pourcentage d'infection de *B. cinerea* sur *A. thaliana*

La figure 25 présente les pourcentages de feuilles nécrosées de manière significative pour les différents traitements. Le plus grand taux d'infection est obtenu sur les plants traités avec l'acide jasmonique (86,36%). Celui enregistré sur les plants traités avec l'acide salicylique est de 55%. Le plus petit taux d'infection est observé suite aux infestations de *M. persicae* (44,43%).

Afin de vérifier si ces taux d'infections sont statistiquement différents les uns des autres, le test de Khi2 a été effectué. Les résultats du test montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents traitements (Khi2 = 2,641 ; dl = 2 ; p = 0,267). Les taux d'infection de *B. cinerea* ne diffèrent donc pas pour les trois traitements.

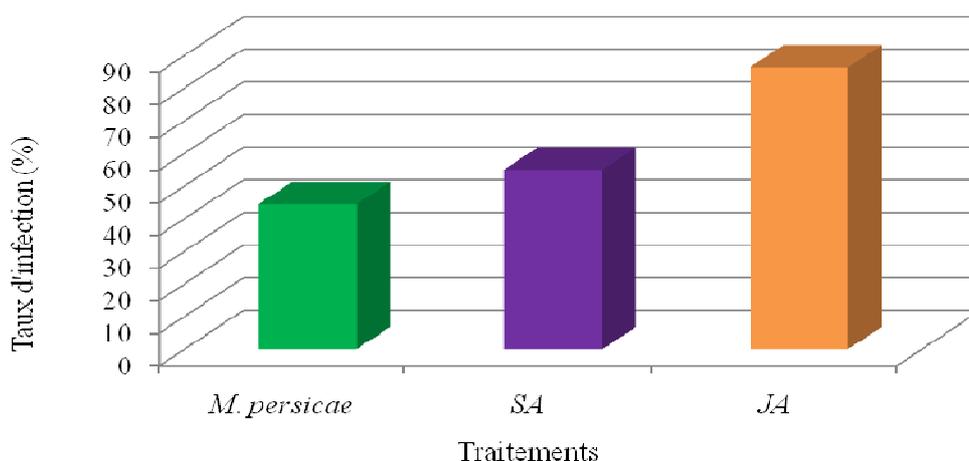


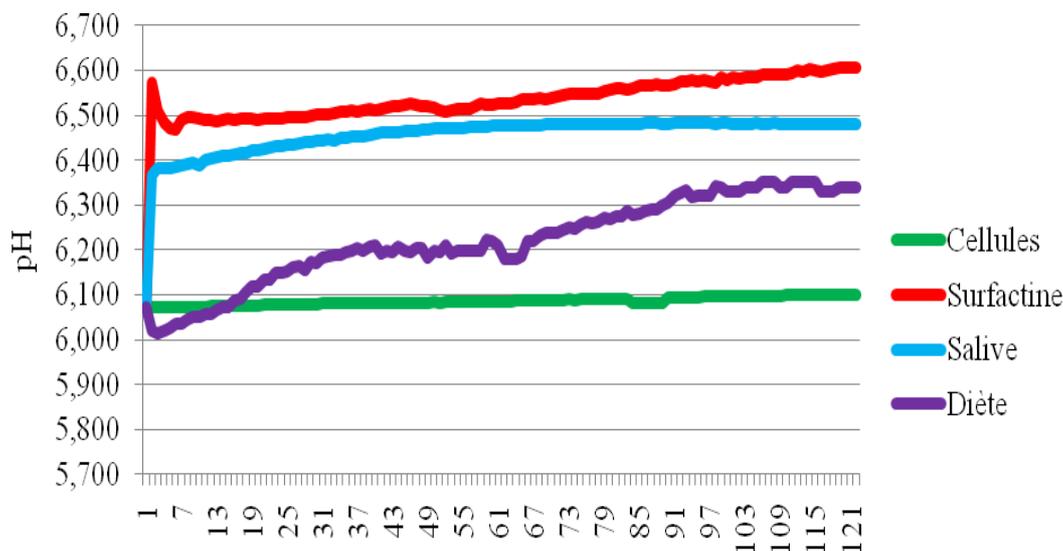
Figure 25: Comparaison des taux d'infections de *B. cinerea* en fonction des traitements sur *A. thaliana*.

### 3.4. Effet de la salive de *M. persicae* sur le pH extracellulaire d'*A. thaliana*

Les modifications de pH extracellulaire font partie des premiers événements que l'on observe lorsqu'il y a reconnaissance entre une cellule et un éliciteur. Ainsi pour déterminer une éventuelle activité élicitrice de *M. persicae* sur *A. thaliana*, la salive de ce puceron est recueillie sous forme de diète artificielle et mise en contact avec une suspension cellulaire d'*A. thaliana* en culture. Le témoin positif de l'expérience est élicité avec la surfactine. Afin de s'assurer que la modification du pH provient bien de la salive et non de la diète, les cellules d'*A. thaliana* ont été également élicitées avec de la diète ne contenant pas de la salive. Les résultats de ces différentes mesures sont présentés par la figure 26.

On remarque sur cette figure que le pH des cellules non élicitées est plus ou moins constant tout au long de la mesure. Néanmoins on a pu observer quelques très légères variations.

Lorsque les cellules sont élicitées avec la surfactine (témoin positif), on obtient une alcalinisation très brusque du milieu extracellulaire qui se traduit par une montée de pH. Ce dernier passe de 6,09 en moyenne à 6,57 dès les premières secondes. Il s'en suit une légère acidification (6,47) pendant 3min environ. Ensuite, le milieu extracellulaire s'alcalinise de nouveau progressivement avec de petites variations jusqu'à la fin de l'expérience.



Unité de mesure en seconde (1 unité = 30s)

Figure 26: Evolution du pH extracellulaire après élicitation avec la salive de *M. persicae*.

Avec la diète contenant la salive, on observe tout comme avec la surfactine une montée brusque du pH dès l'élicitation des cellules (pH = 6,37). Il augmente ensuite légèrement jusqu'à la 38<sup>ème</sup> min et se stabilise jusqu'à la fin de l'expérience.

Après l'ajout de la diète sans salive à la suspension cellulaire, on observe dans un premier temps une légère acidification du milieu (pH = 6,02). Ensuite le pH augmente jusqu'à la fin de l'expérience avec de multiples variations.

En calculant les variations de pH ( $\Delta \text{pH} = \text{pH}_2 - \text{pH}_1$ ) générées lors des mesures on obtient les courbes de la figure 27. On remarque sur cette figure que le pH de cellulaire varie très peu tout au long de l'expérience. Pendant les 30 premières secondes cette variation passe à plus de 0,3 et 0,4 unités de pH respectivement avec la salive et la surfactine. Par contre avec la diète elle passe à décroît légèrement. Avec la surfactine cette variation est progressive et atteint à la fin de l'expérience plus de 0,5 unités de pH. Avec la salive elle se stabilise à 0,4 unités de pH à partir de la 180<sup>ème</sup> secondes jusqu'à la fin de l'expérience. La variation de pH avec la diète augmente ensuite lentement et se stabilise à plus de 0,2 unités de pH vers la fin de l'expérience.

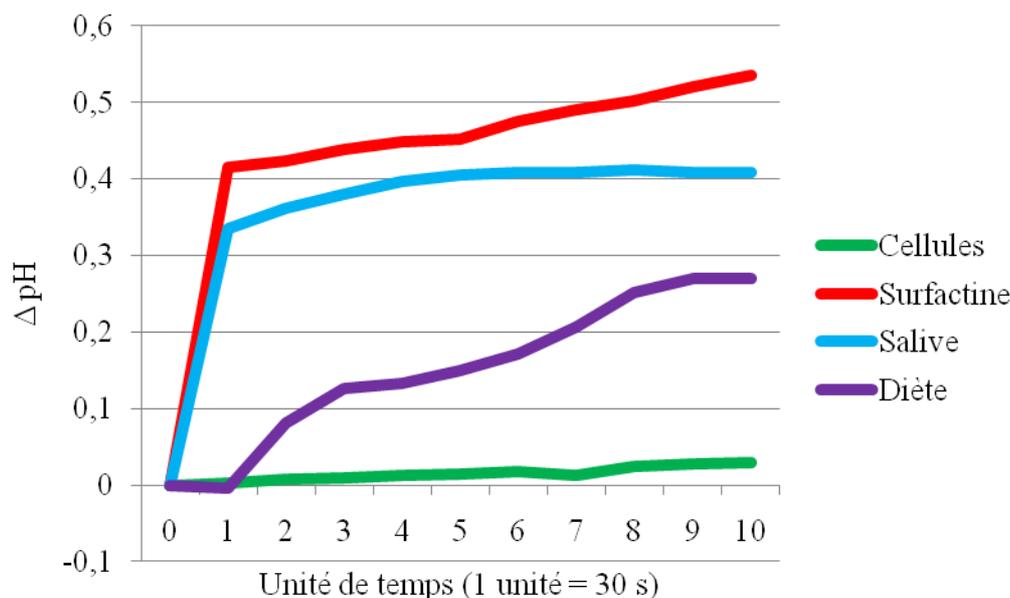


Figure 27: Variation de pH des cellules suivant les différents traitements.

### 3.5. Approche protéomique: analyse des protéomes des cellules d'*A. thaliana*

#### 3.5.1. Quantification des protéines

Les concentrations de protéines obtenues après quantification des protéines étaient de 3,08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  pour les cellules élicitées avec la salive et de 3,48  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  pour les cellules élicitées avec la diète. Ces concentrations étaient suffisantes pour le marquage aux CyDyes<sup>TM</sup> et procéder ensuite à l'électrophorèse.

#### 3.5.2. Analyse et révélation des spots protéiques

Après le scannage des gels, les images ont été analysés afin de révéler les spots protéiques qui s'expriment différemment de manière significative entre les cellules élicitées avec la diète contenant la salive et les cellules élicitées avec de la diète sans salive. L'un des trois gels est un gel préparatif, sur lequel une plus grande quantité de protéines est présente, permettant ainsi le picking et l'identification des protéines. Les images des trois gels ont été analysées à l'aide du programme Progenesis Same Spots (Nonlinear Dynamics). Après traitement de ces images, 946 variations d'intensité du signal ont été détectées et assimilées à autant de spots protéiques par le programme. Parmi ces spots, 9 ont été identifiés comme exprimés de façon différentielle. Le positionnement des spots protéiques exprimés différemment est présenté sur la figure 28.

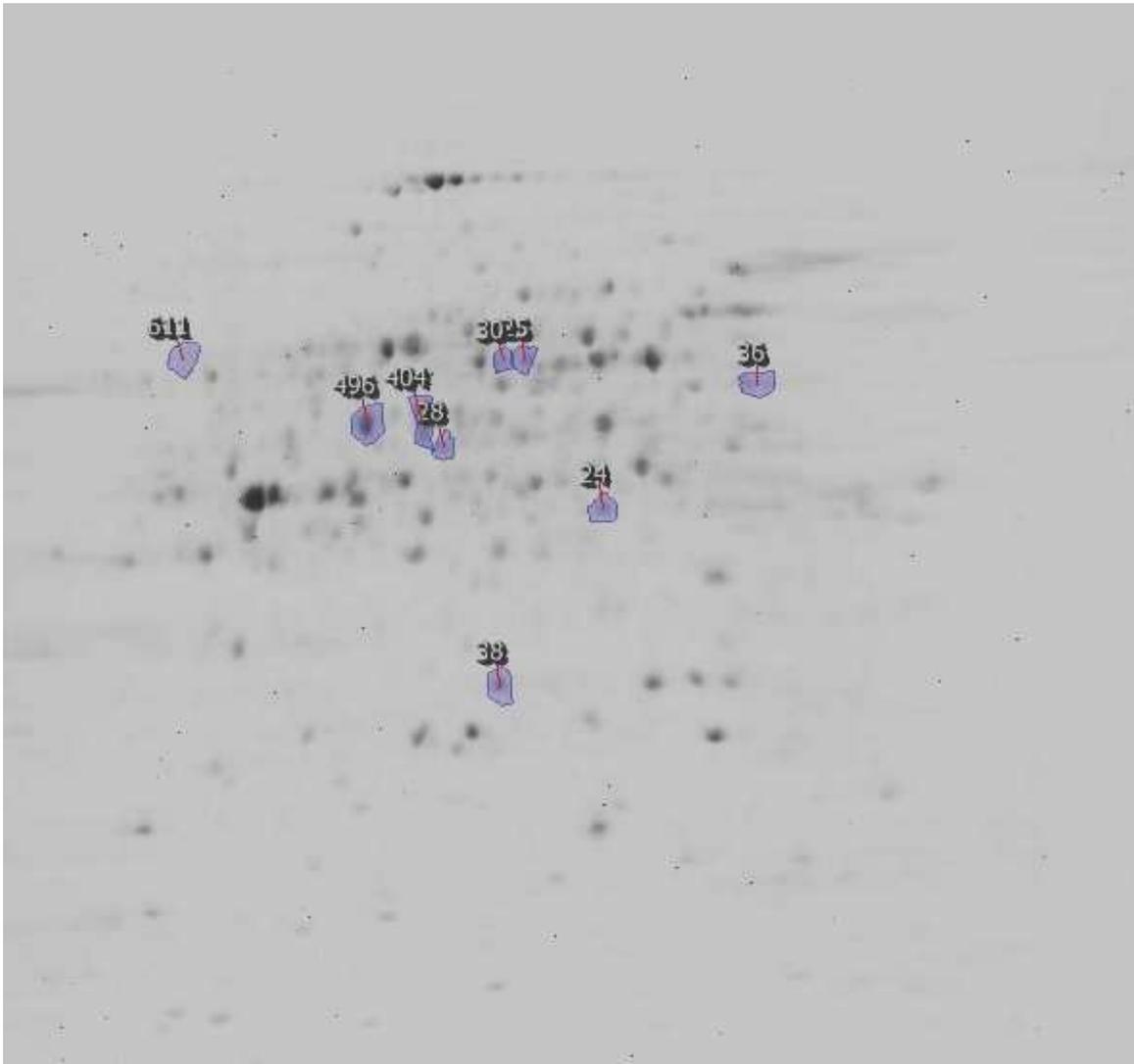


Figure 28: Gel 2D présentant les protéines exprimées de manière différentielle chez les cellules d'*A. thaliana* élicitées avec la salive de *M. persicae* ainsi que les cellules élicitées avec la diète.

## IV. DISCUSSION

### 4.1. Etude croisées *B. cinerea* et *M. persicae*

L'objectif de cette expérience était d'établir si une infection préalable du champignon phytopathogène *B. cinerea* pourrait avoir un effet direct ou indirect sur les performances de *M. persicae* et vice versa. Et dans la mesure du possible identifier les mécanismes qui gouvernent ces interactions. Dans un premier temps, des plants d'*A. thaliana* ont subi une infection par *B. cinerea* puis ont été infestés par *M. persicae*. A l'issue de ce test, nous avons constaté que le taux de croissance relatif des populations de pucerons sur les plants préalablement traités avec le champignon était plus faible (0,47) que celui obtenu sur les plants témoins (0,58). Cette observation a été faite également sur la fécondité de *M. persicae* avec une différence hautement significative ( $t = 4,19$  ;  $dl = 67$  ;  $p < 0,001$ ) entre les plants traités et les plants témoins. A partir de ces résultats on peut se demander si l'infection préalable de *B. cinerea* a pu induire des mécanismes de défense chez *A. thaliana* contre les attaques de *M. persicae*. Cela expliquerait le faible taux de croissance enregistré sur les plants traités par rapport aux témoins. Une étude similaire a été réalisée avec le champignon *Marssonina betulae* Magnus sur le puceron *Euceraphis betulae* Koch du bouleau (*Betula pendula* L.) par Johnson *et al* (2003). Contrairement à nos observations, ces auteurs ont montré qu'une infestation préalable de *M. betulae* avait un effet positif sur les performances du puceron (*E. betulae*) en termes de gain de poids et du taux de croissance de la population aphidienne sur les plants traités avec *M. betulae*. Cela dit, le pathogène n'induit pas le même type de réponse chez les plantes. Ces réponses pourraient être fonction du couple plant-pathogène.

L'infection des plants d'*A. thaliana* avec *B. cinerea* précédée d'une infestation de *M. persicae* montre que le taux d'infection du champignon ne diffère pas statistiquement entre les traitements ( $Ki2 = 0,310$  ;  $dl = 1$  ;  $P > 0,05$ ). Cette situation montre que les attaques de pucerons n'a que très peu d'impact sur le développement du champignon. En effet, le traitement préalable d'*A. thaliana* avec *M. persicae* ne semble pas entraîner la mise en place de mécanismes de défense contre *B. cinerea*. Pourtant, la littérature souligne qu'une infestation des plantes par les pucerons est capable d'activer partiellement les voies de l'acide salicylique et jasmonique tout en privilégiant celle de l'acide salicylique qui se traduit par la production de protéines PR (Giordanengo *et al.*, 2007). En supposant que les pucerons ont pu induire certains mécanismes de défense chez les plants, ces derniers ne seraient peut être pas

dirigés contre *B. cinerea* ou n'auraient aucun effet sur ce champignon. On pourrait dans une certaine mesure émettre l'hypothèse qu'un traitement préalable de *M. persicae* n'entraîne pas de mécanismes de défense contre *B. cinerea* et en plus de cela, contribue à un affaiblissement de la plante. Cela pourrait s'expliquer par le taux d'infection plus élevé sur les plants traités (47,43%) que sur les témoins (40,47%). Si les mécanismes de défense mis en place ne sont pas inappropriés ou si la plante ne réagit pas très rapidement ou encore si les voies de défenses sont inactivées, une interaction compatible se met en place entre le pathogène et la plante conduisant ainsi à la prolifération du pathogène (Jourdan *et al.*, 2008). Cela pourrait être le cas dans cette expérience.

Au terme de cette expérience, il ressort qu'une infection préalable des plants d'*A. thaliana* par *B. cinerea* protégerait mieux la plante contre une infestation de *M. persicae*. Mais lorsque la plante est préalablement infestée par le puceron aucun effet de protection contre le champignon n'est observé.

#### **4.2. Effet de l'acide salicylique et jasmonique sur *M. persicae* et de *B.***

##### ***cinerea***

L'acide salicylique et jasmonique sont connus comme étant des molécules qui régulent les voies de signalisations de chez de nombreuses plantes (Jourdan *et al.*, 2008).

Le rôle de l'acide salicylique dans l'induction de la résistance systémique acquise chez les plantes contre de nombreux pathogènes a été très largement étudié (Hopkins et Evard, 2003 ; Delaney *et al.*, 1994). Nous avons donc évalué l'effet éventuel d'une induction de mécanismes de défense de cette molécule sur les plants d'*A. thaliana* et *S. tuberosum* sur les paramètres biologiques de *M. persicae*. Les résultats obtenus au terme de cette expérience sont similaires à ceux observés avec *B. cinerea* aussi bien sur *A. thaliana* que sur *S. tuberosum* pour ce qui est des paramètres biologiques de *M. persicae*. En effet les taux de croissance relatifs de *M. persicae* sur les plants traités avec la SA respectivement sur *A. thaliana* et *S. tuberosum* sont de 0,49 et 0,57. Ces taux sont inférieurs à ceux mesurés sur les plants témoins qui sont de 0,55 et 0,61 respectivement pour *A. thaliana* et *S. tuberosum*. Mais la fécondité ne diffère pas statistiquement entre le témoin et le traité ni sur *A. thaliana* ( $t = 1,82$  ;  $dl = 55$  ;  $P = 0,075$ ) ni sur *S. tuberosum* ( $t = 1,14$  ;  $dl = 46$  ;  $p = 0,261$ ). L'application de cette molécule sur la plante entraîne la mise en place de la résistance systémique acquise d'après Durand-Tardif et Pelletier (2003). Il se pourrait donc que le traitement que nous avons réalisé avec cette molécule ait induit des mécanismes de défense. De toutes les façons ce

traitement a montré un effet bénéfique en termes de protection des plants contre les attaques *M. persicae*.

Nous avons également constaté que lorsque les plants d'*A. thaliana* sont infectés par *B. cinerea* après qu'ils aient subi un traitement avec l'acide salicylique, le taux d'infection ne diffère pas statistiquement entre le témoin et le traité ( $\text{Khi}^2 = 0,024$  ;  $\text{dl} = 1$  ;  $p = 0,877$ ). Cependant ce taux est plus élevé sur le témoin (60%) que sur le traité (55%). Ce résultat montre que les plants ont certainement réagi au traitement et mettent en place des mécanismes de défense. L'acide jasmonique est un régulateur de croissance très connu chez les plantes. De plus il active les mécanismes de défense des plantes en réponse aux attaques des insectes et pathogènes (Cheong and Do Choi, 2003). Les résultats obtenus avec cette molécule, montrent qu'elle a eu un effet négatif sur la survie et la fécondité des pucerons (*M. persicae*) aussi bien sur *A. thaliana* que sur *S. tuberosum*.

Sur les plants d'*A. thaliana* traités avec l'acide jasmonique on remarque également que le taux d'infection de *B. cinerea* ne diffère pas statistiquement entre les plants témoins et les plants traités ( $\text{Khi}^2 = 0,010$ ;  $\text{dl} = 1$ ;  $p = 0,921$ ). De plus il est plus élevé sur les plants traités (86,36 %) que sur les plants témoins (76,47 %). Cette observation laisse croire que les plants n'ont pas réagi au traitement. Des études ont montré que l'acide jasmonique régule l'activité des métabolites dans les systèmes de défense des plants (Schaller *et al.*, 2004). Cependant, l'introduction de protéines d'avirulence par le pathogène peut aboutir à une perturbation des voies de défense menant au développement de ce dernier et à l'apparition de la maladie (Jourdan *et al.*, 2008). Le développement de *B. cinerea* serait alors dû à cette perturbation des voies de défense d'*A. thaliana*.

#### **4.3. Effet de la surfactine sur les paramètres biologiques de *M. persicae***

La surfactine est une lipopeptide capable d'induire une résistance systémique induite chez les plantes telle que la tomate et le haricot contre de nombreux agents pathogènes (Ongena *et al.*, 2007). A l'issue de nos expérimentations avec cet éliciteur, nous avons pu constater que les pucerons se développent aussi bien sur les plants témoins que traités. Mais une différence très hautement significative est observée entre les traitements que se soit pour la survie de la population de puceron ( $t = 4,20$  ;  $\text{dl} = 108$  ;  $p < 0,001$ ) que pour la fécondité ( $t = 4,37$  ;  $\text{dl} = 104$  ;  $p < 0,001$ ). Ceci montre que les plants ont réagi fortement au traitement. Nos résultats sont similaires à ceux de Durand-Tardif et Pelletier (2003) qui ont travaillé avec les bactéries non pathogènes du genre *Pseudomonas*. Ils ont pu montrer que lorsque les racines étaient

traitées avec ces bactéries, elles induisaient des réactions de défense à une infection ultérieure par un pathogène sur une partie de la plante autre que la racine. Cet éliciteur aurait donc induit chez *A. thaliana* une certaine forme de résistance contre *M. persicae*. Il serait donc intéressant d'identifier les voies de signalisation induite par cet éliciteur contre les pucerons.

#### **4.4. Effet de la salive de *M. persicae* sur les cellules d'*A. thaliana***

La reconnaissance d'un éliciteur par une cellule se traduit généralement par une alcalinisation du milieu extracellulaire et une acidification cytoplasmique liée aux flux ionique (Luwaert (2010)). En effet, une alcalinisation a été observée lors des traitements des cellules avec le témoin positif constitué par la surfactine. L'acidification obtenue en début de l'expérience pourrait être l'effet d'un stress au niveau des cellules. Luwaert (2010) a pu montrer que lorsque les cellules de tabac (*Nicotiana tabacum*) sont élicitées avec cet éliciteur, on obtenait bien une alcalinisation du milieu extracellulaire dès les premiers instants de l'élicitation mais par la suite le milieu s'acidifiait. Contrairement à ces observations, il a été constaté dans nos expériences que le milieu cellulaire s'alcalinisait continuellement.

Lorsque ces cellules sont traitées avec la diète contenant la salive de *M. persicae* on constate une augmentation du pH extracellulaire traduisant ainsi l'alcalinisation du milieu cellulaire tout comme avec la surfactine. Les travaux de Luwaert (2010) concernant les cellules de *N. tabacum* élicitées avec de la salive ont montré que l'alcalinisation du milieu cellulaire était suivie d'une légère acidification sur les cellules de tabac, contrairement à nos observations. Toujours est-il que dans les deux travaux, l'effet de la salive est similaire à celui de la surfactine qui est un éliciteur bien connu. En effet, le pH de la diète contenant de la salive est de 6,11 en moyenne. Ce pH est bien proche de celui du milieu cellulaire (6,10) en moyenne. Ainsi on pourrait estimer que la salive de *M. persicae* posséderait une quelconque activité élicitrice sur les cellules d'*A. thaliana*. Mais la différence de comportement de pH observée par rapport aux travaux de Luwaert (2010) nous fait penser qu'un même éliciteur peut agir différemment en fonction de la plante hôte.

La stabilisation du pH observée avec la salive pourrait signifier qu'à partir d'un certain moment les cellules ne répondent plus au traitement ou qu'elles ont développé une tolérance à la salive leur permettant de stabiliser le pH du milieu. Lorsque les cellules ont été traitées avec la diète sans salive, une alcalinisation du milieu a été observée. Il faut noter cependant que le pH de la diète est neutre (7,02) et que celui des cellules est sensiblement égal à 6,10. L'effet

observé chez les cellules semble donc être le résultat d'un effet tampon plutôt que d'une réponse au traitement avec la diète seule.

#### **4.5. Expression protéique différentielle chez les cellules d'*A. thaliana***

Au total 9 spots protéiques se sont exprimés de manière différentielle. Ces résultats sont similaires à ceux observés par Luwaert (2010) qui dans ses travaux sur les plantes entières d'*A. thaliana* broyées a obtenu 12 spots exprimés différentiellement sur 867 spots protéiques révélés après analyse. L'identification des spots protéiques n'étant pas encore effectuée, on ne peut donc se statuer sur la nature de ces protéines. Nous pouvons cependant remarquer qu'en termes de nombre de protéines, celui ci est similaire selon que les expériences sont réalisées sur suspensions cellulaires ou sur plantes entières.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence les différents mécanismes de défense végétale induits lors d'attaques d'agents pathogènes ou d'insectes phytophages, mais également lorsqu'elles sont traitées avec certains éliciteurs connus. Ainsi nous avons évalué l'effet de différents traitements des plants d'*A. thaliana* et *S. tuberosum* sur les paramètres biologiques (taux de croissance et fécondité) de *M. persicae* et le développement de *B. cinerea*.

Les tests réalisés avec *B. cinerea*, l'acide jasmonique et la surfactine ont eu un effet limitant sur les paramètres biologiques de *M. persicae* et notamment leur développement avec des différences significatives entre les témoins et les traités. Avec l'acide salicylique un effet négatif a été également obtenu sur les paramètres biologiques de *M. persicae*, mais sans une différence statistique significative entre les témoins et les traités. L'étude du développement de *B. cinerea*, n'a pas été assez concluante. Les essais sur la résistance croisée *B. cinerea* / *M. persicae* réalisés sur *S. tuberosum* n'ont pas fonctionné. Il est donc souhaitable de refaire ces deux dernières expériences.

L'élicitation des cellules d'*A. thaliana* avec la salive de *M. persicae* en présence de diète a entraîné une alcalinisation du milieu cellulaire tout comme avec la surfactine. La diète sans salive a également entraîné une alcalinisation du milieu mais le profil de la courbe de pH était différent de celui observé pour la salive. En effet, l'alcalinisation s'est faite de manière progressive et nous n'avons pas observé de pic pendant les premiers instants de l'élicitation. Nous pouvons donc affirmer que le traitement des cellules d'*A. thaliana* avec la salive entraîne une réponse similaire à celle observée avec la surfactine, éliciteur de référence. De plus, l'analyse du protéome des cellules d'*A. thaliana* élicitées avec la salive et la diète a révélée 9 spots protéiques qui se sont exprimés de manière différentielle. L'identification de la nature de ces protéines permettra de mieux comprendre le rôle de la salive de *M. persicae* dans l'établissement des mécanismes de défense végétale. Au terme des résultats obtenus au cours de ces travaux, il est souhaitable de : répéter les expériences réalisées avec *B. cinerea* et la surfactine sur les paramètres biologiques de *M. persicae* afin de pouvoir confirmer ou pas les résultats obtenus; élargir ces expériences sur d'autres types de pathogènes et insectes phytophages sur d'autres espèces de plantes ; investiguer le protéome des pucerons élevés sur les plants traités avec la surfactine et *B. cinerea* et identifier la nature des protéines exprimées de manière différentielle suite à l'élicitation avec la salive de *M. persicae*.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ Abe K. and Arai S. (1985). Purification of a cystein proteinase inhibitor from rice, *Oryza sativa* L. japonica. *Agriculture Biology and Chemistry*, vol. 49, p. 3349-3350.
- ❖ Abeles F., Morgan P., Saltveit M. (1992). *Ethylenein Plant Biology*. Vol.2. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- ❖ Adam A. (2008). Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de Doctorat, Université de Liège, Belgique, 165p.
- ❖ Aldington S; Fry S. C. 1993. Oligosaccharins *Adv Bot Res*,19: 1-101
- ❖ Alford D. V. 1994. Ravageurs des végétaux d'ornement: arbres, arbustes, fleurs. Editions Quae. 464 pages: page 72.
- ❖ Anonyme 1. (2011). <http://www.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/3myzper.htm> (2011-04-06).
- ❖ Anonyme 2. (2011). <http://taste.versailles.inra.fr/inapg/aphidsmania/ environnement/defense/salive.htm> (03/04/2011).
- ❖ Aymes S., Pernollet J-C. (1997). Activation of tobacco defence mechanisms by elicitors: Differential effects of capsicein and cryptogéin. Thèse nouveau doctorat: 161 p. (N°: 97 INAP 0017). Résumé.
- ❖ Baldwin W.S, Marko P. B and Nelson D. R. (2009). The cytochrome P450 (CYP) gene superfamily in *Daphnia pulex*. *BMC Genomics*, 10: 169. Doi: 10.1186/1471-2164-10-169
- ❖ Benhamou N. (1996). Elicitor-induced plant defense pathways. *Trends Plant Sci*, 1: 233-240.
- ❖ Benhamou N. (2009). La résistance chez les plantes: Principes de la stratégie défensive et applications agronomiques. Edition TEC et DOC : 376 pp.
- ❖ Benhamou N. et Picard K. (1999). La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*, 80 (3): 137-168.
- ❖ Blackman, R.L. and V.F. Eastop. (2000). *Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide*. 2<sup>nd</sup> Edition. Ed Willey. N.Y.: p. 324.
- ❖ Blee K. A., Yang K.Y., Anderson A.J. (2004). Activation of defense pathways: Synergism between reactive oxygen species and salicylic acid and consideration of field applicability. *Eur J Plant Pathol*, 110: 203-212.
- ❖ Bonnemain J-L., Chollet J-F. (2003). The arsenal of agrochemical products versus the plant enemies. General considerations. *C. R. Biologies*, 326: 1-7.
- ❖ Bourque S., Binet M. N., Ponchet M, Pugin A. and Lebrun-Garcia A. (1999). Characterization of the cryptogéin binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem.*; 274:34699–34705.
- ❖ Bradley D. J., Kjellbom P. Lamb C. J. (1992). Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall peotéin-A novel, rapid defense response. *Cell*, 70: 21-30.
- ❖ Brown W. M., Dziegielewska K. M. 1997. Friends and relation of the cystatin superfamily-new members and their evolution. *Prot Sci*, 6: 5-12.

- ❖ Brzin J. and Kidric M. 1995. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev*, 13: 420-467.
- ❖ Cabrera-Brandt M. A., Fuentes-Contreras E., and Figueroa C. C. (2010). Differences in the detoxification metabolism between two clonal lineages of the aphid *Myzus persicae* (sulzer) (hemiptera: aphididae) reared on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Chilean journal of agricultural research* 70(4):567-575.
- ❖ Cai, Q.N., Y. Han, Y.Z. Cao, Y. Hu, X. Zhao, and J.L. Bi. (2009). Detoxification of gramine by the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Journal of Chemical Ecology* 35:320-325.
- ❖ Cameron R. K., Dixon R. A. and Lamb C. J. (1994). Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 5: 715- 725.
- ❖ Chen M-S. (2008.) Inducible direct plant defense against insect herbivores - a review. *Insect Science*, 15:101-114.
- ❖ Chinery M. (2000). Insectes de France et d'Europe occidentale. Edition Flammarion, 320 p : pp 94
- ❖ Christeller J. T., Farley P. C., Ramsay R. J., Sullivan P. A. and Laing W. A. (1998). Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *Eur. J. Biochem.*, 254: 160-167.
- ❖ Clark A.G. (1990). The glutathione S-transferases and resistance to insecticides. In: Hayes JD, Pickett CB, Mantle TJ, editors. *Glutathione S-transferases and drug resistance*. London: *Taylor & Francis*: 369–379.
- ❖ Clough S. J., Fengler K. A., Yu I. C., Lippok B., Smith R. K. J., Bent A. F. (2000). The *Arabidopsis* dnd1 “defense, no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 9323- 9328.
- ❖ Côté F. et Hahn M. (1994). Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Mol Biol*, 26 : 1379 – 1411.
- ❖ Creelman R. A., Mullet J. E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 355-605.
- ❖ Cristofolletti, P. T., de Sousa F. A., Rahbé Y., Terra, W.R., (2006). Characterization of a membrane-bound aminopeptidase purified from *Acyrtosiphon pisum* midgut cells. A major binding site for toxic mannose lectins. *FEBS J*, 273: 5574–5588.
- ❖ Darwill A., Albersheim P. (1984). Phytoalexins and their elicitors- a defense against microbial infection in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol, Biol*, 35: 243-275.
- ❖ De Leo F. and Gallerani R. (2002). The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis*
- ❖ De vos M. and Jander G. (2010). Volatile communication in plant-aphid interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 366-371.
- ❖ Dedryver C-A., Le Ralec A., Fabre F. (2010). The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *C. R. Biologies*, 333: 539–553.
- ❖ Delaney P. T., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weymann K., Negrotto D., Gaffney T., Gut-Rella M., Kessmann H., Ward E. and Ryals J. (1994). A Central Role of Salicylic Acid in Plant. *Disease Resistance*, 266 (5188): 1247-1250 DOI:10.1126/science.266.5188.1247.

- ❖ Dinant S. (2008). Phloème, transport interorgane et signalisation à longue distance. *C.R. Biologies* 331: 334-346.
- ❖ Durand- Tardif M. et Pelletier G. 2003. Apport de la biologie moléculaire et cellulaire à la protection des plantes. *C.R. Biologie* 326 : 23-26.
- ❖ Ehrlich P. R. et Raven P. H. (1964) "Butterflies and Plants: A Study in Coevolution" *.Evolution*, Vol. 18, No. 4: pp. 586-608.
- ❖ Enayati A. A., Ranson H. and Hemingway J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 14: 3-8.
- ❖ Fan S-G and Wu G-J 2005 Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 273-292.
- ❖ Feyereisen R., 2006. Evolution of insect P450. *Biochem Soc Trans*, 34:1252-1255.
- ❖ Figueroa C. C., Prunier-leterme N., Rispé C., Sepúlveda F., Fuentes-contreras E., Sabatermuñoz B. Simon J. C. and Tagu D. (2007). Annotated expressed sequence tags and xenobiotic detoxification in the aphid *Myzus persicae* Sulzer. *Insect Science*, 14, 29-45 DOI 10.1111/j.1744-7917.2007.00123.x.
- ❖ Flor H. H., 1971. Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 9, 275-296.
- ❖ Fragoyiannis D. A., McKinlay R. G., D’Mello J. P. F., 1998. Studies of the growth, development and reproductive performance of the aphid *Myzus persicae* on artificial diets containin genotypes resistant to fall armyworm and other Lepidoptera. *Plant Cell*, 12, 1031-1040.
- ❖ Framer E. E., Almèras. E., Krishmurti V., 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant*, 6: 372-378.
- ❖ Francis F., 2003. Interactions tritrophiques : étude du modèle *Brassicaceae* - Pucerons - Coccinelle prédatrice. Thèse de doctorat. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, 255 p.
- ❖ Francis F., Vanhaelen N and Haubruge E., 2005. Gluthathion S-transferases in the adaptation to plant secondary metabolite in the *Myzus persicae* aphide. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* ,58: 166-174.
- ❖ Fraval A. (2006). Les pucerons, 1<sup>ère</sup> partie. Office pour les insectes et leur environnement, France Insectes n° 141, p. 3-8. [www.inra.fr/ internet/Hebergement/OPIE-Insectes/pdf/i141fraval1.pdf](http://www.inra.fr/internet/Hebergement/OPIE-Insectes/pdf/i141fraval1.pdf).
- ❖ Giordanengo P., Brunissen L., Rusterucci C. Vincint C. Bel A. B., Dinant S., Girusse C. Faucher M. and Bonnemain J-L. (2010). Compatible plant-aphid interaction: How aphids manipulate plant responses. *C. R. Biologies* 333: 516-523.
- ❖ Giordanengo P., Febvay G., Rahbé Y. (2007). Comment les pucerons manipulent les plantes *BIOFUTUR* 279: 35- 38.
- ❖ Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 43: 205-227.
- ❖ Godin C et Boivin G. (2002). Guide d'identification des pucerons dans les cultures maraîchères au Québec. AAC-CRDH / PRISME. *Agriculture et Agroalimentaire Canada*: 33pages.

- ❖ Gomez D. E., Alonso D. F., Yoshiji H. and Thorgeirsson U. P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases : structure, relation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 74: 111-122.
- ❖ Gutierrez-Campos, R., Torres-Acosta J. A., Saucedo-Arias L. J., and Gomez-Lim M.A. (1999). The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature Biotech*, 17: 1223-1226.
- ❖ Harmel N., Francis F., Haubruge E., Giordanengo P. (2008). Physiologie des interactions entre pomme de terre et pucerons: vers une nouvelle stratégie de lutte basée sur les systèmes de défense de la plante. *Cahiers Agricultures*, 17 (4) :395-400.
- ❖ Harmel N., Mohamad R., Fauconnier M-L., Dujardin P., Verheggen F., Marlier M., Haubruge E. And Francis F. (2007). Role of terpenes from aphid-infested potato on searching and oviposition behavior of *Episyrphus balteatus*. *Insect Sci*, 14: 57-63.
- ❖ Hopkins G W., Évrard C-M. (2003). Physiologie végétale. *De Boeck Université*, 532p (pp 104).
- ❖ Hullé M. (1998). Les pucerons des arbres fruitiers: cycles biologiques et activités de vol. *Editions Quae*, 80 p.
- ❖ Hullé M., Ighil E., Turpeau-Ait, Robert Y. et Monnet Y. (1999). Les pucerons des plantes maraîchères. Cycles biologiques et activités de vol. *ACTA/INRA Éditions, Paris*, 136 p
- ❖ Hung, C. H., Huang C. C., Tsai W. S., Wang H. L., and Chen Y. L. Yuanpei J. 2003. Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Brassica campestris* Seeds. *Univ. Sci. Tech*, 10: 13-22.
- ❖ Johnson S. N., Douglas A. E., Woodward S. and Hartley E. S. (2003). Microbial impacts on plant-herbivore interactions: the indirect effects of a birch pathogen on a birch aphid. *Oecologia*, 134:388–396 DOI 10.1007/s00442-002-1139-6.
- ❖ Jourdan E., Ongena M. et Thonart P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 12 (4), 437-449.
- ❖ Kim S. T., Cho K. S., Kim S. G., Kang S. Y., Kang K. Y. (2003). A rice isoflavone reductase-like gene, OsIRL, is induced by rice blast fungal elicitor. *Mol Cell* 16: 224-231.
- ❖ Klarzinsky O., et Fritig B. (2001). Stimulation des défenses naturelles des plantes. *C. R. Acad. Sci.*, 324: 953-963.
- ❖ Lamb C. J., Dixon R. A. (1997). The toxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 4: 251-275.
- ❖ Le Roux V. (2007). *Solanum sauvages : une source de résistance aux aphides*. Thèse de l'Université de Picardie Jules, Amiens.
- ❖ Leclant F (2000). Les pucerons des plantes cultivées. Clefs d'identification: 3. Cultures fruitières Editions Quae, - 128 pages (pp 7-8).
- ❖ Lepoivre P. (2003). *Phytopathologie*. Editions De boeck Parie ,427p.
- ❖ Leroy P., Capella Q. et Haubruge E. (2009). Impact du miellat de puceron au niveau des relations tritrophiques entre les plantes-hôtes, les insectes ravageurs et leurs ennemis naturels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 13 (2), 325-334.
- ❖ Li X., Schuler, M. A. and Berenbaum M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52: 231–253.

- F., Alonso-Blanco C., Sanchez-Rodriguez C., Jorda L., Molina A. (2005). Erecta receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from Arabidopsis are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J*, 43: 165-180.
- ❖ Loayza-Muro R., Figueroa C. C. and Niemeyer H. M. (2000). Effect of two wheat cultivars differing in hydroxamic acid concentration on detoxifying and oxidative metabolism in the aphid *Sitobion avenae*. *Journal of Chemical Ecology*, 26 : 2725-2731.
  - ❖ Luwaert W. (2010). Contribution à l'étude protéomique de l'interaction plante/puceron et recherche d'éliciteurs de mécanismes de défense végétale dans la salive de *Myzus persicae*. *Travail de fin d'études. Gembloux Agrobiotech*.
  - ❖ Macheix J-J., Fleuriet A., Christian J-A. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Pur presses polytechniques- 192 p.
  - ❖ Mao W., Berhow M. A., Zangerl A. R., MCGovern J. and Berenbaum M. R. (2006) Cytochrome P450-Mediated Metabolism of Xanthotoxin by *Papilio multicaudatus*, *Chem Ecol*, 32(3):523-536
  - ❖ Martin G. B., Brommonschenkel S. H., Chunwongse J., Frary A., Ganai M. W., Spivey R., Wu T., Earle E. D., Tanksley S. D (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262: 1432-1436.
  - ❖ Martin-hernandez A. M., Dufrense M., Hugouvieux V., Melton R., Osbourn A. (2000). Effects of targeted replacement of the tomatinase gene on the interaction of septoria lycopersici with tomato plants. *Mol Plant-Microbe Interact*, 13: 1301 -1311.
  - ❖ Meite A., Kouame K. G. et Kati-Coulibaly S. (2006). Lectins: antinutritional substances? *Méd. Nut.*, 2006, 42 (4): 179-187.
  - ❖ Mello G. C., Oliva M. L.V., Sumikawa J. T., Machado O. L.T., Marangoni S., Novello J. C., and Macedo M. L. R. (2002). Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. *J. Protein Chem*. 20: 625-632.
  - ❖ Mercado-Blanco J. and Bakker P. A. H. M. (2007). Interactions between plants and beneficial pseudomonas spp: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92: 367- 368.
  - ❖ Molders W, Buchala A, and Métraux J-P. (1996). Transport of Salicylic Acid in Tobacco Necrosis Virus-Infected Cucumber Plants' *Plant Physiol*. 11 (2): 787-792
  - ❖ Mosolov V. V., Valueva T. A. (2005). Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Appl Biochem Microbiol*, 41: 261- 282.
  - ❖ Nasraoui B (2006). Les champignons parasites des plantes cultivées. Biologie, systématiques, pathologie, maladie. Centre de publication universitaire Tunis. pp 261-283
  - ❖ Nicole M-C. (2000). Les relations des insectes phytophages avec leurs plantes hôtes. Bulletin de la société d'entomologie du Québec. *Antennae*, 9 (1): 5p.
  - ❖ Ongena M. and Thonart P. (2006). Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses. Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues. 1<sup>st</sup> ed. Japan: *Global science Books*, 447-463.
  - ❖ Ongena M. et al., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol*, 9: 1084-1090.

- ❖ Ortéga X., Polanco R., Castaneda P., Perez L. M. (2002). Signal transduction in lemon seedlings in the hypersensitive response of Citrus limon against Alternaria alternaria: participation of calmodulin G-protein and protein kinase. *Biol Res*, 35: 373-383.
- ❖ Pal Vig A, Rampal G, Thind T. S. and Arora S. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates – A review WT. *Food Science and Technology*, 42 (10): 1561-1572
- ❖ Pare P. W. and Tumlinson J. H. (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*, 121: 325–331,
- ❖ Pechan, T., Ye J., Chang Y. M., Mitra A., Lin L., Davis F. M., Williams W. P. and Luthe D. S. (2000). A Unique 33-kD Cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other Lepidoptera. *Plant Cell*, 12, 1031-1040.
- ❖ Powell, K.S., Spence, J., Bharathi, M., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A. M. R. (1998). Immuno histochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). *J. Insect Physiol.* 44, 529–539.
- ❖ Ramussen J. R., Hammerschmidt R., ZooK M. N. (1991). Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol*, 97: 1342-1347.
- ❖ Romeis T., Piedras P., Zhang S., Klessig D.F., Hirt H., Jones J. D. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9- dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell*, 11: 273-287.
- ❖ Ross W., Dordschbal B., Seighardt J., Hiche M., Weiss D., Saalbach G. (1999). A redox-dependent G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica*. *Biochem Biophys Acta*, 1448: 390-402.
- ❖ Rougé P., Culerrier R., Granier C., Rancé F., Barre A. (2010). Peanut lectin. *Revue Française d'Allergologie*, 50 (3): 281-284. Doi : 10.1016/j.reval.2010.01.008.
- ❖ Ryan CA. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 28:425-49.
- ❖ Sadeghi A, Van Damme Els J. M., Michiels K, Kabera A, Smagghe G. (2009). Acute and Chronic Insecticidal Activity of a New Mannose-Binding Lectin from *Allium Porrum* against *Acyrtosiphon pisum* via an Artificial Diet. *The Canadian Entomologist*, 141(1):95-101. doi: 10.4039/n08-060.
- ❖ Sasabe M, Takeuchi K, Kamoun S, Ichinose Y, Govers F, Toyoda K, Shiraishi T, Yamada T (2000). Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *Eur J Biochem* 267: 5005–5013
- ❖ Sauvion N, Charles H, Febvay G, Rahbé Y. (2003). Effects of jack bean lectin (ConA) on the feeding behaviour and kinetics of intoxication of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Article first published online. DOI: 10.1111/j.0013-8703.2004.00117.x

- ❖ Schaller F., Schaller A. and Stintzi A. (2004). Biosynthesis and Metabolism of Jasmonates *Journal of Plant Growth Regulation*, 23 (3): 179-199, DOI: 10.1007/s00344-004-0047-x (Résumé).
- ❖ Schimoler-O'Rourke R., Richardson M., Selitrennikoff C. P. (2001). Zea maitin inhibits trypsin and  $\alpha$ -amylase activities. *Appl Environ Microbiol*, 67: 2365- 2366.
- ❖ Shewry, P. R. 2003. Tuber storage proteins. *Ann. Bot.* 91: 755-769.
- ❖ Smith C. M. et Boyko E.V. (2007).The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 122, (1):1–16. DOI: 10.1111/j.1570-7458.2006.00503.x.
- ❖ Soares-Costa A., Beltramini L., Thieman O. and. Henrique-Silva F. 2002. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 1194-1199.
- ❖ Spoel S. H., Johnson J. S. and Dong X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 18842-18847.
- ❖ Spoel S.H., Koornneef A., Claessens SMC, Korzelius J. P., Van Pelt J. A., Mueller M. J., Buchala A. J., Métraux J. P., Brown R., Kazan K. et al. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*15:760–770
- ❖ Tenhaken R., Levine A., Brisson L. F., Dixon R. A., Lamb C. (1995). Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 4158-4163.
- ❖ Van Damme E. J. M., Peumans W. J., Barre A and Rougé P. (1998). Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit Rev Plant Sci*, 17:575-692.
- ❖ Vandendorre G, Smaghe G, Van Damme E. J. M. (2011). Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry in presse*.
- ❖ Verberne M .C., Budi Muljono A. B. Verpoorte R. (1999). Salicylic acid and biosynthesis. In: libbenga K., Hall M., Hooykaas P.J.J., *Biochemistry and molecular biology of plant hormones*. Elsevier, London, 295-312.
- ❖ Vernooij B., Friedrich L., Morse A., Reist R., Kolditz-Jawhar R., Ward E., Uknes S., kessmann H., Ryals J. (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant cell*, 6: 959-965.
- ❖ Viard M. P., Martin F., Pugin A., Ricci P., Blein J.P. (1994). Protein phosphorylation is induced in tobacco cell by elicitor cryptogein. *Plant Physiol*, 104: 1245-1249.
- ❖ Voet D.et Voet J. G. (2005). *Biochimie De Boeck Supérieur*, 1600 pages (pp 523-524).
- ❖ Ward E. R., Uknes S. J., Williams S. C., Dincher S. S., Wiederhold D. L., Alexander D. C., Ahl-Goy P., Metraux J. P., Ryals J. A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 3: 1085-1094.
- ❖ Wilhelm N. (1998). *Botanique générale. De Boeck Supérieur*, - 624 pages.

- ❖ Wittstock U, Kliebenstein D. J., Virginia L., Michael R. and Gershenzon J. (2003). Chapter five Glucosinolate hydrolysis and its impact on generalist and specialist insect herbivores. *Recent Advances in Phytochemistry Volume 37*, Pages 101-125.
- ❖ Zehnder C. and Hunter M. (2008). Effects of nitrogen deposition on the interaction between an aphid and its host plant. *Ecological Entomology*, 33, 24–30.
- ❖ Zhao J. et wang X. (2004). Arabidopsis phospholipase D- 1 interacts with heterotrimeric G-protein  $\alpha$ -subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 279 1794-1800.

## ANNEXES

### 1. Composition du milieu de culture des cellules d'*A. thaliana*

- ❖ Milieu de culture (composition par litre d'eau distillée) :
  - 3,2g de Gamborg B5
  - 30g de sucrose
  - 0,5g de MES
- ❖ Ajuster le pH à 5,7 avec KOH
- ❖ -100 µl de 2,4 D (Concentration stock= 10 mg/ml)
  - 100 µl de kinétine (Concentration stock= 1 mg/ml Ethanol/DMSO).
- ❖ Chaque semaine 5 ml de cellules dans 45 ml de milieu
- ❖ 90-110 RPM à 23-25°C

### 2. Analyses statistiques

#### ❖ Effet d'une infection de *B. cinerea* sur les paramètres biologiques de *M. persicae*

Test T à 2 échantillons et IC : Témoin; Traité (sur le nombre total d'individus)

		ErT		
	N	Moyenne	EcTyp	moyenne
Témoin	40	17,45	9,93	1,6
Traité	40	9,63	6,78	1,1

Différence =  $\mu$  (Témoin) -  $\mu$  (Traité)

Estimation de la différence : 7,82

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (4,03 ; 11,62)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 4,12 Valeur de p = 0,000 DL = 68

Test T à 2 échantillons et IC : Témoin; Traité (Sur la fécondité)

		ErT		
	N	Moyenne	EcTyp	moyenne
Témoin	40	10,60	7,06	1,1
Traité	40	4,97	4,70	0,74

Différence =  $\mu$  (Témoin) -  $\mu$  (Traité)

Estimation de la différence : 5,63

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (2,95 ; 8,30)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 4,19 Valeur de p = 0,000 DL = 67

#### ❖ Effet d'une infestation de *M. persicae* sur le développement de *B. cinerea*

##### Test du Khi deux : témoin; traité

Les dénombrements attendus sont imprimés sous ceux observés

Les contributions Khi deux sont imprimées sous les dénombrements attendus

	Témoin	Traité	Total
1	84	78	162
	82,04	79,96	
	0,047	0,048	
2	34	37	71
	35,96	35,04	

0,107 0,109

Total 118 115 233

Khi deux = 0,310 ; DL = 1 ; Valeur de p = 0,577

❖ **Effet de l'acide salicylique sur les paramètres biologiques de *M. persicae* sur *A. thaliana***

Test T à 2 échantillons et IC : Témoin; Traité (sur le nombre total d'individus)

			ErT
	N	Moyenne	EcTyp moyenne
Témoin	30	14,63	8,57 1,6
Traité	30	10,50	8,15 1,5

Différence = mu (Témoin) - mu (Traité)

Estimation de la différence : 4,13

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (-0,19 ; 8,46)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 1,91 Valeur de p = 0,061 DL = 57

Test T à 2 échantillons et IC : Témoin; Traité (sur la fécondité)

			ErT
	N	Moyenne	EcTyp moyenne
Témoin	30	8,57	6,20 1,1
Traité	30	5,90	5,09 0,93

Différence = mu (Témoin) - mu (Traité)

Estimation de la différence : 2,67

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (-0,27 ; 5,60)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 1,82 Valeur de p = 0,074 DL = 55

❖ **Effet de l'acide salicylique sur développement de *B. cinerea* sur *A. thaliana***

**Test du Khi deux : Témoin; Traité**

Les dénombrements attendus sont imprimés sous ceux observés

Les contributions Khi deux sont imprimées sous les dénombrements attendus

	Témoin	Traité	Total
1	15	20	35
	15,27	19,73	
	0,005	0,004	
2	9	11	20
	8,73	11,27	
	0,009	0,007	

Total 24 31 55

Khi deux = 0,024 ; DL = 1 ; Valeur de p = 0,877

❖ **Effet de l'acide jasmonique sur les paramètres biologiques de *M. persicae* (sur *A. thaliana*)**

Test T à 2 échantillons et IC : Témoin; Traité (sur le nombre total d'individus)

		N	Moyenne	EcTyp	ErT moyenne
Témoin	30	13,67	6,52	1,2	
Traité	30	9,50	5,58	1,0	

Différence =  $\mu$  (Témoin) -  $\mu$  (Traité)

Estimation de la différence : 4,17

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (1,03 ; 7,30)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 2,66 Valeur de p = 0,010 DL = 56

**Test T à 2 échantillons et IC : Témoin; Traité (sur la fécondité)**

		N	Moyenne	EcTyp	ErT moyenne
Témoin	30	7,17	4,60	0,84	
Traité	30	5,03	3,54	0,65	

Différence =  $\mu$  (Témoin) -  $\mu$  (Traité)

Estimation de la différence : 2,13

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (0,01 ; 4,26)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 2,01 Valeur de p = 0,049 DL = 54

❖ **Effet de l'acide jasmonique le développement de *B. cinerea* (sur *A. thaliana*)**

**Test du Khi deux : Témoin; Traité**

Les dénombrements attendus sont imprimés sous ceux observés

Les contributions Khi deux sont imprimées sous les dénombrements attendus

	Témoin	Traité	Total
1	17	22	39
	16,79	22,21	
	0,003	0,002	
2	14	19	33
	14,21	18,79	
	0,003	0,002	
Total	31	41	72

Khi deux = 0,010 ; DL = 1 ; Valeur de p = 0,921

❖ **Effet de la surfactine sur les paramètres biologiques de *M. persicae* (sur *A. thaliana*)**

**Test T à 2 échantillons et IC : Témoin; Traité (sur le nombre total d'individus)**

		N	Moyenne	EcTyp	ErT moyenne
Témoin	60	33,0	13,4	1,7	
Traité	60	23,97	9,88	1,3	

Différence =  $\mu$  (témoin) -  $\mu$  (traité)

Estimation de la différence : 9,02

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (4,76 ; 13,27)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 4,20 Valeur de p = 0,000 DL = 108

**Test T à 2 échantillons et IC : témoin; traité (sur la fécondité)**

	N	Moyenne	EcTyp	ErT moyenne
Témoin	60	27,5	12,3	1,6
Traité	60	19,03	8,45	1,1

Différence = mu (témoin) - mu (traité)

Estimation de la différence : 8,43

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (4,61 ; 12,26)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 4,37 Valeur de p = 0,000 DL = 104

**❖ Effet de l'acide jasmonique sur les paramètres biologiques de *M. persicae* (sur *S. tuberosum*)**

**Test T à 2 échantillons et IC : Témoin; Traité (sur le nombre total d'individus)**

	N	Moyenne	EcTyp	ErT moyenne
Témoin	30	16,9	12,9	2,4
Traité	30	12,40	9,60	1,8

Différence = mu (Témoin) - mu (Traité)

Estimation de la différence : 4,47

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (-1,43 ; 10,36)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 1,52 Valeur de p = 0,135 DL = 53

**Test T à 2 échantillons et IC : Témoin; Traité (sur la fécondité)**

Test t à 2 échantillons de Témoin et Traité

	N	Moyenne	EcTyp	ErT moyenne
Témoin	30	11,57	8,79	1,6
Traité	30	8,57	6,98	1,3

Différence = mu (Témoin) - mu (Traité)

Estimation de la différence : 3,00

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (-1,11 ; 7,11)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 1,46 Valeur de p = 0,149 DL = 55

**❖ Effet comparé des fécondités des différents traitements**

Test de Kruskal-Wallis : fécondité en fonction de traitement (sur *A. thaliana*)

Traitement	N	Médiane	Rang moyen	Z
Botrytis	40	3,000	51,6	-4,56
JA	30	6,000	55,2	-3,32
SA	30	4,500	58,4	-2,90
Surfactine		60	19,000	123,5
Global	160		80,5	9,09

B H = 83,00 DL = 3 P = 0,000

H = 83,25 DL = 3 P = 0,000 (ajusté pour les nombres de même grandeur)

❖ **Effet comparé des fécondités entre JA et SA en fonction des espèces de plantes**

**Test T à 2 échantillons et IC : SA; JA (sur *S. tuberosum*)**

			ErT	
	N	Moyenne	EcTyp	moyenne
SA	30	10,80	6,60	1,2
JA	30	8,57	6,98	1,3

Différence =  $\mu$  (SA) -  $\mu$  (JA)

Estimation de la différence : 2,23

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (-1,28 ; 5,75)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 1,27 Valeur de p = 0,208 DL = 57

**Test T à 2 échantillons et IC : SA (*S. tuberosum*) ; SA (*A. thaliana*)**

			ErT	
	N	Moyenne	EcTyp	moyenne
SA <i>S. tuberosum</i>	30	10,80	6,60	1,2
SA <i>A. thaliana</i>	30	5,90	5,09	0,93

Différence =  $\mu$  (SA *S. tuberosum*) -  $\mu$  (SA *A. thaliana*)

Estimation de la différence : 4,90

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (1,85 ; 7,95)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 3,22 Valeur de p = 0,002 DL = 54

**Test T à 2 échantillons et IC : JA (*S. tuberosum*); JA (*A. thaliana*)**

			ErT	
	N	Moyenne	EcTyp	moyenne
JA <i>S. tuberosum</i>	30	8,57	6,98	1,3
JA <i>A. thaliana</i>	30	5,03	3,54	0,65

Différence =  $\mu$  (JA *S. tuberosum*) -  $\mu$  (JA *A. thaliana*)

Estimation de la différence : 3,53

Limites de confiance (à 95 %) pour la différence : (0,65 ; 6,42)

Test t de la différence = 0 (contre pas =) : Valeur de T = 2,47 Valeur de p = 0,017 DL = 42