

**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.**

WILLIAM LUWAERT

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

ANNEE ACADEMIQUE 2009-2010

PROMOTEUR : PR. FREDERIC FRANCIS

Remerciements

A l'issue de ce travail, mes remerciements vont tout d'abord à mon promoteur, monsieur le Professeur Frédéric Francis, pour m'avoir permis de réaliser mon travail au sein de l'Unité d'Entomologie ainsi que pour ses conseils avisés.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères à Sophie Vandermoten, pour son aide précieuse ainsi que son encadrement dans la réalisation de ce travail. Merci également à Lionel Hartert, Guillaume Henry et Nicolas Poncelet pour leurs explications et leur patience.

Enfin je remercie aussi :

Les Unités de Microbiologie, Bio-industries et Biologie Moléculaire, pour avoir mis à ma disposition leurs équipements,

Tous les membres de l'Unité d'Entomologie, pour leur sympathie et leur bonne humeur,

Mes parents et Didi, pour leur soutien durant ces 5 années d'études,

Fanny, pour sa présence à mes côtés et les moments partagés depuis presque 2 ans,

Et enfin tous mes amis (tout particulièrement Polé, Massa, Hélène, Delphine, Gérard, Tanguy, Max, Slimane, Caro et Jérémy), parce que je pourrai toujours compter sur eux.

Résumé

La salive des insectes joue un rôle important dans la mise en place des mécanismes de défense chez les plantes et encore peu d'études se sont intéressées à l'identification d'éliciteurs dans la salive de pucerons.

Pour cette étude, trois volets sont investigués. Premièrement, une approche protéomique a été développée afin d'analyser les protéines exprimées différemment suite à différentes périodes d'infestation de *Myzus persicae* chez *Arabidopsis thaliana*. Nous avons également effectué des mesures de pH et de burst oxydatif sur une suspension cellulaire de tabac afin de démontrer le pouvoir éliciteur de la salive. Une approche génomique a également été développée afin de cloner un gène codant pour une glucose oxydase (GOX). En effet, cet éliciteur, connu notamment chez les Lépidoptères, a été identifié dans la salive de *M. persicae*. Le but est donc de démontrer l'activité élicitrice de la protéine recombinante.

A l'issue de ce travail, nous avons observé une expression protéique différentielle chez *A. thaliana* suite à l'infestation de *M. persicae*. L'identification des protéines n'ayant pas encore été réalisée, nous ne connaissons pas encore la nature de ces protéines induites.

Nous avons également remarqué que l'ajout de diète contenant de la salive de puceron pouvait provoquer, chez les cellules de tabac, une modification de pH similaire à celle observée avec la surfactine, éliciteur de référence. Cependant la réponse est peut-être la conséquence d'un effet tampon dû au pH basique de la diète.

Enfin, nous avons réalisé le clonage d'un gène codant pour une GOX mais l'expression de la protéine d'intérêt dans *E. coli* est faible. Les protocoles d'expression et de purification de la protéine recombinante doivent être optimisés, de manière à pouvoir procéder à des tests (mesure de pH, burst oxydatif) sur cellules de tabac.

Abstract

The role of insect saliva is crucial concerning establishment of defence mechanisms in plants. Up to now, only few studies focused on the identification of elicitors in aphid saliva.

For this study, we used three approaches. First, we developed a proteomic approach to analyse differentially expressed proteins after two infestation periods by *Myzus persicae* in *Arabidopsis thaliana*. We also measured pH evolution and oxidative burst on Tobacco cell suspension to show elicitor effect of saliva. A genomic approach was also developed to clone a gene coding for glucose oxidase (GOX). Indeed, this elicitor is well known in Lepidoptera and was recently identified in *M. persicae* saliva. So we'll try to demonstrate elicitor activity of recombinant protein.

Following this work, we observed a differential protein expression in *A. thaliana* after *M. persicae* infection. Identification of proteins have not yet been achieved. We do not know the nature of these induced proteins.

We also noticed that the addition of a diet containing aphid saliva in tobacco cells could cause a pH change similar to that seen with the surfactin. However, the answer may be the result of a pH buffering effect due to the basic diet.

Finally, we performed the cloning of a gene encoding for a GOX but the expression in *E. coli* of the protein of interest is low. Protocols of expression and purification of the recombinant protein must be optimized to enable tests (pH and oxidative burst) on Tobacco cells.

Liste des abréviations

2D-DIGE : 2 Dimensions-Differential In Gel Electrophoresis

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

APS : Ammonium persulfate

ASB 14 : Amidosulfo-betaine-14

BLAST: Basic local alignment sequence tool

DTT: Dithiothreitol

EDTA : Ethylène diamine tétra acétique

EGTA : Ethylène glycol tétra acétique

EPG : Electrical penetration graph

EST : Expressed sequence tag

ET : Ethylène

FAO : Formes actives de l'oxygène

GLD : Glucose déshydrogénase

GMC : Glucose-Méthanol- Choline

GOX : Glucose oxydase

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

IAA : Iodoacétamide

IEF: Focalisation isoélectrique

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

JA : Acide jasmonique

LOX : Lipoxygénase

MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation

MAP kinase : Mitogen activated protein kinase

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

PAMPs : Pathogen associated molecular pattern

pI: Point isoélectrique

PCR : Polymerisation chain reaction

PMT : PhotoMultiplierTubes

Protéines PR : Protéines liées à la pathogénie

RH : Réaction hypersensible

RPM : Revolutions per minute

RSA : Résistance systémique acquise

SA : Acide salicylique

SOD : Superoxyde dismutase

SDS: Sodium dodecylsulfate

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TAE : Tris-acétate-EDTA

TCA : Acide trichloro-acétique

TABLES DES MATIERES

1	INTRODUCTION	10
2	OBJECTIFS	11
3	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : LES DEFENSES CHEZ LES PLANTES.....	12
3.1	INTRODUCTION	12
3.1.1	<i>Généralités</i>	<i>12</i>
3.1.2	<i>Complexité de la réponse de défense</i>	<i>14</i>
3.2	RECONNAISSANCE DES PATHOGENES PAR LA PLANTE	14
3.2.1	<i>Les éliciteurs généraux.</i>	<i>15</i>
3.2.2	<i>Les éliciteurs spécifiques.</i>	<i>18</i>
3.2.3	<i>Les éliciteurs chez les insectes</i>	<i>19</i>
3.2.4	<i>Eliciteurs : salives et miellat chez le puceron.....</i>	<i>20</i>
3.3	LA TRANSDUCTION DU SIGNAL	23
3.3.1	<i>Les réactions de phosphorylation/déphosphorylation des protéines</i>	<i>24</i>
3.3.2	<i>Les flux ioniques</i>	<i>24</i>
3.3.3	<i>La production de formes actives de l'oxygène, burst oxydatif.....</i>	<i>25</i>
3.4	LES VOIES DE SIGNALISATION INTERCELLULAIRES	27
3.4.1	<i>La voie de l'acide salicylique</i>	<i>28</i>
3.4.2	<i>La voie des jasmonates et de l'éthylène</i>	<i>28</i>
3.4.3	<i>Les interactions entre les différentes voies</i>	<i>29</i>
3.4.4	<i>Le cas des insectes piqueurs / suceurs</i>	<i>30</i>
3.5	LES MECANISMES DE DEFENSE.....	31
3.5.1	<i>Les protéines PR (pathogenesis related)</i>	<i>31</i>
3.5.2	<i>La réaction d'hypersensibilité</i>	<i>33</i>
3.5.3	<i>Renforcement des parois cellulaires</i>	<i>33</i>
3.5.4	<i>Les métabolites secondaires</i>	<i>34</i>
3.5.5	<i>Les émissions de composés volatils</i>	<i>34</i>
4	MATERIEL ET METHODES	36
4.1	MATERIEL BIOLOGIQUE DE BASE	36
4.2	COLLECTE DE SALIVE DE M. PERSICAE	36
4.3	APPROCHE CELLULAIRE : IMPACT DE DIFFERENTS ELICITEURS SUR DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE TABAC EN TERMES DE pH ET DE BURST OXYDATIF	37
4.3.1	<i>Suspensions cellulaires de tabac</i>	<i>37</i>
4.3.2	<i>Mesure de l'évolution du pH dans le milieu de culture</i>	<i>37</i>
4.3.3	<i>Mesure du burst oxydatif</i>	<i>38</i>
4.4	APPROCHE GENOMIQUE : CLONAGE DU GENE CODANT POUR LA GOX	39
4.4.1	<i>Extraction d'ARN total</i>	<i>39</i>
4.4.2	<i>Synthèse de cDNA simple brin pour PCR classique</i>	<i>39</i>
4.4.3	<i>Synthèse de cDNA double brin et amplification</i>	<i>39</i>
4.4.4	<i>Préparation des cellules compétentes.....</i>	<i>42</i>
4.4.5	<i>Transformation des bactéries par la méthode du choc thermique.</i>	<i>43</i>
4.4.6	<i>Clonage dans le vecteur d'expression pQE30-Xa</i>	<i>44</i>
4.4.7	<i>Expression protéique à partir de cultures bactériennes d'E. coli.</i>	<i>49</i>
4.4.8	<i>Purification de la protéine recombinante</i>	<i>49</i>
4.5	APPROCHE PROTEOMIQUE	49
4.5.1	<i>Plan expérimental</i>	<i>50</i>
4.5.2	<i>Extraction des protéines</i>	<i>51</i>
4.5.3	<i>Quantification des protéines</i>	<i>52</i>
4.5.4	<i>Marquages aux CyDyesTM</i>	<i>52</i>
4.5.5	<i>Séparation des protéines</i>	<i>52</i>
4.5.6	<i>Révélation des spots protéiques</i>	<i>56</i>
4.5.7	<i>Analyse d'image</i>	<i>57</i>

4.5.8	<i>Spot picking</i>	57
5	RESULTATS ET DISCUSSION	58
5.1	APPROCHE PROTEOMIQUE	58
5.1.1	<i>Extraction des protéines</i>	58
5.1.2	<i>Expression protéique différentielle</i>	58
5.1.3	<i>Identification des protéines</i>	61
5.2	APPROCHE CELLULAIRE.....	61
5.2.1	<i>Evolution du pH extracellulaire</i>	61
5.2.2	<i>Mesure du burst oxydatif</i>	65
5.3	APPROCHE GENOMIQUE	66
5.3.1	<i>Clonage d'un ADNc codant la glucose oxydase chez M. persicae</i>	66
5.3.2	<i>Essais d'expression dans E. coli</i>	69
6	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	74

TABLE DES FIGURES

Figure 1: La théorie "gène pour gène"	18
Figure 2: Différentes phases de sécrétions salivaires chez le puceron.....	22
Figure 3: Evènements cellulaires que l'on observe suite à l'élicitation chez des cellules de tabac (Jourdan et al., 2008)	23
Figure 4: Classification des protéines PR (Van Loon et Van Strien, 1999).....	32
Figure 5: Schéma simplifié de la voie de la LOX	35
Figure 6: vecteur pTZ57R/T	42
Figure 7: schéma du vecteur pQE30-Xa	47
Figure 8: Procédé de dénaturation des protéines en présence de SDS	53
Figure 9 : Gel 2D reprenant les protéines exprimées de manière différentielle chez les cellules de tabac traitées avec la diète contenant la salive de <i>M. persicae</i>	59
Figure 10: Gel 2D reprenant les protéines exprimées de manière différentielle sur feuilles d' <i>A. thaliana</i> traitées avec la diète contenant la salive ainsi qu'avec du miellat	60
Figure 11: Evolution du pH extracellulaire après ajout de 200 µl de diète et 200 µl de diète avec salive	62
Figure 12: Evolution du pH extracellulaire après ajout de 400 µl de diète et 400 µl de diète avec salive	62
Figure 13: Ecart maximum de pH observés lors des différents traitements (surfactine, diète 200 µl, diète et salive 200µl, diète 400 µl, diète et salive 400 µl)	64
Figure 14: Emission de photons en fonction du temps	66
Figure 15 : Séquences en acides aminés des deux peptides identifiés chez <i>M.persicae</i>	67
Figure 16 : Alignement des deux EST de <i>M. persicae</i> sur la séquence de <i>A. pisum</i>	68
Figure 17: Séquence codante de la GOX et niveau d'appartenance à la superfamille des GMC	69
Figure 18: Gel 1D reprenant les différentes fractions à partir de l'étape d'induction jusqu'à la purification [NI : non induit ; I : induit ; Pellet : culot ; SN : surnageant ; FLT : flow through ; Wash : wash ; Elution : elution]	71

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Séquences et température de fusion des amorces utilisées	40
Tableau 2: Combinaisons d'amorces utilisées	40
Tableau 3 : Programme utilisé lors de la PCR	41
Tableau 4: Programme utilisé pour la PCR.....	44
Tableau 5 : Plan expérimental de l'analyse protéomique des plantes entières d'A. thaliana élicitées par salive et miellat de pucerons.	51
Tableau 6: Programme de focalisation électrique	54
Tableau 7: Composition des gels de polyacrylamide	55
Tableau 8 : Longueurs d'onde des filtres d'émission et caractéristiques des CyDyes™	56
Tableau 9: Absorbances mesurées à 400nm pour différentes concentrations en GOX pure ..	72
Tableau 10: Absorbances mesurées à 400 nm et concentrations des différentes fractions de la purification de la protéine recombinante.....	72

1 Introduction

Dans leur environnement, les plantes sont soumises à de nombreuses agressions biotiques et abiotiques. Les relations qui existent entre les végétaux et les espèces phytophages qui s'en nourrissent sont étroites, complexes et variées. En effet, l'instinct botanique décrit par Fabre au 19^{ème} siècle selon lequel les insectes étaient capables de sélectionner des végétaux de taxa relativement proches, a laissé la place à des théories basées sur la mémorisation des caractères physiques des plantes et sur la co-évolution biochimique. Cette dernière développée par Ehrlich et Raven (1964) suggère que l'utilisation d'une espèce végétale par des insectes phytophages entraîne la synthèse de métabolites secondaires chez la plante hôte. La co-évolution est un processus dynamique entre les adaptations biochimiques des insectes phytophages et les réponses de la plante capable de développer d'autres mécanismes de défense.

Les plantes, comparées aux organismes capables de se déplacer, ne peuvent éviter les attaques de leurs ennemis naturels et doivent mettre en place des mécanismes de défense efficaces. Les dégâts occasionnés par les insectes phytophages (broyage, piqûre) ont un rôle important en ce qui concerne la mise en place des mécanismes de défense. En effet, il semblerait que chaque espèce d'insectes possède sa propre signature moléculaire lors de leur alimentation. Chez les larves de Lépidoptères, différents éliciteurs ont été identifiés : la volicitine dans les excréments oraux de *Spodoptera exigua* L. (Turlings et al., 2000), une β -glucosidase chez *Pieris brassicae* (Mattiacci et al., 1995) et un lysozyme dans la salive d'*Helicoverpa zea* (Liu et al., 2004). Cependant, chez des insectes de type piqueurs suceurs comme les pucerons, peu d'études ont été menées malgré l'identification d'activités enzymatiques. Ce n'est que très récemment que d'éventuels éliciteurs ont été identifiés dans les salives de pucerons dont une glucose oxydase également retrouvée chez Lépidoptères (Eichenseer et al., 1999).

La poursuite de l'identification des éliciteurs présents dans les salives de pucerons a pour objectif, à terme, de produire une formulation permettant la stimulation préalable des défenses végétales avant l'apparition des dégâts occasionnés par les insectes ravageurs.

2 Objectifs

Dans le cadre de cette étude, plusieurs aspects concernant les interactions plante/puceron seront envisagés. Tout d'abord, nous allons comparer le protéome de plants d'*Arabidopsis thaliana* sains avec des plants infectés par des salives de *Myzus persicae* ainsi que par du miellat de *A. pisum*. Cette étude permettra la poursuite de l'identification de protéines de défense chez cette plante modèle. La méthode utilisée pour la comparaison des expressions protéiques entre plantes saines et infectées est le 2D-DIGE (2 Dimensions-Differential In Gel Electrophoresis). L'identification des protéines est réalisée grâce à la spectrométrie de masse.

Ensuite, nous allons mesurer les modifications de pH et le burst oxydatif d'une suspension cellulaire de tabac afin de mettre en évidence dans la salive de *M. persicae*, une éventuelle activité élicitrice.

Dans un troisième temps, nous allons réaliser le clonage d'un gène codant pour la glucose oxydase. Une fois le gène cloné, la protéine recombinante sera exprimée dans une bactérie et l'objectif sera d'observer la potentielle activité élicitrice de la protéine sur des cellules de tabac.

3 Etude bibliographique : Les défenses chez les plantes

Les mécanismes de défense chez les plantes peuvent être séquencés en 3 phases : reconnaissance, transduction du signal et réaction. Ces trois événements seront décrits en détails dans les chapitres suivants.

3.1 Introduction

Les plantes, contrairement à d'autres organismes vivants, n'ont pas la capacité de se déplacer. Ces dernières sont soumises au cours de leur développement à des attaques de leur environnement d'une part et de leurs ennemis naturels et de pathogènes d'autre part. Pour faire face à ces agressions, elles ont dû mettre en place des mécanismes de défense complexes et variés.

La plupart du temps, lorsqu'une plante est attaquée par un agent pathogène, la première réaction que l'on peut observer est la mort cellulaire au niveau du site d'infection. Il s'en suit alors l'émission de molécules servant de signaux d'alerte aux cellules avoisinantes. Celles-ci mettent alors en place des mécanismes de défense adaptés (callose, lignification), afin de confiner l'agent pathogène à la zone d'infection. C'est la réaction hypersensible (Klarzynski et Fritig, 2001)

Cette réaction peut être suivie d'une résistance systémique acquise dont le but sera de protéger l'ensemble de la plante à plus long terme. La stimulation artificielle de cette résistance présente un intérêt agronomique car elle peut permettre de prévenir l'apparition des dégâts occasionnés par les pathogènes et de limiter les apports de pesticides. Il est donc essentiel de connaître tous les mécanismes impliqués pour proposer des solutions utilisables dans le milieu agricole.

3.1.1 Généralités

Les mécanismes de défense peuvent être classés en deux parties : les mécanismes passifs ou constitutifs, opposés aux mécanismes actifs ou induits lors desquels la synthèse de composés défensifs sont synthétisés en réponse à une attaque (Harborne, 1988).

Les défenses constitutives sont celles qui sont déjà présentes au niveau de la plante avant une quelconque agression. Il peut s'agir d'épines, d'une barrière mécanique comme une production de lignine ou de résines par exemple, d'un message biochimique agissant comme anti-appétant pour des insectes, ou enfin d'un composé toxique (Maffei et al., 2007). Il existe une large gamme de toxicité en ce qui concerne les composés de défense : perturbation des membranes, inhibition de la transduction de signaux, inhibition du métabolisme, perturbation hormonale et des processus de développement (Harborne, 1988 ; Bennett et Wallsgrove, 1994).

Les défenses induites sont quant à elles mises en place suite à l'attaque de la plante par un agresseur. Ces dernières peuvent être classées en modes de protection directs et indirects. Le renforcement cellulaire et l'accumulation de protéines PR sont par exemple des défenses directes, tandis que l'émission de composés organiques volatils dans le but d'attirer un ennemi naturel d'un ravageur, sont considérées comme des défenses indirectes (Leitner et al., 2005). Les défenses induites ont généralement une action systémique. Non seulement la réaction de défense se produit à proximité de l'emplacement des dommages causés, mais la réaction se produit aussi dans toute la plante suite aux molécules responsables de transmettre le signal aux différents tissus végétaux (Gatehouse, 2002). Un exemple de mécanisme de défense induit est la synthèse d'inhibiteurs de protéases dans les feuilles de *Solanum tuberosum* L. et de *Lycopersicon esculentum* L. lors d'attaques de larves de *Manduca sexta* L.. La défense induite n'est pas suffisante pour rendre la plante totalement résistante à d'autres attaques, mais on observe des meilleurs résultats en termes de réduction de croissance du ravageur que si la synthèse d'inhibiteurs de protéases n'avait pas eu lieu (Howe et al., 1996).

La distinction entre défenses actives et passives est cependant inappropriée lorsqu'on les observe au niveau moléculaire. En effet, les composés produits sont parfois les mêmes dans les défenses actives et passives. C'est notamment le cas des inhibiteurs de protéases que l'on retrouve chez la pomme de terre lorsque celle-ci est soumise à une attaque quelconque et que l'on retrouve également chez les tubercules en tant que défenses constitutives (Garcia-Olmedo et al., 1987).

3.1.2 Complexité de la réponse de défense

Les récentes avancées en matière de bioinformatique et de génomique ont permis une meilleure compréhension de l'ensemble des gènes liés qui ont un rôle et des fonctions biologiques chez les animaux, les plantes et les microbes (Zhu-Salzman et al., 2005). Les changements dans l'expression des gènes suite aux mécanismes de défense induits par les pathogènes sont connus pour être complexes et à multiples facettes (Moran et Thompson, 2001).

Chez la plante, la complexité de la réponse moléculaire induite est relativement importante. En effet, chez *Sorghum bicolor* L., on a découvert que plus de 80 gènes étaient sur- ou sous-régulés suite à l'action du puceron vert *Schizaphis graminum* (Rondani) (Zhu-Salzman et al., 2004). Chez *Arabidopsis thaliana* L., un groupe de 150 gènes sont régulés différemment en réponse à des dégâts occasionnés par des chenilles de *Pieris rapae* L. (Reymond et al., 2000). Une autre étude montre qu'environ 500 gènes sont exprimés de manière différentielle lorsque le tabac, *Nicotiana attenuata* Torr. ex S. Wats., était infesté par le sphinx du tabac, *Manduca sexta* L. (Hermsmeier et al., 2001). Enfin, 100 gènes sont également exprimés différemment chez *Phaseolus lunatus* L. lors d'attaques de *Tetranychus urticae* Koch. (Arimura et al., 2000).

L'ensemble des gènes qui sont exprimés lors de ces différentes agressions, code pour des protéines impliquées dans les mécanismes de défense, les voies de signalisation, le métabolisme secondaire, le stress abiotique, l'entretien cellulaire et la photosynthèse. Le large éventail de transcrits lors d'agressions par des insectes montre la complexité qui existe au niveau des mécanismes de défense. Cependant, la majorité de cette complexité n'est pas due à l'expression de gènes codant pour des produits directement impliqués dans la résistance aux ravageurs (Zhu-Salzman et al., 2004). Par exemple, Hermsmeier et al. (2001) ont montré que des gènes impliqués dans la photosynthèse étaient sous régulés lors de la réponse aux attaques d'insectes. Il s'agit certainement d'une réallocation du maximum d'énergie afin de privilégier les mécanismes de défense au détriment de fonctions moins importantes.

3.2 Reconnaissance des pathogènes par la plante

Les signaux responsables de l'activation des défenses des plantes ne sont pas seulement mécaniques mais également chimiques. La reconnaissance d'un organisme

phytopathogène par la plante et les mécanismes de défense qui en découlent, résulte de la perception de molécules appelées éliciteurs. Il existe deux types d'éliciteurs, certains sont spécifiques (reconnaissance « gène pour gène ») et d'autres sont généraux (reconnaissance non spécifique). Les éliciteurs interagissent avec un récepteur situé au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte (Medhy, 1994). Ces éliciteurs, une fois reconnus, vont entraîner l'activation de gènes de défense. Les protéines, glycoprotéines, peptides, oligosaccharides et lipides sont les classes d'éliciteurs qui sont les plus fréquemment isolés chez les champignons mais aussi chez les bactéries (Ebel and Scheel, 1992).

3.2.1 Les éliciteurs généraux.

Les éliciteurs généraux sont de nature très variée : oligosaccharidique, protéique, glycoprotéique ou lipidique. La lumière, l'ozone et les sels de métaux lourds sont aussi considérés comme éliciteurs. Ils peuvent être issus de la plante (endogènes) ou des agents pathogènes (exogènes) (Zhao et al., 2005). Les PAMPs (Pathogen associated molecular pattern) sont une catégorie de molécules non spécifiques qui n'existent pas chez la plante et qui regroupent la majorité des éliciteurs exogènes (Nurenberger, 2004). Les éliciteurs provenant directement de l'agent pathogène peuvent être des β -glucanes ou de la chitine issus de la paroi de champignons agresseurs par exemple (Kauffmann et al., 2001), ou encore des fragments de flagelline provenant de cellules procaryotes (Gomez et al., 1999). Les éliciteurs endogènes sont des molécules provenant de la plante et qui sont libérées une fois que des cellules végétales sont endommagées. Il peut s'agir de fragments polysaccharidiques ou des oligogalacturonates provenant de la dégradation de la pectine (Kauffmann et al., 2001 ; Pautot et al., 1999).

3.2.1.1 Les oligosaccharides

Ils sont générés par la dégradation des polysaccharides par des enzymes spécifiques à l'hôte ou à l'agresseur. Jusqu'à présent, les oligogalacturonates restent les mieux caractérisés. Il s'agit d'homopolymères d'acides α -1,4 galacturoniques issus généralement de la digestion de la pectine par des polygalacturonases (Cook et al., 1999). Leurs effets biologiques dépendent de leur degré de polymérisation (Mathieu et al., 1991). Ces éliciteurs une fois reconnus

entraînent la mise en place de défenses comme l'accumulation de phytoalexines, de protéines PR ou d'éthylène (Boudart et al., 1998 ; Simpson et al., 1998).

Les glucanes sont capables d'initier l'accumulation de phytoalexines chez le soja (Ayers et al., 1976) et ont été initialement découverts chez le champignon *Phytophthora megasperma* pv *glycinea*. Les β -glucanes sont reconnus par un récepteur situé au niveau de la membrane cellulaire chez le soja (Miller et al., 1994) et sont obtenus après dégradation du glucane par des β -glucanases (Fritig et al., 1998).

Les chitines sont des polymères de la paroi de plusieurs champignons. Les oligochitines sont obtenues après dégradation de la chitine par des chitinases qui sont produites suite à une agression d'un agent pathogène (Fritig et al., 1998) et comme dans le cas des glucanes, les chitines sont capables d'initier la synthèse de phytoalexines chez le soja.

3.2.1.2 Les protéines et peptides

Les harpines sont des protéines de 44 kDa riches en glycine, résistantes à la chaleur et ayant des propriétés de surfactant. Elles induisent des réactions d'hypersensibilité chez des plantes comme le tabac et *A. thaliana*. Des mutations affectant un gène codant pour l'harpine chez *Erwinia chrysanthemi* empêche l'induction de réaction hypersensible sur le tabac et réduit la capacité d'infestation (Lepoivre, 2003)

Les flagellines sont des constituants des bactéries nécessaires à leur mobilité. Ces protéines de 46 kDa sont constituées de domaines N et C-terminaux très conservés et d'une partie très variable. Le flagellum bactérien est constitué de milliers de molécules de flagelline (Schuster et Khan, 1994). Gomez-Gomez et Boller (1999) ont montré que le peptide flg22 est un éliciteur puissant et que celui-ci induit chez *A. thaliana* un burst oxydatif, des dépôts de callose et des gènes liés à la mise en place de résistance.

Les élicitines sont des protéines de 10 kDa riches en cystéines sécrétées par des Oomycètes des genres *Pythium* et *Phytophthora*. Ces protéines induisent, une fois appliquées sur le tabac, une réaction hypersensible et une résistance systémique acquise (Bonnet, 1985 ; Ricci et al., 1989 ; Kamoun et al., 1993 ; Ponchet et al., 1999). Elles ont une propriété de transfert de molécules lipidiques et possèdent une affinité pour les stérols (Mikes et al., 1998). Toutes les élicitines se fixent à un site de haute affinité que l'on retrouve sur la membrane plasmique de tabac et également d'*A. thaliana* (Bourque et al., 1999). Au sein de ces élicitines, on retrouve la cryptogéine, produite par *Phytophthora cryptogea*. Elle est constituée

de 98 résidus d'acides aminés, dont six cystéines engagées dans des ponts disulfure intramoléculaires, et ne montre aucune activité enzymatique (Ricci, 1997). La structure cristalline de la cryptogéine a été déterminée par Boissy et al, (1996). Elle comporte 6 hélices α , un motif composé d'un feuillet β antiparallèle et d'une boucle Ω , qui pourrait correspondre à un site d'interaction avec un récepteur potentiel. Il existerait une corrélation apparente entre activité élicitrice et capacité à fixer les stérols (Rustérucci et al., 1996). Les élicitines les plus efficaces sont la cryptogéine et la cactoréine et les moins efficaces étant la parasiticéine et la capscicéine. (Mikes *et al.*, 1998)

La systémine est un polypeptide de 18 acides aminés identifié la première fois par Pearce et al. (1991) chez la tomate. La systémine est transporté à travers le phloème dans les feuilles supérieures intactes avant d'induire une cascade de signaux entraînant notamment la synthèse d'acide jasmonique (Lepoivre, 2003). Elle induit également la production d'inhibiteurs de protéases qui protègent les plantes des insectes herbivores (Constabel et al., 1998). Cet éliciteur est synthétisé à partir de la prosystémine. La figure suivante représente la structure chimique de la molécule.

3.2.1.3 Les lipopeptides

Les lipopeptides sont des éliciteurs récemment rapportés dont la surfactine et la fengycine, produites par *Bacillus subtilis*, provoquent une résistance systémique induite chez le haricot et la tomate (Ongena et al., 2007) et entraîne également des réponses telles que alcalinisation du milieu, accumulation de H_2O_2 et une augmentation de l'activité de la LOX (Jourdan et al., 2008). La surfactine est actuellement l'un des plus puissants surfactants d'origine bactérienne connu (Grandgemard, 1997). La figure suivante montre une représentation de la structure chimique de celle-ci

3.2.1.4 Les lipides

L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé qui possède 4 doubles liaisons et qui peut générer des oxylipines, efficaces dans l'activation de la synthèse de phytoalexines. Il entraîne également une augmentation de l'activité de la LOX (Bostock et al., 1981) et a donc un rôle important dans le déclenchement des mécanismes de défense.

L'ergostérol est le stérol le plus représenté chez les champignons. Cet éliciteur a été isolé la première fois à partir de spores de *Cladosporium fulvum* et induit une alcalinisation extracellulaire chez des cellules de tomate (Granado et al., 1995). Kasparovsky et al. (2003) ont observé chez des cellules de tabac traitées des modifications de pH, un burst oxydatif, et la synthèse de phytoalexines.

3.2.2 Les éliciteurs spécifiques.

Le principe d'induction de résistance par la plante ou la théorie « gène pour gène » est expliqué par Flor (1971) et consiste en une protéine exogène synthétisée à partir du gène d'avirulence (jouant le rôle de ligand), qui est reconnue par une protéine végétale codée par le gène de résistance (jouant le rôle de récepteur) (Kaloshian et al., 2005). La figure suivante montre que la résistance dépend de la reconnaissance des produits des gènes concernés. L'interaction entre plante et pathogène peut être qualifiée de compatible ou d'incompatible selon que le pathogène possède ou pas les gènes *avr*, et que la plante possède les allèles de résistance dominant ou pas (Hopkins, 2003). Dans certains cas, on a pu mettre en évidence des éliciteurs spécifiques produits par les gènes d'avirulence (Knogge, 1996).

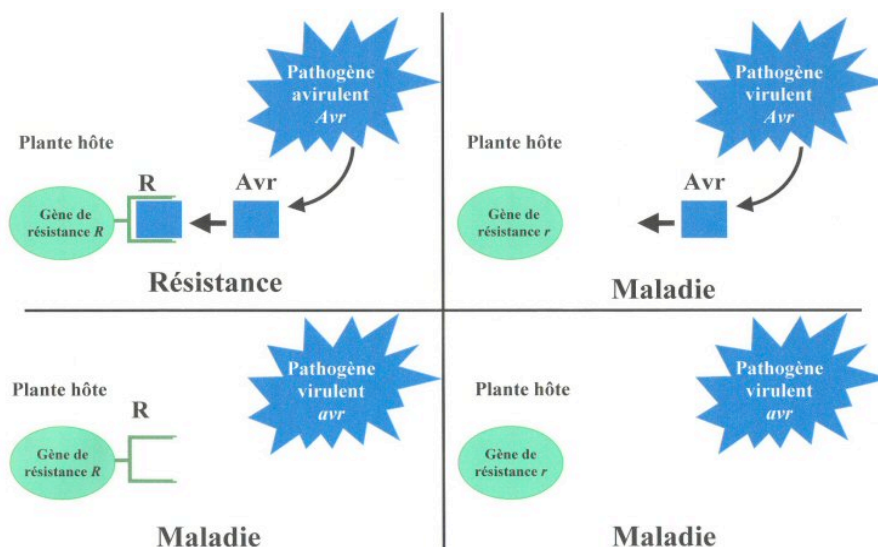


Figure 4 . La théorie « gène-pour-gène ».
La résistance est induite uniquement si la plante exprime le gène de résistance *R* dont le produit reconnaît le produit du gène d'avirulence *Avr* exprimé par l'agent pathogène. Dans tous les autres cas la maladie se développe.
R, Avr : gènes dominants. *r, avr* : gènes récessifs. *R* : produit du gène *R*. *Avr* : produit du gène *Avr*.

Figure 1: La théorie "gène pour gène"

3.2.3 Les éliciteurs chez les insectes

Chez les insectes, des éliciteurs de mécanismes de défense des plantes ont été découverts dans les salives de certaines chenilles de plusieurs Lépidoptères: on retrouve notamment une glucose oxydase dans la salive d'*Helicoverpa zea* (Eichenseer et al, 1999), une β -glucosidase dans la salive de *Pieris brassicae* (Mattiaci et al., 1995), la volicitine chez *Spodoptera exigua* (Alborn et al., 1997), et récemment la caeliférine chez *Schistocerca americana* (Alborn et al., 2007). Ces éliciteurs sont classés en 2 groupes. La glucose oxydase et la β -glucosidase sont considérées comme des enzymes lytiques tandis que le N-[17-hydroxylinolenoyl]-L-glutamine (volicitine), le N-linolenoyl-L-glutamine et le N-linolenoyl-L-acide glutamique sont considérés comme des amides de l'acide linoléique.

La GOX a été identifiée dans la salive d'*H. zea* par Eichenseer et al (1999) et le rôle de cette enzyme est de catalyser la conversion du D-glucose en acide gluconique et en H_2O_2 . Elle est responsable notamment de la réduction de l'induction de nicotine dans des feuilles de tabac lorsque celles-ci sont blessées mécaniquement par *H. zea* (Musser et al, 2002). Dans une autre étude, on montre que la GOX augmente la survie des chenilles d'*H. zea* en supprimant les mécanismes de défense des plantes. Ces résultats ont été obtenus en comparant les niveaux de nicotine dans les feuilles de tabac blessées par des chenilles dont les glandes salivaires ont été cautérisées et d'autres avec des glandes salivaires intactes (Musser et al., 2006).

La β -glucosidase a est retrouvée dans les salives de *P. brassicae*. Elle est suspectée d'être le principal facteur qui provoque chez les feuilles de choux blessées, la libération de substances volatiles attractives pour le parasitoïde *Cotesia glomerata* L. (Mattiaci et al., 1995).

La volicitine, identifiée comme le N-[17-hydroxylinolenoyl]-L-glutamine, a été isolée pour la première fois dans les salives de *Spodoptera exigua* (Alborn et al., 1997). La mise en contact de salive à des feuilles blessées de maïs, entraîne l'émission de substances organiques volatiles à savoir des terpénoïdes et de l'indole. Une autre étude montre que des jeunes plants de maïs traités à de très faibles concentrations de volicitine pure relarguent de grandes quantités de terpénoïdes qui ont un fort pouvoir attractant pour le parasitoïde *Microplitis croceipes* (Turlings et al., 2000). La volicitine paraît être une substance synthétisée à partir d'un dérivé d'acide linoléique provenant de la plante et de glutamate provenant de la chenille. La réaction se passe vraisemblablement dans la cavité buccale de la chenille. Cependant les enzymes jouant un rôle dans la synthèse de la volicitine sont inconnues (Paré et al., 1998). La

volicitine est produite par formation d'une liaison amide entre l'acide linoléinique et la fonction amine de la glutamine et de la 2-hydroxylation de l'acide linoléinique.

Le N-linolenoyl-L-glutamine et le N-linolenoyl-L-acide glutamique sont tous les deux des amides d'acides gras qui ont été retrouvés dans les sécrétions orales de *Manduca sexta* et leurs activités biologiques ont été déterminées (Halitschke et al, 2001). La biosynthèse de l'éliciteur N-linolenoyl-L-glutamine a été mise en évidence dans des fractions de microsomes de certains tissus alimentaires chez *Manduca sexta*. L'enzyme qui catalyse la biosynthèse a été localisée dans la fraction protéique de la membrane des microsomes (Lait et al., 2003).

La caeliférine a été identifiée pour la première fois chez *Schistocerca americana*. Cet éliciteur est composé d'acides gras saturés et mono-insaturés dans lesquels le ω -carbone est fonctionnalisé avec soit un hydroxyle sulfaté soit un carboxyle conjugué à la glycine via une liaison amide (Alborn et al., 2007). Il s'agit donc ici d'une nouvelle catégorie d'éliciteurs produits par des insectes herbivores qui ne sont pas des Lépidoptères. Cela fournit une preuve supplémentaire que les plantes ont la capacité de détecter un large éventail de composés produits par des insectes phytophages et d'y répondre. Une autre preuve nous est fournie par De Moreas (2001) qui montre que des plants de tabac, coton et maïs produisent des composés volatils différents en réponse à des attaques de 2 espèces phytophages proches à savoir *H. zea* et *H. virescens*. Ces composés émis par la plante permettent au parasitoïde *Cardiochiles nigriceps* de distinguer les deux espèces.

3.2.4 Eliciteurs : salives et miellat chez le puceron

Parmi les 4000 espèces de pucerons décrites actuellement, 250 sont considérées comme des ravageurs économiques et sont responsables de dégâts directs et indirects (Blackman and Eastop, 2000). Le puceron généraliste *Myzus persicae* L. a une très large gamme de plantes hôtes. En effet, il est capable de transmettre plus de 100 virus à plus de 400 plantes (Quaglia et al., 1993). Jusqu'à présent, les modèles de ravageurs étudiés concernaient plutôt les insectes de type broyeur. L'investigation des salives de pucerons à la recherche d'éliciteurs potentiels est donc relativement récente.

Il a été montré que l'émission de composés volatils de plants de pomme de terre infestés par *M. persicae* est significativement différente de celle de plantes saines ou blessées mécaniquement par une aiguille (Harmel et al., 2007). De plus, ces composés ont une

influence sur le comportement reproductif de la syrphie ceinturé *Episyrphus balteatus*. (De Geer)

Des phénoloxydases ont été trouvées dans des salives de pucerons par Miles (1985) et il semblerait que celles-ci interviennent dans la détoxification des défenses des plantes (Miles and Oertli, 1993). Urbanska et al. (1998) ont confirmé la présence d'une activité phénoloxydase dans des salives de pucerons. Une pectinase a également été détectée dans des salives de *Schizaphis graminum* (Ma et al., 1990).

Les protéines contenues dans les salives de pucerons sont de deux types : structurelles et enzymatiques. Les protéines structurelles forment une gaine autour du stylet et ont un poids moléculaire estimé à 154 et 66/69kDa (Baumann and Baumann, 1995). Les enzymes salivaires sont des hydrolases et des enzymes d'oxydation et de réduction (Miles, 1999 ; Cherqui and Tjallingii, 2000). Une étude réalisée sur *S. graminum*, *A. pisum* et *M. persicae* a montré la présence de phénoloxydase, pectinase et peroxydase, ce qui confirme les activités enzymatiques précédemment découvertes. Cependant, aucune protéinase et aucune cellulase n'ont été trouvées dans les salives de ces pucerons (Cherqui and Tjallingii, 2000).

Chez *M. persicae*, l'analyse de salives de ce dernier a permis de mettre en évidence une glucose oxydase, une glucose déhydrogénase, une NADH-déhydrogénase, une glucosidase et une amylase. Des protéines ont également été identifiées grâce à la spectrométrie de masse, ce qui constitue une nouveauté (Harmel et al., 2008). En effet, jusqu'à présent, seules des activités enzymatiques avaient été détectées chez le puceron.

La technique EPG (electrical penetration graph) a permis de contrôler l'activité électrique lors de la pénétration dans la plante par les pucerons. L'enregistrement des variations électriques montre différentes activités : pénétration du stylet, sécrétion de salive et ingestion de sève (Tjallingii, 2006). Aussi, l'EPG a montré quatre phases de sécrétions salivaires lors de la pénétration de la plante. La première est une sécrétion de salive gélifiante intercellulaire entourant le stylet. La seconde correspond à une salivation intracellulaire à l'intérieur des cellules bordant le stylet. Troisièmement, on observe l'émission de salive dans le phloème et enfin la quatrième phase est la sécrétion de salive de manière discontinue et directement ingérée avec la sève. Les trois dernières phases font intervenir une salive aqueuse. (Cherqui and Tjallingii, 2000). La figure suivante représente schématiquement les différentes phases de la sécrétion salivaire.

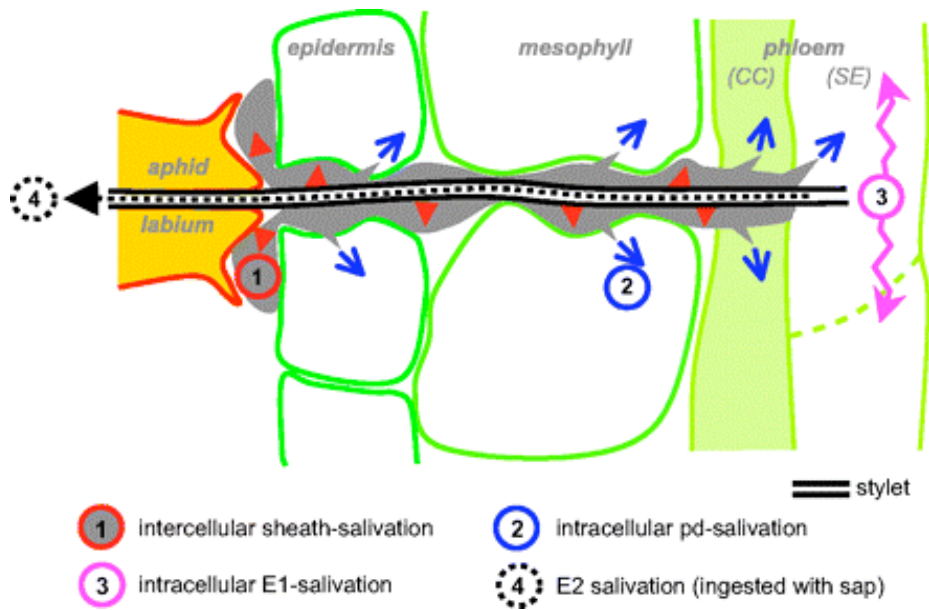


Figure 2: Différentes phases de sécrétions salivaires chez le puceron.

Source : <http://jxb.oxfordjournals.org/cgi/content/full/57/4/739/FIG4>

En ce qui concerne le miellat de pucerons, celui-ci est majoritairement composé d'acides aminés libres, d'amides, de protéines, de minéraux, de vitamines (Way, 1963), de lipides (Buckley, 1987), d'acides organiques et de saccharides (Yao et Akimoto, 2001). Ces derniers représentent à eux seuls 90 à 95% de la matière sèche. La plus grande partie des hydrates de carbone est composée de sucres d'origine végétale (67 à 89% des sucres totaux) (Hogervorst et al., 2007). La composition en acides aminés est variable mais 4 acides aminés sont plus fréquents que les autres à savoir l'asparagine, la glutamine, le glutamate et la sérine (Woodring et al. 2004)

La composition en sucres du miellat est relativement semblable à celle du phloème prélevé par le puceron (Hackers et al., 2000).

Le miellat peut agir comme une kairomone volatile et de contact. Ainsi, suite à une perception gustative ou tactile, certains auxiliaires peuvent voir leur comportement varié comme l'oviposition par exemple (Budenberg et al., 1992). Aussi, le premier stade larvaire d'*Episyrphus balteatus* s'oriente vers ses proies après avoir étiré ses papilles afin de percevoir les phéromones d'alarme ou sexuelles du puceron mais aussi les composés volatils du miellat (Bargen et al., 1998)

3.3 La transduction du signal

Une fois que la reconnaissance de l'éliciteur par la plante a eu lieu, celle-ci est suivie de la transduction du signal, incluant une série d'évènements cellulaires et moléculaires précoces (de l'ordre de quelques minutes) dans le but de mettre en place les mécanismes de défense. Parmi les évènements les plus précoces, on peut observer :

- des réactions de phosphorylation/déphosphorylation de protéines suite à l'activation de protéines kinases
- modifications des flux ioniques (Ca^{2+} , H^+ , Cl^- , K^+)
- la production de formes actives de l'oxygène (FAO).

L'importance et la localisation de ces mécanismes varient selon le modèle plante/pathogène. La figure suivante dresse un aperçu des différents évènements cellulaires succédant à l'élicitation, qui conduisent à la mise en place des mécanismes de défense de la plante.

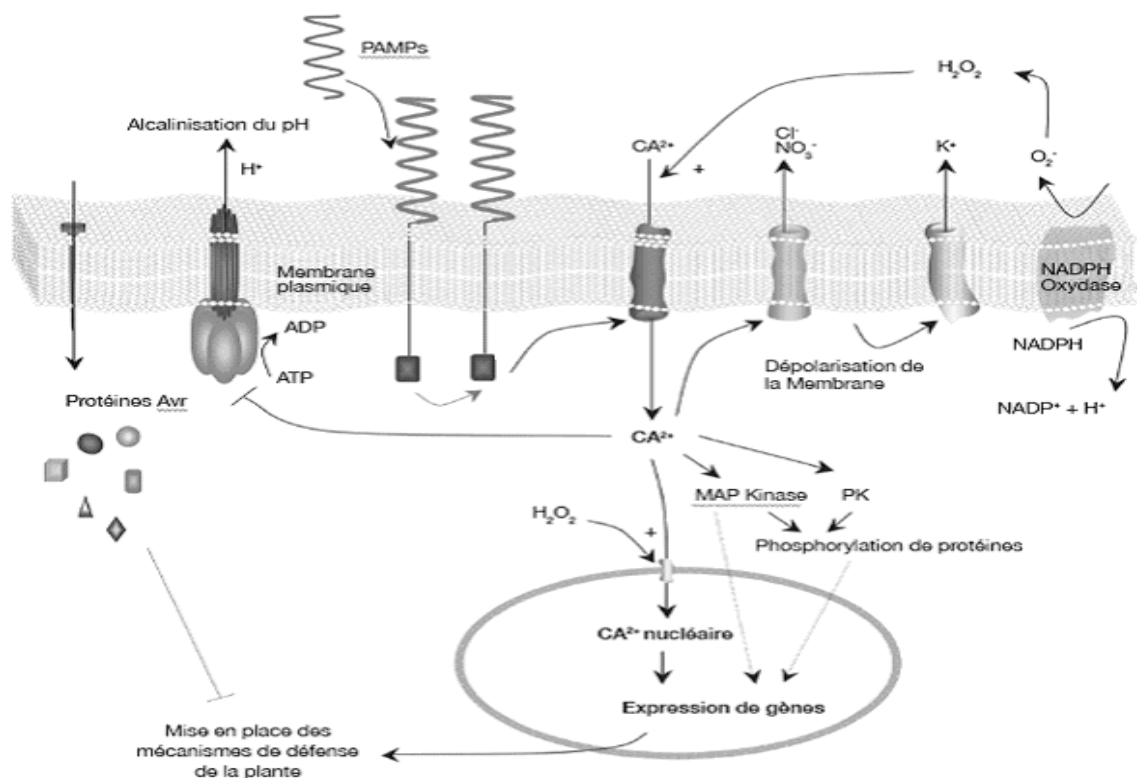


Figure 3: Evènements cellulaires que l'on observe suite à l'élicitation chez des cellules de tabac (Jourdan et al., 2008)

3.3.1 Les réactions de phosphorylation/déphosphorylation des protéines

La phosphorylation est une modification réversible et covalente des protéines qui consiste à fixer un groupement phosphate supplémentaire. Cet événement a un impact sur l'activité biologique, la durée de vie et sur la localisation des protéines (Xing et al., 2002).

Ces réactions ont un rôle important dans la signalisation et la mise en place des défenses. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de protéines kinases, comme la staurosporine, entraîne des modifications des autres événements cellulaires. Des modifications concernant l'alcalinisation du milieu extracellulaire (Felix et al., 1991 ; Mathieu et al., 1996), le burst oxydatif (Chandra et Low, 1995 ; Mathieu et al., 1996) et la production d'éthylène, ont été observées. Les MAP kinase (Mitogen activated protein kinase) sont des protéines phosphorylables qui semblent jouer un rôle indispensable dans l'activation des mécanismes de défense et la transduction des signaux (Scheel, 1998). Une MAP kinase induite par l'acide salicylique semble jouer un rôle important dans les mécanismes de défense chez le tabac (Zhang et al., 1998)

Les inhibiteurs de protéines phosphatases, quant à eux, ont un effet inverse et sont capables de mimer des réactions de défenses en l'absence d'éliciteurs. On peut observer, lorsque de la calyculine est appliquée sur cellules de tomates, une phosphorylation intense des protéines (Felix et al., 1994) tandis que l'on observe un burst oxydatif lorsque cet inhibiteur de phosphatases est appliqué sur cellules de tabac (Mathieu et al., 1996).

3.3.2 Les flux ioniques

Les modifications concernant les flux ioniques au niveau cellulaire font partie des premiers événements qui ont lieu suite à la reconnaissance d'un éliciteur. On observe un alcalinisation du milieu extracellulaire et une acidification cytoplasmique qui se traduit par une entrée d'ions calcium et de protons ainsi qu'un efflux d'ions potassium, chlorure et nitrates (Nurnberger et al., 1997 ; Zimmermann et al., 1998 ; Wendehenne et al., 2002).

Wendehenne et al. (2002) a montré que l'efflux de nitrate et de chlore était régulé par les événements de phosphorylation et par l'influx de calcium. Le traitement de cellules de persil par un éliciteur pep 13 ou par la cryptogéine entraîne un efflux d'ions potassium et chlore lié à une augmentation du calcium libre cytoplasmique ainsi que l'influx de protons

(Nurnberger et al., 1994 ; Viard et al., 1994 ; Bush, 1995). L'augmentation intracellulaire du calcium a pour effet d'inhiber l'entrée de glucose dans la cellule, de dépolariser la membrane, d'activer une NADPH oxydase et des MAPs kinases (Jourdan et al., 2008). Le calcium a donc une importance dans les variations ioniques étant donné qu'on le retrouve dans différentes voies de signalisation. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de canaux calciques, de chélatants comme l'EDTA et l'EGTA, d'ionophores, ou encore la réduction des apports de calcium dans le milieu de culture inhibent les réponses spécifiques généralement observées (Chandra et al., 1997 ; Nurnberger et Scheel, 2001). Jabs et al. (1997) a aussi montré que le retrait de calcium du milieu de culture de cellules de persil empêchait la production de FAO et l'accumulation de phytoalexines. Un traitement utilisant des ionophores à calcium, comme l'amphotéricine B, induit des mouvements ioniques mais aussi une production de FAO sur des cellules d'épicéa ou une production de phytoalexines sur des cellules de soja (Schwacke et Hager, 1992 ; Tavernier et al., 1995).

Les flux ioniques ont donc une importance cruciale dans la transduction du signal et la mise en place des mécanismes de défense.

3.3.3 La production de formes actives de l'oxygène, burst oxydatif

Le burst oxydatif est une réponse intense rapide et transitoire qui a lieu à la surface de la cellule végétale en réponse à des stimuli externes. Cet événement correspond à la production de formes activées de l'oxygène (FAO) obtenues par réduction d'une molécule de dioxygène. Parmi les produits que l'on regroupe sous les noms de FAO figurent le radical superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^\cdot) (Wojtaszek, 1997 ; Mittler et al., 2004). On remarque que la production de FAO existe même en conditions normales mais les quantités produites sont telles qu'elles peuvent être aisément catabolisées (Wojtaszek, 1997 ; Parent et al., 2008). L'accumulation de ces composés joue un rôle important dans la mise en place des mécanismes de défense (Bolwell, 1999).

L'anion superoxyde (O_2^-) est produit suite à l'addition d'un électron sur une molécule de dioxygène. Dans les cellules végétales, l'anion superoxyde est en état d'équilibre avec le radical hydroperoxyde. Ces 2 composés ont une durée de vie de l'ordre de la seconde et sont rapidement dismutés par la superoxyde dismutase (SOD) en H_2O_2 . La SOD se trouve dans certains compartiments cellulaires et surtout le chloroplaste.

Le peroxyde d'oxygène (H_2O_2) est un composé stable capable de traverser les membranes plasmiques et nucléaires (Wojtaszek, 1997) qui est éliminé et transformé en eau par des réactions réductrices séquentielles qui utilisent l'ascorbate, le glutathion et le NADPH. Il s'agit de la voie de Halliwell-Asada (Hopkins, 2003).

Le radical hydroxyle (OH^\cdot) est un oxydant puissant possédant une durée de vie d'environ une nanoseconde. Il s'agit d'un radical libre hautement réactif et toxique. Il est formé à partir de la réaction d'Haber-Weiss entre le superoxyde et le peroxyde d'oxygène (Hopkins, 2003).

Le monoxyde d'azote (NO) est considéré comme une forme activée de l'oxygène, bien qu'il peut s'agir d'une forme active de l'azote. Delledonne et al. (1998) a montré que cette molécule jouait un rôle dans les mécanismes de défense chez les plantes et notamment lors de la réaction hypersensible (Dangl, 1998). La fonction de l'oxyde nitrique est d'agir en parallèle avec les FAO pour induire une apoptose cellulaire afin de détruire les pathogènes. Par exemple, le NO qui réagit avec O_2^- forme le peroxynitrite, qui est une molécule très oxydante et très réactive et qui cause la destruction de tissus par oxydation (Delledonne et al., 2001). De plus, le NO induit également l'expression de certains gènes chez le tabac (Durner et al., 1998).

Les NADPH oxydases, quelques peroxydases et une oxalate oxydase sont les enzymes impliquées dans la production des FAO. Chez les mammifères, lors d'une attaque bactérienne, la NADPH oxydase entraîne la formation de l'anion superoxyde. Le complexe enzymatique est composé de 2 protéines membranaires (gp91 phox et p22 phox). En utilisant gp91 phox comme modèle, des homologues végétaux de cette protéine ont été clonés chez le tabac, Arabidopsis et le riz (Simon-Plas et al., 2002 ; Tores et al., 2002). Des plantes transgéniques n'exprimant plus cette enzyme ne produisent plus de FAO, ce qui suggèrent que ce type d'enzymes est impliqué dans leur production (Simon-Plas et al., 2002 ; Torres et al., 2002). Des peroxydases sont également capables de produire des FAO chez plusieurs plantes supérieures. Brown et al. (1998) a identifié une peroxydase de 46 kDa capable de produire du peroxyde d'hydrogène chez le haricot. Enfin pour ce qui est de l'oxalate oxydase, il s'agit une enzyme qui produit également des formes actives de l'oxygène chez les céréales. Celle-ci utilise l'acide oxalique pour produire du peroxyde d'hydrogène et du CO_2 (Dumas et al., 1995). On remarque que chez l'orge, l'activité de cette enzyme, également appelée germiné, augmente significativement suite à l'infestation par *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei* (Wei et al., 1998).

La forme de la réponse que l'on observe après la reconnaissance d'un éliciteur bactérien par la plante est généralement biphasique. La première phase est considérée comme une réponse non spécifique. Le second pic de production de FAO implique une oxydase NADPH-dépendante, une peroxydase ainsi que d'autres enzymes (Wojtaszek, 1997 ; Grant et Loake, 2000). Par contre, dans le cas où des cellules de tabac sont traitées avec un éliciteur fongique, on observe une réponse qui a lieu en une phase (Wojtaszek, 1997).

Les FAO produits suite à l'élicitation ont plusieurs effets. En plus d'avoir une action directe contre les pathogènes, elle permet un renforcement des parois du végétal (Wojtaszek, 1997 ; Bolwell, 1999). Bradley et al. (1992) a montré qu'un traitement de cellules de haricot avec un éliciteur fongique induit un renforcement des parois, les rendant ainsi plus résistantes aux enzymes hydrolytiques. Les FAO ont également un rôle dans l'induction de la mort cellulaire au cours de la réaction hypersensible en agissant comme molécule signal (Levine et al., 1994). Aussi, les FAO interviennent dans la production de phytoalexines, dans l'expression des gènes de défense d'une part et des gènes de protection des cellules saines d'autre part et dans l'initiation de la réaction hypersensible (Brisson et al., 1994 ; Low et Merida, 1996). Ces composés peuvent également initier des modifications de flux ioniques et la production d'acide salicylique (Pontier et al., 1998).

3.4 Les voies de signalisation intercellulaires

Lorsque l'on observe l'établissement d'une résistance locale chez la plante, celle-ci entraîne généralement la mise en place d'une résistance systémique dans les tissus sains. Cette résistance systémique correspond à l'activation de certains gènes qui permettent l'induction et le maintien d'un état de résistance à long terme (Roos, 1961). Les relais entre les réponses précoces et les réponses plus tardives (de l'ordre de 30 minutes à plusieurs heures) sont assurés par un certain nombre de molécules signales endogènes parmi lesquelles l'acide salicylique (SA), les jasmonates (JA), le NO et l'éthylène (ET) jouent un rôle important.

Trois phytohormones (SA, ET et JA) sont connues pour être impliquées dans la régulation et la mise en place des mécanismes de défense (Glazebrook, 2005 ; Loake et Grant, 2007 ; Balbi et Devoto, 2008).

3.4.1 La voie de l'acide salicylique

L'acide salicylique est un composé phénolique obtenu via la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Il est formé par l'hydroxylation de l'acide benzoïque. Le SA est impliqué dans les mécanismes de défense contre les pathogènes biotrophes (virus, champignons, bactéries) ainsi que dans la mise en place de la résistance systémique acquise (Grant et Lamb, 2006). L'accumulation de SA dans les tissus de la plante est également corrélée à la synthèse de protéines PR (Malamy et al., 1990). Des expériences montrent que des plants transgéniques de tabac et d'*Arabidopsis* surexprimant une enzyme bactérienne de dégradation de l'acide salicylique (NahG) étaient incapables de développer une résistance systémique acquise et la synthèse de protéines PR était très faible (Gaffney et al., 1993 ; Delaney et al., 1994). Le marquage de SA a mis en évidence que plus de 60% du SA que l'on retrouve dans les tissus non-infectés provient de la synthèse de celui-ci dans les zones infectées (Shualev et al., 1995). Hunt et al. (1996) a suggéré que le SA était transporté vers les tissus non-infectés via le phloème. Le SA apparaît donc comme étant nécessaire dans l'induction de la RSA.

Récemment, des études ont montré que le méthyle salicylate (MeSA), un composé volatil synthétisé à partir du SA et qui est induit par une infection d'un pathogène, joue le rôle d'inducteur mobile de la RSA chez le tabac (Park et al., 2007). Le MeSA est également capable d'induire une résistance chez des plantes voisines à la plante qui subit l'agression (Huang et al., 2006)

3.4.2 La voie des jasmonates et de l'éthylène

Les jasmonates et l'éthylène sont quant à eux impliqués dans l'activation des défenses contre les pathogènes nécrotrophes et les insectes phytophages. Lors d'une attaque de la plante par un insecte possédant des pièces buccales de type broyeur, il en résulte une activation des voies JA et ET. Des protéines et des composés secondaires comme des inhibiteurs de protéases, des polyphénoloxydases ou des molécules de défenses volatiles par exemple, sont ainsi produits (Giordanengo et al., 2007).

Parmi les jasmonates, l'acide jasmonique synthétisé à partir de l'acide linoléinique et son ester méthylé (le méthyle jasmonate) font partie des composés qui induisent une résistance contre maladies et insectes (Creelman et Mullet, 1997). Ils sont obtenus via la voie de biosynthèse des octadécanoïdes. Le méthyle jasmonate est important dans l'expression

d'inhibiteurs de protéases dans des cellules de tabac (Rickauer et al., 1992) et est aussi en mesure d'activer l'expression des gènes des lipoxgénases (Creelman et al., 1992). Un apport exogène d'acide jasmonique et de méthyle jasmonate induit une RSA chez la pomme de terre et la tomate infestée par *Phytophthora infestans* (Cohen et al., 1993). Aussi, des études ont montré que des plantes transgéniques qui n'étaient plus capables de synthétiser de l'acide jasmonique, étaient sensibles aux attaques d'insectes (Howe et al., 1996).

La voie de synthèse des phytoalexines, ces antibiotiques végétaux produits lors de la RH ou lors de la RSA, est celle de l'acide jasmonique. En effet, celui-ci et son ester méthylié sont responsables de la synthèse des enzymes produisant les phytoalexines (Bonnemain et Chollet, 2003).

L'éthylène est une hormone végétale obtenue au départ de la méthionine et qui a un impact sur les mécanismes de défense (Ecker, 1995). Durant la RH, le niveau d'ET augmente de manière significative (De Laat et Van Loon, 1982 ; Jang, 2009). Knoester et al. (1998) et Boller et al. (1993) ont également montré que des traitements d'ET induisaient l'expression de certains gènes codant pour des protéines PR. L'ET, en plus d'activer la synthèse de certaines protéines PR, semble également intervenir dans le renforcement de parois végétales (Enyedi et al., 1992). Cependant, l'ET n'est pas suffisant pour induire seul la RSA. En effet, des plants de tabac traités à l'éthylène ne montrent pas de RSA suite à l'infection par le virus de la mosaïque du tabac (Brederode et al., 1991).

3.4.3 Les interactions entre les différentes voies

Des études montrent que les voies de signalisation de SA et JA sont antagonistes. En effet, l'application d'acide acétylsalicylique (aspirine) empêche l'accumulation d'inhibiteurs de protéases (Doherty et al., 1988 ; Doares et al., 1995) et le SA supprime l'expression de gènes codant pour des protéines PR (régulés par le JA) chez le tabac (Niki et al., 1998). Plus récemment, Spoel et al. (2007) a montré chez *Arabidopsis thaliana* que les défenses liées à la voie du SA, induite par l'infection du pathogène biotrophe *Pseudomonas syringae*, rendaient les tissus infectés plus susceptibles à l'infection par le pathogène nécrotrophe *Alternaria brassicola* en supprimant la voie de signalisation du JA.

Malgré le fait que les différentes voies de signalisation sont mutuellement antagonistes, des preuves d'interactions synergistes ont également été rapportées (Glazebrook et al., 2003 ; Mur et al., 2006).

Les interactions entre les voies de signalisation sont utiles pour aider la plante à choisir quelles stratégies de défense développer. Il est intéressant de constater que certains agresseurs des plantes ont mis au point des stratégies permettant de supprimer les mécanismes de défenses ou de modifier les voies de signalisation (Pieterse et Dicke, 2007). En effet, les nymphes de la mouche blanche *Bemisia tabaci* sont capables d'induire l'activation de la voie du SA, supprimant ainsi les défenses relatives au JA et permettant ainsi un meilleur comportement de l'insecte (Zarate et al., 2007). Little et al. (2007) a également montré que des éliciteurs provenant des œufs de *Pieris rapae* et *Pieris brassicae* suppriment les défenses relatives au JA, afin d'améliorer l'éclosion des larves.

3.4.4 Le cas des insectes piqueurs / suceurs

Les pucerons sont considérés comme phénotypiquement plus proches des champignons et des bactéries phytopathogènes que d'autres insectes broyeur en ce qui concerne les mécanismes de défense mis en œuvre par les plantes (De Vos et al., 2005). Lorsque les dégâts sont occasionnés par ce type d'insecte, on remarque une activation non seulement des voies JA/ET mais aussi des voies du SA. Des protéines PR (pathogenesis-related) sont produites (Moran et Thompson (2001), mais l'on observe beaucoup de réactions hypersensibles sous contrôle génétique simple (Sauge et al., 2006). Cela suggère que le réseau des voies de signalisation activé et utilisé par la plante dépend de l'agent pathogène et de sa pathogénicité. Par conséquent, les interactions entre les voies du SA et de JA/ET sont régulées en fonction du pathogène (Adie et al., 2007)

3.5 Les mécanismes de défense

3.5.1 Les protéines PR (pathogenesis related)

Les stratégies de défense des plantes contre les différents stress auxquels elles sont soumises sont variées. Les protéines PR constituent un groupe de protéines particulières induites dans des cas d'attaques de pathogènes, de blessures, de conditions défavorables. Elles furent découvertes pour la première fois dans des feuilles de tabac ayant réagi au virus de la mosaïque du tabac (TMV) (Van Loon et Kammen 1970 ; Gianinazzi et al., 1970).

Les protéines PR, initialement différenciées en 5 groupes, sont classées en 17 familles. Les bases de la classification sont la similarité des séquences d'acides aminés, les relations sérologiques et immunologiques et les propriétés enzymatiques (Van Loon et al., 1994). Les principales caractéristiques physico-chimiques de ces protéines sont les suivantes : un faible poids moléculaire (6-43 kDa), stables à bas pH (< 3), thermostables et hautement résistants aux protéases. Elles se situent dans la vacuole et on observe leur accumulation principalement dans l'apoplasme (Fritig et al., 1998 ; Van Loon, 1999).

Les fonctions de protéines PR sont variées. C'est Legrand et al. (1987) qui fut le premier à détecter une activité chitinase chez des protéines du groupe 3 chez les protéines de tabac. De la même façon, une activité β -1,3- glucanase a été identifiée chez des protéines du groupe 2 (Kauffmann et al., 1987). Des activités chitinase ont été détectées chez les PR-4, PR-8 et PR-11. Enfin, des protéases, des peroxidases, des ribonucléases et des activités lysozyme ont été détectées chez des PR-7, PR-9, PR10 et PR-8 respectivement. Les PR-6 sont caractérisées par une activité inhibitrice de protéases (Van Loon et Van Strien, 1999, et références incluses). Les produits de dégradation causés par l'activité enzymatique, comme des fragments de chitine ou de glucane par exemple, constituent alors des éliciteurs de mécanismes de défense (Heitz et al., 1994). La figure suivante reprend les différentes familles et propriétés des protéines PR.

Protéines PR	Activité enzymatique	Cible chez le pathogène
PR-1	?	Membrane ?
PR-2	β -1,3-glucanase	Glucanes de la paroi
PR-3	Endochitinase	Chitine de la paroi
PR-4	Endochitinase	Chitine de la paroi
PR-5	?	Membrane
PR-6	Inhibiteur de protéinase	Protéinase
PR-7	Protéinase	?
PR-8	Endochitinase	Chitine de la paroi
PR-9	Peroxydase	?
PR-10	RNase	?
PR-11	Endochitinase	Chitine de la paroi
PR-12	défensines	?
PR-13	thionines	?
PR-14	Protéines de transfert de lipides (LTP)	?
PR-15	Oxalate oxidase	Membrane
PR-16	Oxalate oxidase-like	Membrane
PR-17	inconnue	?

Figure 1: Classification des protéines PR (pathogenesis-related proteins) chez les plantes.

Modifié d'après The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. (1999). Van Loon L. C. and Van Strien E. A Physiological and Molecular Plant Pathology. 55: 85-97 et Recognized families of pathogenesis-related proteins. <http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PR-families.htm>

Figure 4: Classification des protéines PR (Van Loon et Van Strien, 1999)

On remarque la présence de défensines et de thionines au niveau des protéines PR-12 et PR-13. Il s'agit de peptides antimicrobiens synthétisés suite à une agression par un pathogène (Terras et al., 1995) et qui ont été découverts par la première fois chez le blé et l'orge. Ces deux familles, proches par leur poids moléculaire, leurs séquences en acides aminés et le nombre de cystéines (Collina et al., 1990), diffèrent au niveau de la disposition des ponts disulfure (Bruix et al., 1995). Les thionines ont la fonction de modifier la perméabilité membranaire des champignons par flux ioniques et relargage du contenu cellulaire (Thevissen et al., 1996). Le rôle des défensines est multiple, à savoir inhibiteur d' α -amylases chez l'insecte (Bloch et Richardson, 1991), inhibiteur de protéases (Wijaya et al., 2000), médiateur dans la tolérance au zinc chez les plantes (Mirouze et al., 2006) et inhibiteur microbien (Terras et al., 1992). L'expression de ces peptides est médiée par l'acide jasmonique et l'éthylène (Epple et al., 1995)

3.5.2 La réaction d'hypersensibilité

La réaction d'hypersensibilité, ou mort cellulaire programmée, correspond à une réaction nécrotique au niveau des cellules infectées par des agents pathogènes, dans le but d'empêcher leur progression. Les réactions qui apparaissent lors de la réaction hypersensible sont très similaires quels que soient la plante-hôte et le parasite (Lepoivre, 2003).

Le rôle de cette réaction est l'apparition dans l'apoplasme de protéines antimicrobiennes et toxiques ainsi que de molécules capables d'induire des réactions de défense chez les cellules voisines de l'infection (Goodman, 1994).

Les premiers événements que l'on peut observer lors de cette réaction sont tout d'abord une désorganisation des membranes plasmiques, suivie d'une décompartmentation (Freytag et al., 1994). Il semble que les FAO et des hydroperoxydes d'acides gras polyinsaturés agissent dans le processus en initiant la mort cellulaire (Rustérucci et al., 1996 ; Bestwick et al., 1997). Les FAO ont donc un rôle dans la peroxydation des lipides, la régulation de gènes de protection (Levine et al., 1994) et l'induction de la LOX (Rance et al., 1998). Dorey et al. (1999) a montré cependant que le peroxyde d'hydrogène n'était pas le signal essentiel à la mise en place du mécanisme d'apoptose chez des cultures de cellules de tabac.

La réaction hypersensible n'est pas nécessaire pour la mise en place des mécanismes de défense. En effet, c'est ce que l'on observe chez des mutants d'*A. thaliana*, incapables d'induire une mort cellulaire, mais capables d'induire une résistance face à une souche avirulente de *Pseudomonas* (Yu et al., 1998).

3.5.3 Renforcement des parois cellulaires

Le renforcement des parois constitue un autre mécanisme de défense, qui consiste en l'accumulation de certains composés dont notamment la lignine, la subérine, la callose ainsi que de résidus riches en hydroxyproline (protéines HRGP) (Benhamou, 1996). Tous ces composés confèrent aux parois une résistance particulière en formant un réseau réticulé impénétrable aux pathogènes. Les protéines HRGP ont la possibilité d'agglutiner des bactéries et de réduire leur mobilité (Benhamou, 1966).

3.5.4 Les métabolites secondaires

Selon Harbone (1993), les métabolites secondaires sont des molécules qui n'ont pas de rôle défini dans le métabolisme primaire, à savoir le développement et la survie de la plante, mais qui possède néanmoins une fonction défensive. Parmi ceux-ci, on distingue notamment des flavonoïdes, isoflavonoïdes, stilbènes, coumarines et anthocyanines. C'est lors de l'interaction avec un pathogène que les enzymes responsables de la synthèse de ces composés sont induites.

Les phytoalexines sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire qui jouent un rôle dans la réponse à des éliciteurs (Rustérucci et al., 1996). En effet, des plants d'*A. thaliana* génétiquement modifiés incapables de produire des phytoalexines sont sensibles aux agressions d'*Alternaria brassicola*, tandis que des plants témoins sont résistants au pathogène (Thomma et al., 1999)

3.5.5 Les émissions de composés volatils

Les plantes peuvent aussi se défendre via l'émission de composés organiques volatils à partir du site de la blessure. Lorsque la blessure est causée par des insectes phytophages de type broyeur, les composés que l'on retrouve principalement sont du MeJA, du cis-jasmone, des composés volatils en C6, des indoles, du MeSA, des monoterpènes, des homoterpènes et des sesquiterpènes. La répartition de ces composés varie qualitativement et quantitativement selon le type d'interactions. Lors d'attaques bactériennes ou fongiques, les composés relargués sont des composés volatils en C6, des terpènes, des indoles et du MeSA (Kaloshian et al., 2005).

Les insectes piqueurs-suceurs, quant à eux, entraînent des dégâts mécaniques peu importants et comme déjà dit plus haut, se rapprochent des champignons et bactéries en termes de mécanismes de défense mis en place par la plante. Les composés émis sont surtout de type monoterpènes et sesquiterpènes comme par exemple le (E)- β -farnésène et le MeSA (Kaloshian et al., 2005)

Les composés volatils en C6 produits par l'activité catalytique de l'hydroperoxyde lyase (HPL) sont présents dans les tissus chez toutes les plantes et dérivent de la voie de la LOX (Hatanaka et al., 1987). La figure suivante représente un schéma de la LOX. HPL produit du cis-3-hexanal ou de l'hexanal en fonction du substrat. L'alcool déshydrogénase et

des facteurs d'isomérisation produisent le trans-2-hexenal, le trans-2-hexenol, le cis-3-hexenol et l'hexenol, qui font partie des premiers composés relargués à partir des sites endommagés (Turlings et al., 1995). De plus, ces composés représentent la majeure partie des composés émis par *A. thaliana* (Bate et al., 1998). Des études suggèrent que la présence de ces composés dans l'air environnant les plantes initie la production de phytoalexines (Zeringue, 1992), réduit l'alimentation des insectes (Hildebrand et al., 1993) et possède une activité antimicrobienne (Croft et al., 1993).

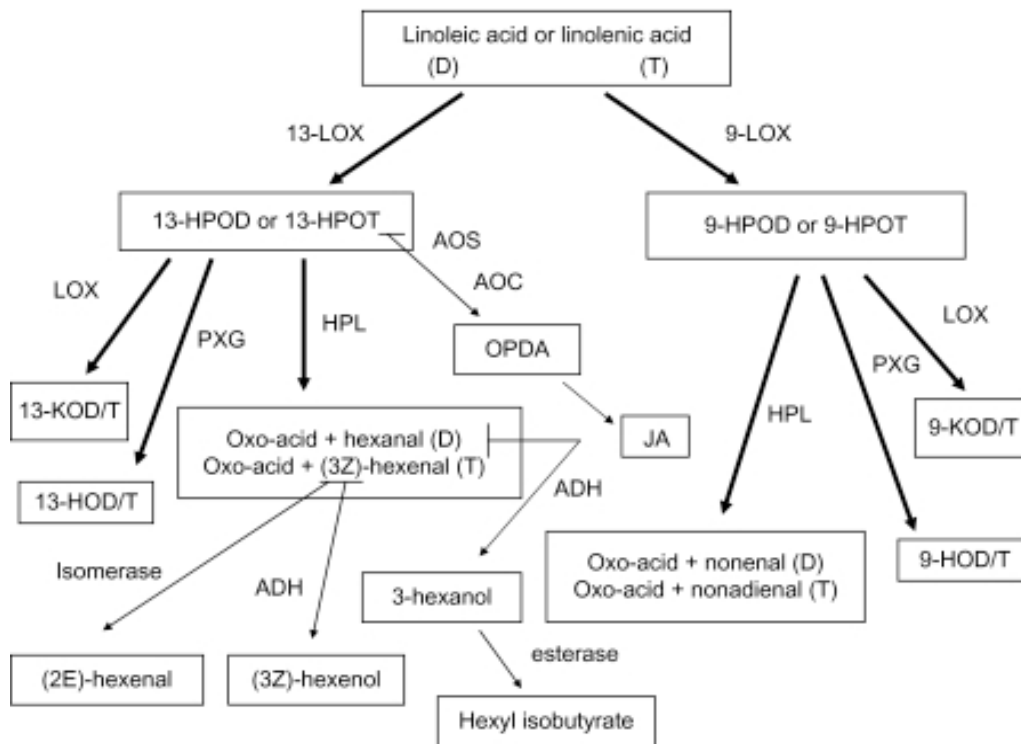


Figure 5: Schéma simplifié de la voie de la LOX

Source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2657539/figure/fig1>

4 Matériel et méthodes

4.1 Matériel biologique de base

Les fèves (*Vicia faba* Linné) sont semées dans des pots de polystyrène à l'intérieur desquels on retrouve un mélange constitué à 50% de perlite et à 50% de vermiculite. Les semences sont placées à mi-hauteur dans les pots dont les dimensions sont 8 x 8 x 9 cm et un arrosage régulier est réalisé.

Le puceron *Myzus persicae* est élevé sur *V. faba* et les plants sont infestés dès que les premières feuilles apparaissent. Ces derniers sont renouvelés chaque semaine afin de maintenir l'élevage de pucerons. Le dispositif est constitué de 6 pots de *V. faba* déposés sur un bac en plastique, le tout disposé à l'intérieur d'une cage en tulle pour empêcher la dissémination de *M. persicae*. Cette cage est placée au sein d'un phytotron sous une photopériode 16 : 8 fournie par des tubes néons de 40 Watts. La température est de 23 +/- 1°C.

4.2 Collecte de salive de *M. persicae*

La salive des pucerons est récoltée à l'aide d'un système de diètes artificielles. Des tubes en PVC de 3 cm de hauteur et 4 cm de diamètre sont recouverts à l'aide de 2 carrés de Parafilm™ étirés afin de permettre la pénétration du stylet des pucerons et entre lesquels se trouvent 150 à 200 µl de diète artificielle. La composition du milieu artificiel standard est adaptée pour *M. persicae* et se trouve en annexe 1. Le pH de la solution est ajusté à 7,5.

A l'aide d'un pinceau, les pucerons élevés sur les fèves sont transférés dans les tubes en PVC à raison d'environ 50 pucerons par tube. Ensuite les tubes sont placés sur un petit bac et laissés pendant 48 heures dans un phytotron où les conditions de photopériode et de lumière sont identiques aux conditions d'élevage. Grâce à leur stylet, les pucerons prélèvent la diète à travers le Parafilm™ comme s'il s'agissait du phloème et le canal salivaire déverse la salive dans la diète. Une fois les 48H écoulées, la diète est récupérée à l'aide d'une micropipette et placée dans un tube Eppendorf de 2 ml. La diète contenant la salive peut être utilisée en l'état ou congelée dans un surgélateur à une température de -20°C.

4.3 Approche cellulaire : impact de différents éliciteurs sur des suspensions cellulaires de tabac en termes de pH et de burst oxydatif

4.3.1 Suspensions cellulaires de tabac

Les suspensions cellulaires de tabac baignent dans un milieu de culture liquide essentiel à leur maintien et dont la composition figure dans l'annexe. Des volumes de 50 ml de ces cellules sont conservés dans des Erlenmeyer entourés d'aluminium afin de protéger les cellules de la lumière. De plus, les suspensions cellulaires doivent être en agitation permanente à 110 RPM sur 360° (Multi-Shaker PSU 20) à une température de 28°C. Les cellules doivent être repiquées tous les 7 jours et pour cela 0,7 ml de suspensions cellulaires sont placés dans 50 ml de milieu neuf.

4.3.2 Mesure de l'évolution du pH dans le milieu de culture

La mesure de l'évolution du pH extracellulaire est réalisée à l'aide d'une sonde pH (pH 3310, WTW GmbH) précédemment calibrée à l'aide des solutions tampons fournies dans le kit.

Les mesures s'effectuent dans des petits tubes en verre surmontés d'un bouchon en plastique percé de manière à laisser passer la sonde pH qui est stabilisée à l'aide d'un tips. Les tubes en verre sont placés de manière à être agités en permanence à 110 rpm, y compris durant la mesure. Ces derniers sont entourés d'aluminium pour empêcher une exposition des cellules à la lumière.

Pour chaque mesure, on utilise un volume de 10 ml de suspension cellulaire qui sont prélevés à l'aide d'une pipette stérile sous flux laminaire. Les cellules sont âgées de minimum 5 jours à partir du moment où elles ont été repiquées et elles sont en agitation pendant 3 heures avant la mesure. Une fois ce délai écoulé, les différentes mesures sont effectuées selon 4 traitements différents. Le témoin négatif est constitué des cellules de tabac en l'absence d'éliciteur. Le témoin positif est constitué de la suspension cellulaire traitée avec un éliciteur produit par *Bacillus subtilis* : la surfactine (description voir plus haut). Les 2 autres

traitements correspondent à la mise en contact des cellules à la diète artificielle seule et à la diète artificielle en présence de salive de *M. persicae*. La quantité de surfactine est appliquée de manière délicate au fond des tubes en verre à raison de 25 µl par traitement.

Les intervalles de mesure sont de 30 secondes et cela pendant une période de 110 minutes.

4.3.3 Mesure du burst oxydatif

Le burst oxydatif correspond au relargage rapide de formes actives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène et le radical superoxyde à partir de cellules. La mesure de celui-ci consiste à quantifier le nombre de photons issus de la réaction entre le luminol, les FAO et un catalyseur, en l'occurrence le ferrocyanate de potassium. Il s'agit en réalité de la mesure de la chémiluminescence et celle-ci se fait à l'aide d'un luminomètre.

La mesure de la chémiluminescence nécessite un mode de préparation particulier des cellules, à savoir un filtrage sur un filtre en nylon à vide en veillant à ne pas dessécher les cellules. Les cellules présentes sur le filtre sont récupérées à l'aide d'une fine spatule et placées dans une solution de milieu HEPES. Le volume de milieu utilisé est généralement le double de celui qui a été filtré. Une fois les cellules suspendues, celles-ci sont agitées pendant 3 heures sous 110 RPM et 28°C. La composition du milieu HEPES pour 100 ml est la suivante : 48 mg de HEPES, 9 mg de K₂SO₄, 7,3 mg de CaCl₂ et 3,18g de Mannitol.

Les réactifs utilisés pour la réaction sont les suivants : du tampon phosphate 50nM à pH 7,9, du luminol 1,1 mM (conservé à l'obscurité) ainsi que du ferrocyanate de potassium 14 mM qui est le catalyseur de la réaction.

Le milieu de la réaction est constitué de 100 µl de tampon phosphate et 100 µl de luminol. Celui-ci se trouve dans une cuvette de mesure de 2 ml qui sera placée dans le luminomètre. On ajoute à cela 50 µl de suspension cellulaire que l'on prélève à l'aide d'un tips coupé afin de ne pas stresser ces dernières. Les cellules sont traitées différemment avec 15 µl de méthanol, de surfactine, de salive et de miellat.

La réaction débute dès l'ajout 100 µl du catalyseur ferrocyanate de potassium et se déroule très rapidement. La mesure de la production de H₂O₂ est réalisée à l'aide d'un luminomètre préalablement calibré (TD-20/20 Luminometer, Turner Designs) pendant une durée de 30 secondes.

4.4 Approche génomique : clonage du gène codant pour la GOX

4.4.1 Extraction d'ARN total

L'extraction de l'ARN total est réalisée, sur environ 100 mg de pucerons entiers, au moyen du kit RNeasy Mini QUIAGEN (cat : 74103). La concentration de l'ARN est ensuite évaluée au moyen d'un fluoromètre (QUBIT™)

4.4.2 Synthèse de cDNA simple brin pour PCR classique

La synthèse de cDNA se déroule de la manière suivante : 5µl d'ARNm sont dilués dans 6,5 µl d'eau distillée. On ajoute à cela 1µl d'amorces OligodT (10 µM) et le tout est incubé à 65°C pendant 5 min. L'ARN est alors mélangé à 4 µl de tampon PCR 5X, 0,5 µl d'inhibiteur RNase, 2 µl de dNTP (10mM chacune) et 1 µl de transcriptase inverse (Mmulv, 200 unités/ml). Le mélange est ensuite incubé 1 heure à 42°C puis 10 minutes à 10°C. Le tout peut être conservé à -20°C.

4.4.3 Synthèse de cDNA double brin et amplification

Dans un premier temps, la Taq DNA polymérase catalyse la synthèse du second brin de cDNA en utilisant le premier brin comme matrice. Ensuite, la réaction PCR va permettre d'amplifier le fragment de cDNA double brin

4.4.3.1 Choix des amorces

Préalablement à ce travail, plusieurs séquences peptidiques correspondant potentiellement à une GOX ont été identifiées chez *M. persicae* par spectrométrie de masse (Harmel et al, 2008). Sur base de ces séquences peptidiques, deux EST ont été identifiées chez *M. persicae*. Suite à une recherche dans la banque de données NCBI, il s'est avéré que les deux EST identifiées chez *M. persicae* présentaient un niveau d'identité élevé avec une GOX de *A. pisum*. Les amorces reprises dans le tableau ont permis d'amplifier et de séquencer les deux régions manquantes de la GOX de *M. persicae*. Le tableau suivant reprend la séquence de chacune des 6 amorces ainsi que leur température de fusion.

Amorces	Séquence	T° de fusion
GOX 0 FWD	5'- CGT TAT AAA CTC ATG GAT GAT AGC -3'	51,4°C
GOX 1 FWD	5'- TGT TGC AGA CTG GCA GT -3'	54,4°C
GOX 1 REV	5'- ACT GCC AGT CTG CAA CA -3'	54,4°C
GOX 2 FWD	5'- CTG GTT TTG TTA TGT CCT ACG AC -3'	53,6°C
GOX 3 REV	5'- AGC GAA TGA AGA TCC AGA C -3'	52°C
GOX 4 REV	5'- CAA TTG AGT AGT TTG GAT CTT AGT TGT -3'	53,5°C

Tableau 1: Séquences et température de fusion des amorces utilisées

4.4.3.2 Conditions de réaction PCR

Une réaction PCR est nécessaire pour amplifier la région d'intérêt. Les combinaisons d'amorces utilisées sont présentées dans le tableau pour obtenir un total de 7 échantillons. Chaque réaction se déroule dans un volume total de 50 µl. 5 µl du produit obtenu lors de la synthèse de l'ADN simple brin sont mélangés à 5µl de tampon Taq 10X, 1 µl de dNTPs (10 mM chacune), 5 µl de chacune des amorces (10 µM chacune) et 0,3 µl de Taq polymérase. Les 7 tubes sont placés dans l'appareil (iCycler, Bio Rad) afin d'être soumis aux différentes étapes de la PCR qui sont décrites dans le tableau.

Forward	Reverse	Taille en kB
GOX 0	GOX 4	1800
	GOX 3	1140
	GOX 1 Rev	240
GOX 1 Fwd	GOX 4	1500
	GOX 3	840
GOX 2	GOX 4	720
	GOX 3	120

Tableau 2: Combinaisons d'amorces utilisées

1X	95°C	3 min
10X	95°C	45 sec
	48°C	45 sec
	72°C	1 min
30X	95°C	45 sec
	51°C	45 sec
	72°C	1 min
1X	72°C	5 min

Tableau 3 : Programme utilisé lors de la PCR

4.4.3.3 Séparation et purification des produits PCR

Les acides nucléiques peuvent être séparés selon leur taille par une électrophorèse en gel d'agarose. Le gel est réalisé en mélangeant 1 g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE dans lesquels on ajoute 10 µl de bromure d'éthyldium pour la révélation sous une lampe à ultraviolets. Un µl de tampon de charge est ajouté à 5 µl du produit de PCR avant d'être placé dans les puits du gel. La migration s'effectue dans la cuve d'électrophorèse sous une différence de potentiel de 70 Volts pendant 45 minutes. Une fois la migration terminée, le gel est placé sous UV pour la révélation.

Lorsqu'une bande apparaît au poids moléculaire attendu, elle est découpée à l'aide d'une lame de rasoir afin d'être purifiée. Le kit QIAGEN QIAquick® II Gel extraction est utilisé pour cette partie.

4.4.3.4 Ligation de la bande d'intérêt dans un vecteur de clonage

Les bandes d'intérêt ont été clonées dans le vecteur pTZ57R/T au moyen du kit de clonage InsTA™ clone PCR Cloning KIT (Fermentas) selon les recommandations du fabricant.

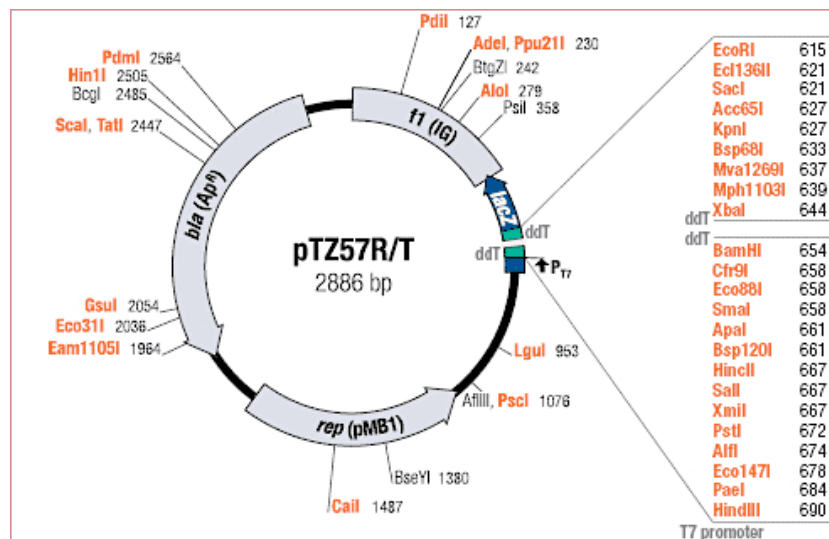


Figure 6: vecteur pTZ57R/T

4.4.3.5 Transformation de bactéries compétentes

Les bactéries compétentes utilisées sont issues d'une souche d'*Escherichia coli* DH5 α et sont ensuite transformées par la méthode du choc thermique. Les bactéries permettent d'obtenir une coloration différentielle bleu-blanc des plasmides recombinants et sont des hôtes appropriées pour les applications de clonage utilisant des plasmides.

4.4.4 Préparation des cellules compétentes

La pré-culture de la souche bactérienne est mise en culture dans 4 ml de milieu LB, durant la nuit dans un incubateur à 37°C. Ensuite, 2 ml de la pré-culture sont transférés dans 200 ml de milieu LB stérile. Le tout est placé dans un incubateur à 37°C sous agitation pendant environ 2 heures jusqu'à obtenir une densité optique à 600 nm de 0,3. Les 200 ml sont ensuite transférés dans des tubes Falcon de 50 ml et centrifugés à 6000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu doucement avec 10 ml de chlorure de calcium 0,1M froid et stérile. Le reste des opérations est effectué à 4°C pour préserver la compétence des cellules. Les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 5000 rpm et le culot est resuspendu avec 800 μ l de chlorure de calcium 0,1M contenant 20% de glycérol. 60 μ l des cellules compétentes sont transférés dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 ml et peuvent être stockées indéfiniment à -80°C.

4.4.5 Transformation des bactéries par la méthode du choc thermique.

5 μl du produit de ligation sont ajoutés à 60 μl de cellules compétentes et l'ensemble est mixé doucement. Après une incubation de 30 minutes sur glace, les cellules subissent le choc thermique à raison de 45 secondes dans un bain d'eau à 42°C. Les cellules sont transférées dans des tubes Falcon de 15 ml en présence de 200 μl de milieu LB et incubées sous agitation à 37°C pendant 1 heure. Les échantillons sont ensuite étalés à raison de 80 μl sur des boîtes de Pétri contenant un milieu de sélection (milieu LB en présence d'agar, ampiciline 100 $\mu\text{g/ml}$, 40 μl de X-Gal 0,8 mg/ml et 10 μl d'IPTG 0,2 mg/ml). Le X-gal peut être métabolisé par les β - galactosidase pour produire un produit bleu. Les cellules exprimant la β - galactosidase et cultivées en présence de X-Gal et IPTG deviennent bleues. Par contre, si un fragment d'ADN a été inséré dans le lacZ (l'un des gènes de la β - galactosidase), il n'y aura pas de coloration bleue et l'identification des cellules ayant intégré un plasmide recombinant sera évidente.

4.4.5.1 Criblage par restriction des transformants

Les colonies blanches obtenues sont prélevées à l'aide d'un cure-dent et mises en culture dans 3 ml de milieu de sélection LB ampicilline (100 $\mu\text{g/ml}$). Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur sous agitation de 140 rpm à 37°C pendant la nuit.

La purification des plasmides est réalisée au moyen du kit QIAGEN QIAprep® Spin Miniprep Kit selon la procédure décrite par le fabricant.

4.4.5.2 Digestion enzymatique des plasmides et électrophorèse sur gel d'agarose

Préalablement au séquençage, une digestion enzymatique du plasmide est réalisée de manière à s'assurer que celui-ci porte bien l'insert attendu. L'étape de digestion est réalisée dans un volume total de 10 μl . Le mix suivant est préparé:

Plasmide	1 μ l
Buffer 10X	1 μ l
Eco R1 (10 u/ μ l)	0,5 μ l
Bam H1 (10 u/ μ l)	0,5 μ l
Eau	7 μ l

Le mélange est ensuite incubé pendant 1h à 37°C. Une séparation sur gel d'agarose 1% permet ensuite de visualiser la digestion (1 μ l de bleu et 5 μ l d'échantillon).

Une fois cette étape réalisée, 30 μ l des échantillons d'intérêt sont envoyés au séquençage (GATC, Allemagne)

4.4.6 Clonage dans le vecteur d'expression pQE30-Xa

4.4.6.1 Amplification au moyen d'amorces possédant les sites de restriction BamH1/Pst1

Des amorces spécifiques à la séquence GOX d'intérêt sont construites de manière à cloner l'insert dans le vecteur pQE30-Xa en phase avec un His-tag du côté terminal. Une réaction PCR, utilisant les amorces ci-dessous, est nécessaire pour amplifier la région d'intérêt correspondante à la GOX. La réaction se déroule dans un volume total de 50 μ l. 2,5 μ l de cDNA sont mélangés à 5 μ l de tampon Taq Pfu 10X, 1 μ l de dNTPs (10 mM chacune), 5 μ l de chacune des amorces pQE (10 μ M chacune) et 0,3 μ l de Taq polymérase Pfu. L'échantillon est placé dans l'appareil (iCycler, Bio Rad) afin d'être soumis aux différentes étapes de la PCR qui sont décrites dans le tableau.

1X	95°C	3 min
35X	95°C	45 sec
	40°C	45 sec
	72°C	4 min
1X	72°C	10 min

Tableau 4: Programme utilisé pour la PCR

4.4.6.2 Préparation de l'insert et du vecteur

4.4.6.2.1 Préparation de l'insert

Les produits de PCR sont ensuite purifiés sur gel d'agarose (kit QIAGEN QIAquick® II Gel extraction) et cloné dans le vecteur pJET (kit CloneJET™ PCR Cloning (Fermentas)). Le mix suivant est préparé :

Buffer 2X	10 μ l
pJET	1 μ l
Produit PCR	2 μ l
H2O	7 μ l
T4 DNA ligase	1 μ l

5 μ l du produit de ligation sont ajoutés à 60 μ l de cellules compétentes et l'ensemble est mélangé doucement. Après une incubation de 30 minutes sur glace, les cellules subissent le choc thermique à raison de 45 secondes dans un bain d'eau à 42°C. Les cellules sont transférées dans des tubes Falcon de 15 ml en présence de 200 μ l de milieu LB et incubées sous agitation à 37°C pendant 1 heure. Les échantillons sont ensuite étalés à raison de 80 μ l sur des boîtes de Pétri contenant un milieu LB.

Les colonies obtenues sont prélevées à l'aide d'un cure-dent et mises en culture dans 4 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline et de la kanamycine. Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur sous agitation de 140 RPM à 37°C pendant la nuit.

La purification des plasmides est réalisée au moyen du kit QIAGEN QIAprep® Spin Miniprep Kit selon la procédure décrite par le fabricant. Les plasmides vont ensuite être digérés deux fois. Le mix suivant a été préparé :

Buffer 10X	5 μ l
Plasmide	15 μ l
Pst1 10 u/ μ l	2 μ l
H2O	28 μ l

Une fois la première digestion réalisée, le produit est purifié à l'aide du kit PCR purification GeneJET™. Pour la deuxième digestion le mix suivant est préparé :

Buffer 10X	10 μ l
Plasmide purifié	25 μ l
BamH1 10 u/ μ l	2 μ l
H2O	63 μ l

Lorsque la bande de l'insert apparaît au poids moléculaire attendu, elle est découpée à l'aide d'une lame de rasoir afin d'être purifiée à l'aide du kit QIAGEN QIAquick[®] II Gel extraction.

4.4.6.2.2 Préparation du vecteur pQE30-Xa

Lors de la préparation du vecteur d'expression, celui-ci va être linéarisé en utilisant les enzymes de restriction appropriées. Les enzymes utilisées sont Pst1 et BamH1 et la digestion est réalisée en deux étapes car les tampons des 2 enzymes ne sont pas compatibles. Le mix suivant est préparé pour la première digestion :

Vecteur 1 μ g	2 μ l
Buffer O 10X	4 μ l
H2O	33 μ l
Pst1 10 u/ μ l	1 μ l

Le mélange est incubé pendant 1h30 à 37°C. L'échantillon est ensuite purifié sur colonne au moyen du kit GeneJET[™] PCR Purification (Fermentas). Pour la deuxième digestion le mix suivant est préparé :

Vecteur purifié	25 μ l
Buffer BamH1	10 μ l
H2O	64 μ l
BamH1 10 u/ μ l	1 μ l

Le mélange est incubé pendant 1h30 à 37°C et une fois cette étape terminée l'échantillon est de nouveau purifié avec le même kit.

De manière à minimiser la recircularisation du vecteur, celui-ci est soumis à un traitement à la phosphatase alcaline (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) qui a pour effet de déphosphoryler les extrémités 5'-phosphate libres nécessaire à la T4 DNA ligase utilisée lors de la ligation. Pour cette étape, le mix suivant a été préparé :

Buffer Ciap 10X	4 μ l
ADN vecteur 1 g	25 μ l
H2O	8 μ l
Enzyme Ciap 3 u/ μ l	3 μ l

Le vecteur pQE30-Xa comprend une région formée de 6 résidus histidine consécutifs. Les protéines marquées par cette région particulière présentent un intérêt lors de la purification. En effet, ces dernières possèdent une forte affinité pour les matrices Ni-NTA utilisées pour les chromatographies.

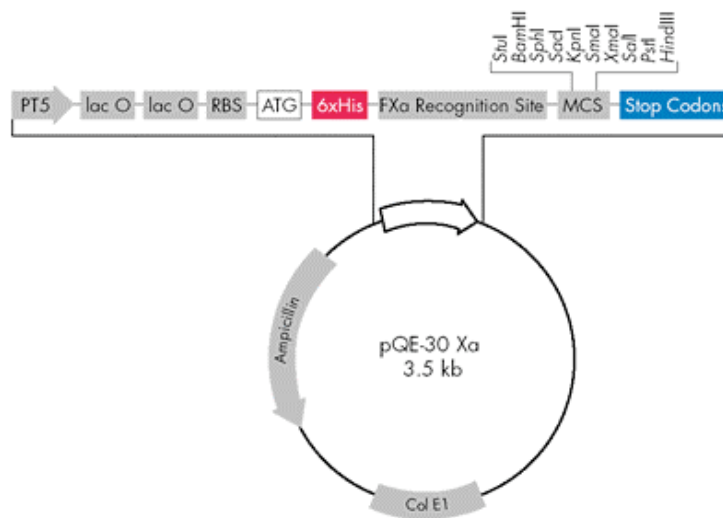


Figure 7: schéma du vecteur pQE30-Xa

4.4.6.3 Ligation de l'insert et du vecteur pQE30-Xa

Pour la ligation de l'insert et du vecteur pQE30-Xa, le kit Rapid DNA Ligation (Roche) a été utilisé. Cette étape nécessite des rapports de concentrations identiques entre le vecteur et l'insert. Le mix suivant a été préparé :

Insert 15 ng/2 μ l	2 μ l
Vecteur 30 ng/2 μ l	1 μ l
Dilution buffer	1 μ l
H2O	1 μ l
T4 DNA ligase buffer	5 μ l
T4 DNA ligase	0,5 μ l

4.4.6.4 Transformation de cellules compétentes M15 (pREP4)

5 μ l du produit de ligation sont ajoutés à 100 μ l de cellules compétentes M15 (pREP4) en suivant le protocole décrit dans le kit QIAexpressionist™ (QIAGEN). Une fois la transformation réalisée, l'échantillon est étalé sur boîte de Pétri dans laquelle on a coulé du milieu LB contenant 25 μ g/ml de kanamycine et 100 μ g/ml d'ampicilline. La boîte est mise à incuber à 37°C pendant la nuit.

4.4.6.5 Minipréparations d'ADN plasmidique et purification des plasmides

Les colonies obtenues sont prélevées à l'aide d'un cure-dent et mises en culture dans 4 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline et de la kanamycine. Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur sous agitation de 140 RPM à 37°C pendant la nuit. 1 ml du volume des échantillons sera dans du glycérol à -80°C.

La purification des plasmides est réalisée au moyen du kit QIAGEN QIAprep® Spin Miniprep Kit selon la procédure décrite par le fabricant.

4.4.6.6 Digestion enzymatique des plasmides et électrophorèse sur gel d'agarose.

Avant l'envoi du plasmide muni de l'insert au séquençage, une digestion enzymatique du plasmide est réalisée de manière à s'assurer que celui-ci porte bien l'insert correspondant à la séquence de la GOX. L'étape de digestion est réalisée dans un volume total de 10 μ l. Le mix suivant est préparé :

Buffer	1 μ l
Plasmide	2,5 μ l
BamH1	0,5 μ l
H2O	6 μ l

Le mélange est ensuite incubé pendant 1h à 37°C. Une séparation sur gel d'agarose permet ensuite de visualiser la digestion.

Une fois cette étape réalisée, 30 μ l des échantillons d'intérêt sont envoyés au séquençage (GATC, Allemagne).

4.4.7 Expression protéique à partir de cultures bactériennes d'*E. coli*.

Les cellules bactériennes stockées dans le glycérol à -80°C sont étalées sur boîte de Pétri par épuisement afin d'obtenir des colonies isolées. À partir de ces colonies isolées, l'expression de la protéine recombinante est réalisée au moyen du kit QIAGEN The QIAexpressionistTM.

4.4.8 Purification de la protéine recombinante

Le principe de purification de la protéine recombinante repose sur la fixation de la protéine, marquée de 6 résidus Histidine consécutifs (6xHis-Tag), sur une matrice de nickel (Ni-NTA). Pour la purification, le kit QIAGEN The QIAexpressionistTM a été utilisé.

4.5 Approche protéomique

Pour l'approche protéomique, on envisage une étude des effets des éliciteurs d'une part sur des cellules de tabac dont la description a été réalisée antérieurement et d'autre part sur des plantes entières d'*A. thaliana*.

En ce qui concerne les semences d'*A. thaliana*, elles sont placées sur du terreau humidifié dans 2 pots en polystyrène situés en permanence dans un fond d'eau. Après 4 semaines, les plantes au stade rosette sont repiquées à raison de 5 plantes par petits pots de 6 x 6 x 7 cm. La température et la photopériode sont similaires à celles des fèves et des pucerons. Pour les expérimentations, les plantes sont utilisées une fois qu'un maximum de biomasse est obtenu et avant l'induction florale.

Les protéomes des plantes saines et élicitées sont comparés grâce au 2D-DIGE, une méthode d'électrophorèse à deux dimensions. Cette méthode permet une comparaison à la fois qualitative et quantitative des échantillons protéiques et permet également de disposer deux échantillons marqués à l'aide de différents fluorophores sur le même gel. La variabilité entre les gels est donc éliminée. Sur chaque gel, on ajoute également un standard interne

composé de quantités égales de tous les échantillons de l'analyse permettant de comparer les différents gels de l'analyse. Cet échantillon est marqué grâce à un fluorophore différent. Les marqueurs fluorescents utilisés sont les trois CyDyes™ : Cy2™, Cy3™, Cy5™ (Amersham Biosciences). La masse et la charge des trois marqueurs ne modifient pas la migration des protéines.

4.5.1 Plan expérimental

En ce qui concerne les plantes entières d'*A. thaliana*, les traitements se déroulent pendant des durées de 24 et 48h. Pour chaque traitement, 10 plantes sont utilisées. Chaque plante d'*A. thaliana* est individualisée quelques jours avant le traitement. Pour l'élicitation à base de salive, environ 25 pucerons sont appliqués par plante tandis que pour l'élicitation à base de miellat, 3 feuilles par plante sont traitées avec un total de 15 µl de miellat. Après le traitement, les feuilles sont coupées à la base de la rosette et conservées à -80°C avant de procéder à l'étape d'extraction des protéines.

En raison du nombre d'échantillons, les analyses se déroulent en plusieurs séries décrites dans les tableaux suivants (Tableau et). Le standard interne (mix) est marqué avec le Cy2™ dans tous les gels tandis que les autres échantillons sont marqués alternativement avec un des deux autres fluorophores. Cette méthode permet d'éviter les différences de marquages de certaines protéines avec le Cy3™ ou le Cy5™.

<i>Gel</i>	<i>Cy3™</i>	<i>Cy5™</i>	<i>Cy2™</i>
1	Salive 24h	Témoin 24h	Mix
2	Témoin 24h	Salive 24h	Mix
3	Miellat 24h	Salive 24h	Mix
4	Salive 24h	Miellat 24h	Mix
5	Témoin 24h	Miellat 24h	Mix
6	Miellat 24h	Témoin 24h	Mix
	12,5µg	12,5µg	12,5µg

<i>Gel</i>	<i>Cy3TM</i>	<i>Cy5TM</i>	<i>Cy2TM</i>
7	Salive 48h	Témoin 48h	Mix
8	Témoin 48h	Salive 48h	Mix
9	Miellat 48h	Salive 48h	Mix
10	Salive 48h	Miellat 48h	Mix
11	Témoin 48h	Miellat 48h	Mix
12	Miellat 48h	Témoin 48h	Mix
	12,5µg	12,5µg	12,5µg

Tableau 5 : Plan expérimental de l'analyse protéomique des plantes entières d'*A. thaliana* élicitées par salive et miellat de pucerons.

4.5.2 Extraction des protéines

Pour l'extraction de protéines à partir de feuilles d'*A. thaliana*, 2 protocoles différents ont été comparés sur base du rendement et de la pureté de l'échantillon mais aussi sur base de la qualité de la séparation des protéines obtenues et l'aspect des gels après électrophorèse 2D.

4.5.2.1 Extraction au TCA

Pour 4 volumes d'échantillons dans un Eppendorf, on ajoute 1 volume de TCA 100% (w/v). Après une incubation de 30 minutes à 4°C, le tout est centrifugé pendant 10 minutes à 14000 RPM et le surnageant est récupéré. Le culot est lavé dans une solution concentrée en acétone (80%) et centrifugé à 14000 RPM pendant 10 minutes. Ces deux opérations sont effectuées 2 fois et le culot est ensuite resuspendu dans un tampon UT pendant 1 heure à 4°C.

4.5.2.2 Extraction au phénol

Les échantillons congelés sont moulus dans l'azote liquide. La poudre de plante est placée dans un Falcon de 50 ml dans lequel on ajoute 7,5 ml de tampon d'extraction. Le tout est agité pendant 10 minutes. On ajoute 7,5 ml d'une solution de phénol saturée en tris et le tout est placé sous agitation pendant 10 minutes à température ambiante. On centrifuge pendant 20 minutes à 5000g à 4°C et après cela, la phase supérieure contenant le phénol est placée dans un nouveau Falcon avec un équivalent de tampon d'extraction. L'ensemble est vortexé et placé sous agitation pendant 10 minutes. Cette étape est répétée 2 fois. Après la

dernière extraction, les protéines sont précipitées par ajout de 10 ml de méthanol. Une incubation à -80°C durant la nuit est réalisée. Après un passage à la centrifugeuse pendant 10 minutes, le surnageant est écarté et le culot est de nouveau lavé avec 10 ml de méthanol. Cette étape est réalisée 2 fois. Le surnageant est écarté sans toucher au culot et ce dernier est lavé avec 10 ml solution d'acétone (80%). On procède alors 2 fois à un passage à la centrifugeuse pendant 5 minutes à 5000g. Lors du dernier lavage, la solution est séparée (une fois le culot resuspendu dans l'UT-tris) dans des tubes de 2 ml et une fois le surnageant évaporé les échantillons sont conservés à -20°C .

4.5.3 Quantification des protéines

La quantification est effectuée au moyen du kit RC/DC Protein Assay (Bio-Rad) en utilisant comme étalon 6 solutions de sérum bovine albumine (BSA) ayant des concentrations de 0,36 à 2,88 mg/ml. Il est nécessaire de réaliser un blanco contenant 25 μl d'eau et subissant toutes les étapes du protocole.

4.5.4 Marquages aux CyDyesTM

Les solutions stock de CyDyeTM sont conservées à -80°C et sont diluées à une concentration de 100 pmol/ μl pour le marquage des protéines. La concentration de tous les échantillons est portée à 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. 12,5 μg d'échantillons doivent être marqués par 1 μl de CyDyeTM pendant 30 minutes à l'obscurité. La réaction est stoppée par l'ajout d'1 μl de lysine 10 mM. Cette étape a lieu à l'obscurité pendant 30 minutes.

4.5.5 Séparation des protéines

Une fois que les protéines ont été dosées et marquées, il faut encore les séparer pour permettre leur identification. La séparation s'opère d'abord selon une première dimension qui correspond à une focalisation isoélectrique. Les protéines sont séparées grâce à leur charge nette. Ensuite, la seconde dimension utilise des électrophorèses sur gels de polyacrylamide et sodium dodecylsulfate (SDS). Il s'agit de techniques appelées SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) où le SDS, un détergent anionique, favorise la dénaturation des protéines en les entourant d'un manchon de charge négative.

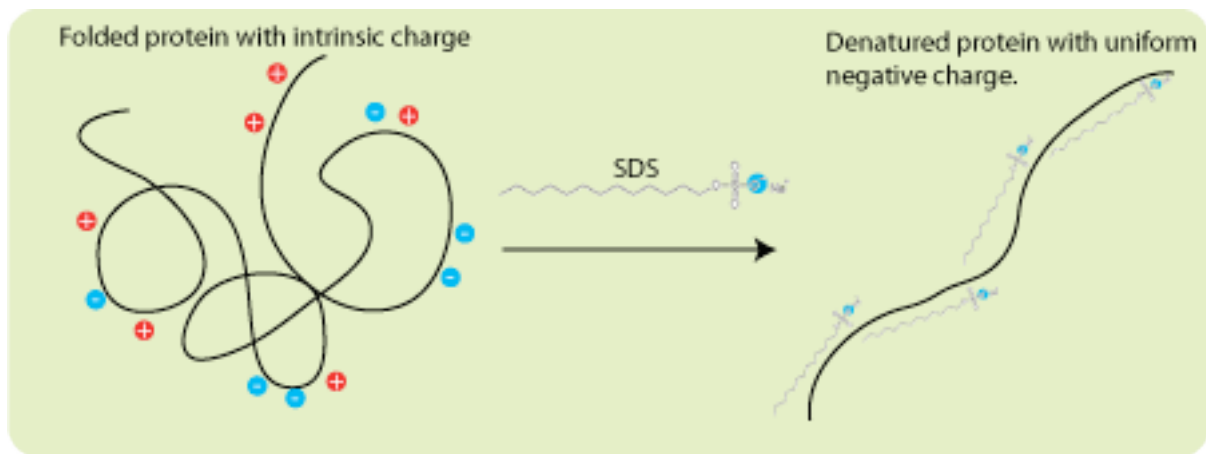


Figure 8: Procédé de dénaturation des protéines en présence de SDS

Les charges négatives se situent donc le long de la protéine lui conférant ainsi une charge proportionnelle à son poids moléculaire. Lors de la migration dans le gel, ces charges vont migrer de façon différentielle à travers un champ électrique en fonction du poids moléculaire.

4.5.5.1 Electrophorèse en 2 dimensions

L'électrophorèse en 2 dimensions va donc permettre de séparer les protéines sur base de 2 critères différents à savoir leur point isoélectrique (pI) et leur poids moléculaire. Une fois cette opération effectuée, des spots protéiques seront visibles et identifiables sur les différents gels. Lors de l'interprétation d'un gel en 2 dimensions, l'axe des abscisses correspond à des valeurs croissantes de pI (de gauche à droite) et l'axe des ordonnées correspond à des valeurs de poids moléculaires croissantes (du haut vers le bas).

4.5.5.1.1 Préparation des échantillons

Les 3 échantillons de chaque gel sont réunis dans un eppendorf 0,5 ml. Après une incubation de 20 minutes à l'obscurité avec du DDT 10% et de l'IPG buffer 2%, le volume est ajusté à 440 μ l avec du tampon de réhydratation. 10 μ l de bleu de bromophénol sont ajoutés et permettent l'observation du bon déroulement de la focalisation isoélectrique.

La fonction du tampon de réhydratation est multiple. En effet, l'urée qu'il contient solubilise et dénature les protéines en disruptant les liaisons non covalentes à l'intérieur de celles-ci. La thiourée améliore la solubilisation des protéines. L'utilisation d'agent réducteur comme le dithiothreitol (DDT) rompt des ponts disulfures tandis que l'ASB 14 est un détergent zwitterionique favorisant la solubilisation des protéines membranaires. Enfin, les ampholytes produisent une conductivité uniforme à travers le gradient de pH lors de la première dimension.

4.5.5.1.2 Focalisation isolélectrique

Le principe de base de la focalisation isoélectrique (IEF : Isoelectric focusing) est de créer un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les protéines soumises à un champ électrique. Les protéines migreront dans ce champ électrique. Arrivées au pH correspondant à leur pI, elles s'immobiliseront puisque leur charge nette sera nulle. De cette façon, il est possible de séparer les protéines d'un échantillon selon leur pI.

Un strip holder permet d'accueillir les strips dans le Protean IEF cell (Bio-Rad). De fins morceaux de papier Whatman sont disposés sur les électrodes du strip holder et imprégnés de tampon de réhydratation pour permettre le contact avec les électrodes sans endommager les gels. Les échantillons sont disposés de manière uniforme entre les 2 électrodes et ensuite recouverts des strips. Les strips utilisés lors de la focalisation sont des Immobiline™ Dry Strip pH 3-11 NL de 24 centimètres (Amersham Biosciences) entreposés à -20°C. Le côté gel est placé contre l'échantillon. Dans chaque sillon, 2 ml d'huile minérale recouvrent l'ensemble. Le programme de voltage appliqué dans l'IEF est décrit dans le tableau suivant :

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

Tableau 6: Programme de focalisation électrique

Les strips doivent ensuite subir une étape d'équilibration avant la seconde dimension. Cette étape se compose d'une première phase de réduction des protéines à l'aide de DDT pour briser les ponts disulfures et d'une seconde phase d'alkylation à l'aide d'iodoacétamide (IAA) pour que les ponts disulfures ne se reforment pas. Ainsi les protéines sont marquées en fonction de leur longueur grâce au SDS.

Les strips sont préalablement rincés à l'eau désionisée et disposés dans le strip holder. Pour les deux réactions, la solution suivante est préparée :

<i>Composition</i>	<i>1 l</i>	<i>30 ml</i>
Urée	360,35 g	10,81 g
Tris	62,5 ml	1,875 ml
Glycérol	200 ml	6 ml
SDS	20 g	0,6 g

Pour la réduction, 0,2 g de DDT par 10 ml de solution sont ajoutés et le tout est laissé incubé 15 minutes sous agitation. Pour l'alkylation, 0,25 g d'IAA par 10 ml de solution sont ajoutés ainsi que 10 μ l de bleu de bromophénol. Le tout est incubé pendant 15 minutes sous agitation.

4.5.5.1.3 Seconde dimension

Après l'étape de focalisation isoélectrique, les protéines doivent à présent être séparées selon leur poids moléculaire grâce au sodium dodecylsulfate (SDS) et à une des électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les strips sont placés au sommet des gels de polyacrylamide 12% dont la composition figure dans le tableau suivant :

<i>Composition</i>	<i>Nombre de gels</i>	
	1	6
Acrylamide / Bis-acrylamide 30%	33,4 ml	200 ml
Tris 1,5M pH 8,8	20 ml	120 ml
H ₂ O	25,2 ml	152,6 ml
SDS 10%	1 ml	6 ml
APS 10%	0,4 ml	2,4 ml
TEMED	40 μ l	240 μ l
Volume total	80 ml	480 ml

Tableau 7: Composition des gels de polyacrylamide

Les gels ne polymérisent pas tant que le TEMED (NNN N – tétraméthyléthylènediamine) et l’APS n’ont pas été ajoutés. En effet, lorsque ceux-ci réagissent avec la lumière, ils deviennent des anions hyper actifs enclenchant la polymérisation. Les gels sont coulés dans l’Ettan DALT gel casting cassette (GE Healthcare) et du SDS 0,1% est pulvérisé au dessus des gels afin d’éviter une déshydratation.

Les strips sont ensuite placés au sommet des gels de polyacrylamide 12% et stabilisés avec 2 ml d’agarose 0,5%. Les éventuelles bulles sont chassées. Les plaques portant les gels sont posées sur le portoir de la cuve Ettan DALTsix electrophoresis system (GE Healthcare) remplie de TGS. Cette dernière est reliée à une cuve de refroidissement et une pompe maintenant la température à 15°C. L’électrophorèse se déroule avec une puissance de 1 Watt par gel.

4.5.6 Révélation des spots protéiques

Une fois la deuxième dimension réalisée, les gels vont être scannés grâce au Typhoon 9400 (GE Healthcare). Cet appareil excite successivement les CyDyes™ à l’aide de lasers différents. Les spectres de longueurs d’ondes d’excitation et d’émission des fluorophores sont suffisamment différents pour permettre d’identifier le signal indépendamment. Des filtres d’émission sont appliqués pour s’assurer que le signal enregistré par le système optique ne provienne que du fluorochrome excité.

Fluorophore	Emission Filter (nm)	Laser
Cy2	520 BP 40	Blue2 (488)
Cy3	580 BP 30	Green (532)
Cy5	670 BP 30	Red (633)

Tableau 8 : Longueurs d’onde des filtres d’émission et caractéristiques des CyDyes™

Les voltages PMT sont réglés de manière à éviter la saturation des spots protéiques tout en ayant une intensité maximale de ces derniers. En effet, la saturation compromet l’analyse des concentrations des spots protéiques. Cela est vérifié à l’aide du programme ImageQuant™ TL (GE Healthcare). Les voltages PMT utilisés pour les Cy2™, Cy3™ et Cy5™ sont respectivement 665V, 660V et 660V. Ces réglages sont effectués lors de scans

rapides à faible résolution (1000 μm) et les gels sont ensuite scannés à haute résolution (100 μm) pendant une heure.

4.5.7 Analyse d'image

Une fois les gels scannés, l'image est analysée avec le programme Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics). Le programme permet de faire correspondre les signaux des standards de chaque gel entre eux ainsi que les signaux des échantillons marqués aux Cy3TM et aux Cy5TM avec le signal du standard du même gel. Les gels sont alignés grâce à des vecteurs générés automatiquement et manuellement. Le logiciel permet la sélection de spots peptidiques d'intérêt, c'est à dire dont l'intensité est modulée entre plusieurs conditions expérimentales, en l'occurrence des sujets sains et d'autres infestés de salive de pucerons et de miellat. Seules les zones dont l'intensité est significativement différente du bruit de fond et plus particulièrement, celles dont l'intensité varie statistiquement entre les différentes conditions expérimentales ($p \leq 0,05$) sont sélectionnées. Les spots d'intérêt peuvent aussi être observés en 3 dimensions afin de vérifier s'il s'agit bien d'une protéine. En effet, des poussières peuvent être considérées comme des spots par le programme.

4.5.8 Spot picking

La liste des spots protéiques candidats à l'identification par spectrométrie de masse est réalisée suite à l'analyse d'image. La liste est transmise au EttanTM spot picker (GE Healthcare), sous forme de coordonnées. Les spots sont excisés et placés dans une plaque de 96 puits.

5 Résultats et discussion.

5.1 Approche protéomique

5.1.1 Extraction des protéines

Préalablement à l'analyse protéomique différentielle proprement dite, deux méthodes d'extraction de protéines à partir de cellules de feuilles d'*A. thaliana* broyées ont été testées. La comparaison des deux protocoles d'extraction est réalisée sur base de la qualité de la séparation des protéines sur un gel 2D. Les échantillons ont subi une première séparation en fonction de leur point isoélectrique (première dimension) et ensuite une seconde séparation selon leur poids moléculaire. Les gels ont ensuite été colorés au nitrate d'argent et scannés.

La qualité des gels lors du passage sur le scanner ne permet pas d'observer une différence marquante. Cela est dû notamment à la fragilité des gels d'acrylamide et à la difficulté de les décoller des plaques en verre. Cependant, immédiatement après la coloration au nitrate d'argent, il apparaît très nettement une meilleure séparation des spots protéiques sur les deux axes selon la méthode d'extraction au phénol. En effet, les spots protéiques étaient deux fois plus concentrés sur le gel avec la méthode d'extraction au TCA. Une meilleure migration avait déjà été observée lors de la première dimension pour la méthode au phénol, ce qui confirme le meilleur aspect du gel 2D après coloration.

5.1.2 Expression protéique différentielle

5.1.2.1 Cellules de tabac

Les premières analyses ont été faites sur des cellules de tabac de 5 jours. Ces dernières ont été élicitées avec 750 µl de diète contenant de la salive, par 20 ml de suspension cellulaire. Ce volume correspond environ à la salive de 350 pucerons. Les concentrations protéiques des échantillons étaient suffisantes afin d'effectuer le marquage aux CyDyesTM, ces

dernières étant de 5,43 et 5,24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour les échantillons traités et de 4,42 et 6,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour les échantillons témoins.

Les 4 gels DIGE de cette analyse sont des gels analytiques, ce qui signifie qu'il n'est pas possible de faire de picking ni d'identification, les gels n'étant pas fixés à la plaque de verre. Les 4 gels de l'expérience ont donc été analysés à l'aide du programme Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics) et celui-ci a identifié un total 945 spots protéiques. Pour identifier le nombre de protéines exprimées de façon différentielle, une vérification manuelle a été effectuée. Seulement 17 spots seront repris comme étant réellement exprimés de manière différentielle avec une différence statistiquement significative. Leur localisation sur le gel est présentée à la figure suivante.

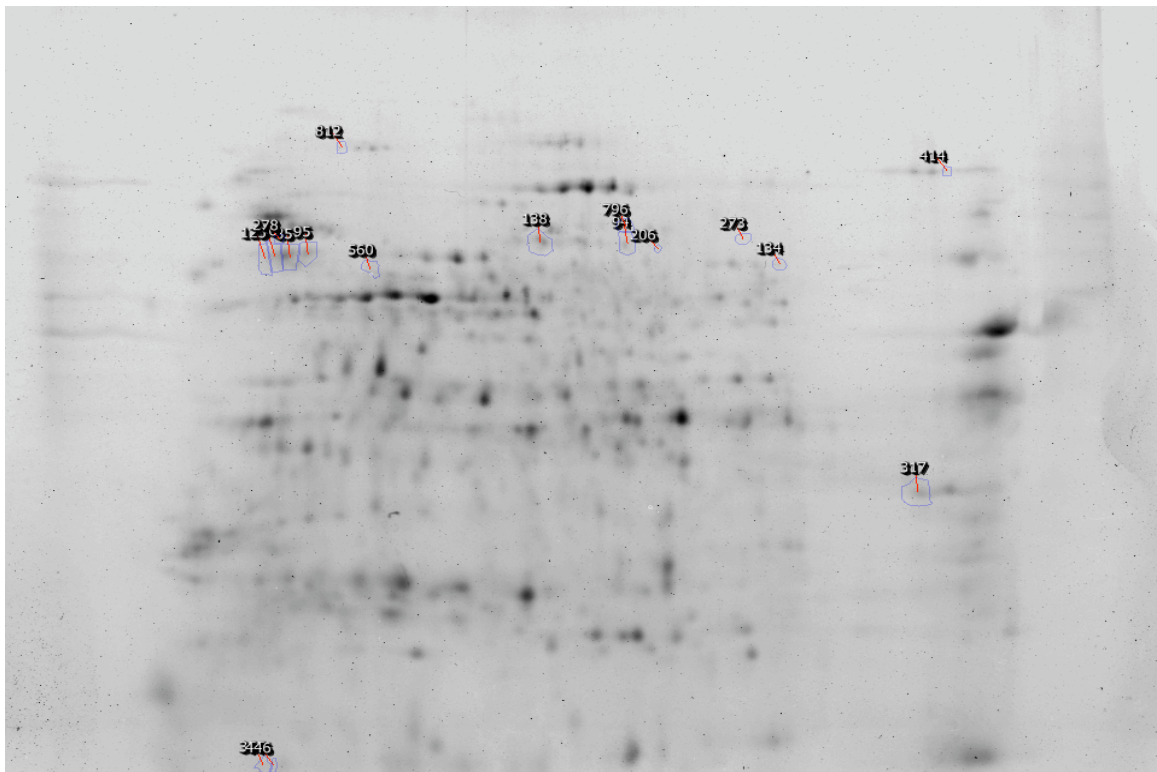


Figure 9 : Gel 2D reprenant les protéines exprimées de manière différentielle chez les cellules de tabac traitées avec la diète contenant la salive de *M. persicae*

5.1.2.2 Cellules de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* broyées

Les concentrations protéiques des échantillons étaient suffisantes pour effectuer un marquage aux CyDyes™, ces dernières étant de 17,19 et 18,13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour les échantillons

traités à la salive, de 11,64 et 11,45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour les échantillons traités avec du miellat et enfin de 9,07 et 10,22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour les échantillons témoins.

Parmi les 12 gels de l'expérience, un de ceux-ci est un gel préparatif, ce qui signifie que le gel est fixé à la plaque en verre et autorise donc un picking et une identification des protéines. Le gel préparatif correspond à un mix des 6 échantillons comprenant 300 μg de protéines, c'est-à-dire 50 μg de chaque échantillon. Les 12 gels de l'expérience ont été analysés à l'aide du même programme et celui-ci a identifié un total de 867 spots protéiques, parmi lesquels seulement 12 spots seront repris comme étant réellement exprimés de manière différentielle avec une différence statistiquement significative. Parmi ces spots, 2 correspondent exclusivement à l'infestation par salive de pucerons, 5 au traitement par miellat et 3 sont communs aux 2 traitements.

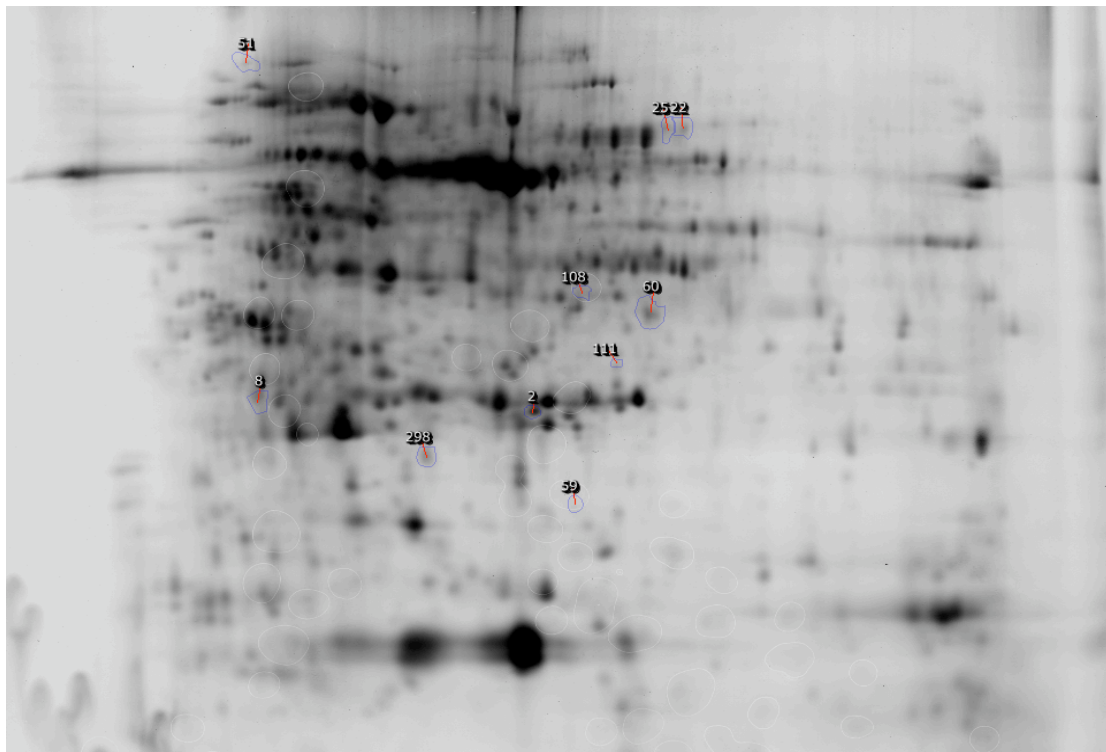


Figure 10: Gel 2D reprenant les protéines exprimées de manière différentielle sur feuilles d'*A. thaliana* traitées avec la diète contenant la salive ainsi qu'avec du miellat

5.1.3 Identification des protéines

Les protéines considérées comme exprimées différemment et ayant subi la digestion ont été envoyées à Liège afin d'être analysées par MALDI-TOF. Il s'agit d'un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol. Les protéines sont en cours d'identification.

5.2 Approche cellulaire

5.2.1 Evolution du pH extracellulaire

Les variations de pH au niveau cellulaire font partie des premiers événements qui apparaissent lors de la reconnaissance d'un éliciteur par une cellule. On observe généralement une alcalinisation du milieu extracellulaire et une acidification cytoplasmique, résultant de l'entrée de protons et d'ions calcium dans le cytoplasme

Afin d'identifier une éventuelle activité élicitrice présente dans la salive de *M. persicae*, nous avons mis en contact une suspension cellulaire de tabac avec différentes quantités de diète contenant de la salive. Les témoins négatif et positif correspondent respectivement aux cellules de tabac seules et à des cellules élicitées avec de la surfactine, un éliciteur connu. Afin de vérifier qu'une éventuelle modification de pH provenait bien de la salive, des cellules de tabac ont également été traitées avec de la diète seule.

Les résultats obtenus lors des différents traitements sont présentés dans la figure suivante.

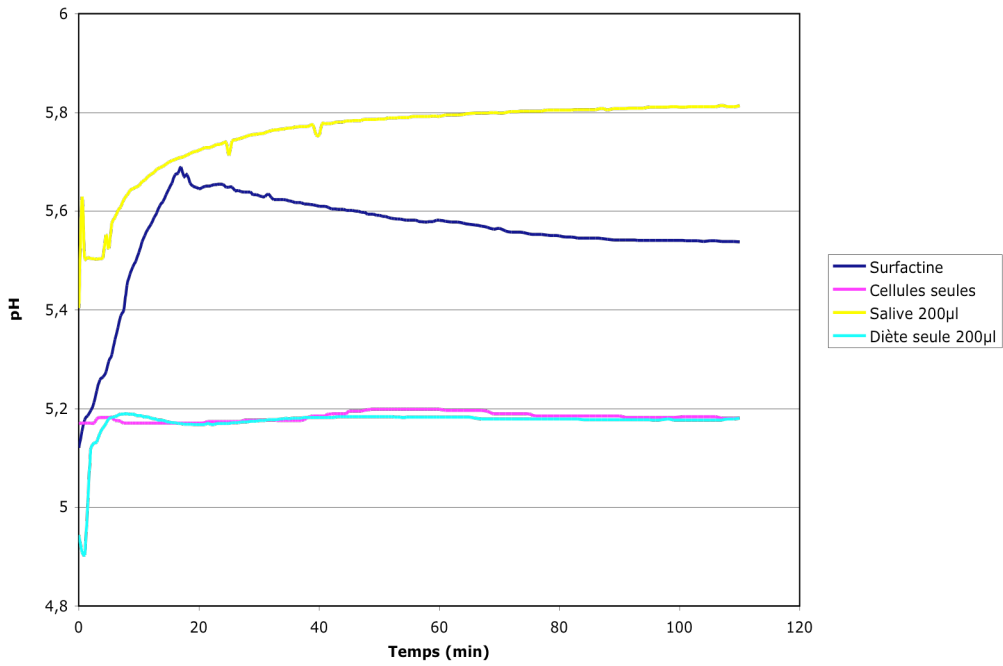


Figure 11: Evolution du pH extracellulaire après ajout de 200 µl de diète et 200 µl de diète avec salive

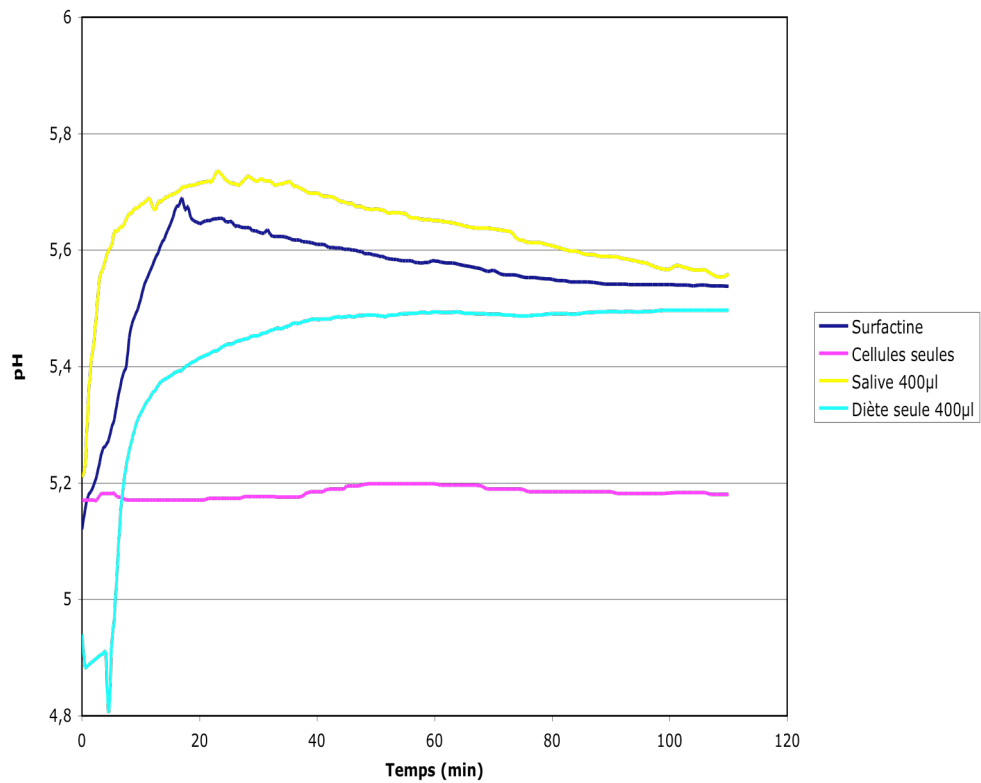


Figure 12: Evolution du pH extracellulaire après ajout de 400 µl de diète et 400 µl de diète avec salive

La première chose que l'on peut observer est que le pH des cellules seules n'évolue pas pendant la période de mesure. Des variations très faibles peuvent cependant apparaître à cause du stress occasionné par la mesure elle-même mais ces variations sont négligeables.

Le témoin positif correspondant aux cellules traitées avec la surfactine, montre que pendant les premières minutes de l'élicitation, il se produit une alcalinisation relativement rapide du milieu extracellulaire jusqu'à la 17^{ième} minute. Ensuite, le pH tend à redescendre légèrement pendant le reste de la mesure.

Lorsque l'on ajoute une quantité de diète seule de 200µl, la première observation est une légère acidification du milieu pendant les premières minutes de l'élicitation. Ensuite, on observe une alcalinisation du milieu assez rapide et le pH se stabilise pour donner une courbe de type plateau.

Suite à l'ajout d'une quantité de diète seule de 400µl, l'observation est similaire à la précédente. En effet, on remarque tout d'abord une légère acidification, suivie d'une alcalinisation et d'une stabilisation du pH.

La variation de pH observée après l'ajout de diète seule est proportionnelle à la quantité. Il est à noter que le pH de la diète se situe à une valeur de 7,5 et qu'il est donc assez normal d'observer un effet tampon suite à l'ajout de celle-ci, le pH des cellules de tabac se situant dans des valeurs comprises entre 4,8 et 5,3. L'acidification observée au début de l'élicitation peut être la conséquence d'un stress provoqué par l'ajout de la diète.

Lors d'une addition de 200µl de diète contenant de la salive, on observe une alcalinisation du milieu durant les 30 à 40 premières minutes. Ce phénomène est suivi d'une stabilisation du pH comme précédemment observé pour les cellules mises en présence de diète seule. Il semble donc que les cellules ne répondent pas à ce traitement.

L'ajout de 400µl de diète contenant de la salive provoque une alcalinisation durant les 30 premières minutes. Ce phénomène est suivi d'une décroissance du pH pendant le reste de la durée de mesure. L'aspect de la courbe de ce traitement ressemble fortement à celle de la surfactine et on peut penser que les cellules répondent au traitement.

Etant donné que le pH des cellules de tabac n'est pas le même à chaque analyse, la représentation des écarts maximums observés lors d'un traitement peut également être utile. La figure suivante reprend le maximum des écarts de pH observé pour chaque traitement.

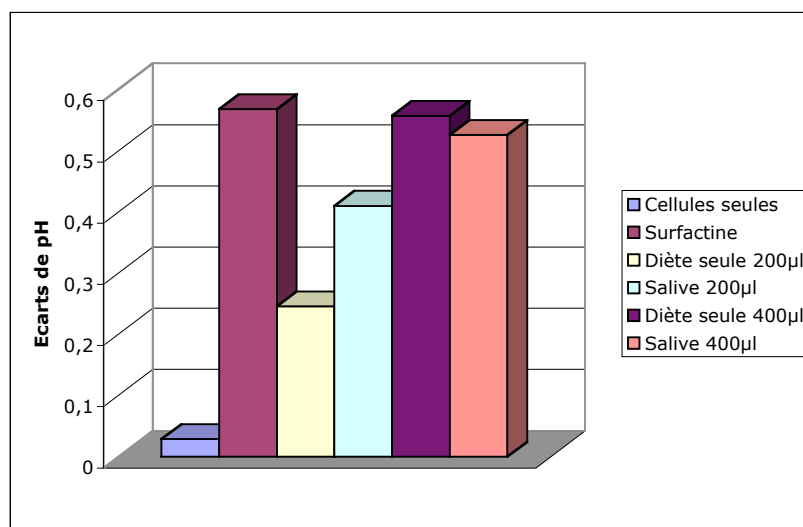


Figure 13: Ecart maximum de pH observés lors des différents traitements (surfactine, diète 200 µl, diète et salive 200µl, diète 400 µl, diète et salive 400 µl)

Il faut être prudent avant d'affirmer que l'ajout de 400µl de diète avec salive provoque une réponse des cellules de tabac et qu'il s'agit bien d'un mécanisme de défense et non d'un effet tampon dû au pH neutre de la diète. D'une part, parce que les mesures n'ont été réalisées qu'une seule fois mais également parce que le pH de la diète en présence de salive n'est pas connu et qu'il risque de biaiser les interprétations. Celui-ci peut être modifié en présence des différents composés salivaires de *M. persicae*. Un autre paramètre dont il faut tenir compte est le volume avec lequel les cellules de tabac sont élicitées. En effet, lors d'un traitement avec la surfactine, un volume de 20µl suffit pour provoquer une augmentation de pH de plus de 0,5 unité tandis qu'il faut 400µl de diète contenant de la salive pour provoquer une réponse similaire.

Il faut également tenir compte du fait que les modifications de pH sont des réactions relativement spécifiques qui peuvent varier d'un éliciteur à l'autre. A priori, la courbe de pH des cellules en présence de 400µl de diète avec salive est similaire à celle obtenue pour les cellules traitées à la surfactine, mais nous ne pouvons pas affirmer la présence d'un réel pouvoir éliciteur présent dans la salive de *M. persicae*.

Enfin, afin de caractériser au mieux les modifications de pH des cellules de tabac, il est également été intéressant de procéder à des mesures où les cellules sont mises en contact avec de la diète contenant de la salive portée à ébullition. En effet, le fait de chauffer le liquide permettrait de dégrader les protéines contenues dans la salive. Il serait alors possible

d'obtenir des informations complémentaires sur l'implication de composés protéiques sur les modifications de pH.

5.2.2 Mesure du burst oxydatif

Parmi les premiers évènements cellulaires qui apparaissent suite à une élicitation, on trouve la production de formes actives de l'oxygène. Ce phénomène a généralement lieu dans les premières minutes et joue un rôle important dans l'activation des mécanismes de défense.

Lors de cette expérience nous avons essayé de mettre en évidence la production de FAO chez des cellules de tabac en présence de diète contenant de la salive de *M. persicae*. Le témoin positif est constitué par la surfactine (éliciteur connu) et le témoin négatif est constitué par les cellules seules.

Les résultats obtenus lorsque les cellules sont mises en contact avec la diète contenant de la salive sont très proches de zéro et restent stationnaires durant toute la durée de mesure. Le résultat est identique quelque soit le volume de diète contenant la salive ajouté. La même observation est réalisée lorsque les cellules sont mises en contact avec la diète seule. Le témoin positif, quant à lui, montre très clairement une réaction importante durant les premières minutes de l'analyse avant de redescendre progressivement et de se terminer après 30 minutes. La figure suivante montre l'évolution de l'émission de photons pour les cellules mises en contact avec la surfactine.

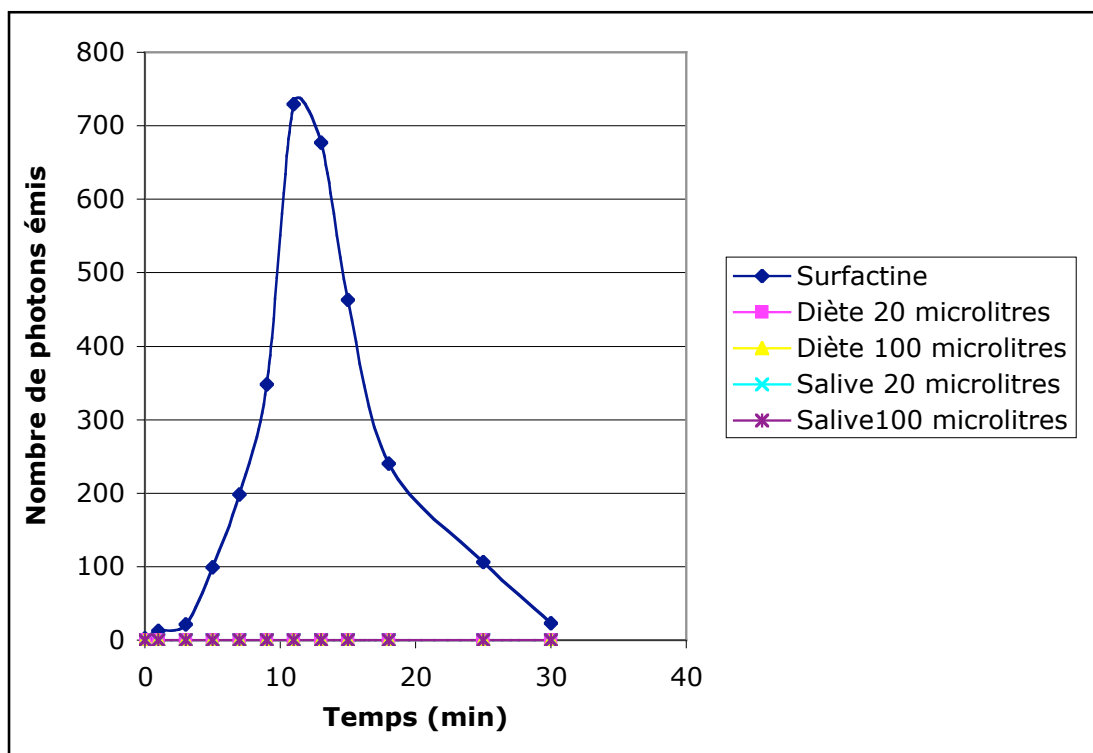


Figure 14: Emission de photons en fonction du temps pour les cellules traitées avec la surfactine

Il semble donc que ni la salive ni la diète n'entraînent la production de FAO par les cellules durant les traitements. Le fait que les cellules traitées avec de la diète contenant de la salive présentent une très faible émission de photons pourrait suggérer la présence de composés antioxydants dans la salive de *M. persicae*. Cependant, cette hypothèse n'est pas retenue en raison de la réponse similaire des cellules traitées avec de la diète seule.

5.3 Approche génomique

5.3.1 Clonage d'un ADNc codant la glucose oxydase chez *M. persicae*

Jusqu'à présent, aucun éliciteur connu n'a été identifié avec certitude dans la salive des pucerons. Cependant, des études ont montré que les composés salivaires jouaient un rôle dans l'induction et la manipulation des défenses de l'hôte (Zhu-Salzman et al., 2004). Les enzymes salivaires des pucerons interviennent certainement dans la détoxification des défenses

de la plante. Récemment, une activité enzymatique Glucose Oxydase (GOX) a été détectée dans la salive de *M. persicae* (Harmel et al., 2008). La GOX a déjà été identifiée comme éliciteur chez certains insectes broyeurs dont certaines espèces de Lépidoptères (Eichenseer et al., 1999) mais jamais chez les pucerons, ce qui constitue une nouveauté. Parmi ses effets, la GOX a notamment pour rôle de diminuer la concentration de nicotine induite, agissant comme allomone, lors d'une blessure mécanique chez des plants de tabac. Elle diminue également la transcription des gènes codant pour des synomones chez le tabac (Bede et al., 2006).

L'objectif de l'approche génomique développée dans le cadre de ce travail était de (1) cloner un gène codant pour une GOX chez le puceron *M. persicae* de manière à pouvoir ensuite (2) produire la protéine recombinante d'intérêt et (3) étudier l'effet de celle-ci sur des cellules de tabac.

Le point de départ de cette approche est l'identification dans la salive de *M. persicae* de deux peptides présentant un haut niveau d'identité en acides aminés avec deux EST (Express Sequence Tag, c'est-à-dire une courte portion séquencée d'un ADN complémentaire) du puceron *M. persicae* et nommées respectivement EC389056 et EE262240 (Harmel et al., 2008).

>Myzus_EC389056

FNTGMSGSSFADIEVHQFYIPKNSYSKLCQLKSMFGFSDNSLSVYAKLNYERAISIFTIALINTKSTSKILL
RSKNPLDSPPIVGNMLTEKHDKVKSFIEAIKLLSKIEKSDGMKLVNAKLEDIDLGDCAKYTKKTNEHWEC
LLKYMVSTTSSTAGSCRMGLETDKDAVVDSELNVIGISNLRAVGRSVLLLITSAYSHVPCIMVAERAYG
MIKSKYN

>Myzus_EC262240

VADWQYKIQPDSTTGFGIEGNMKIHKGKCLGGSSTTSAQLYVRGSEQLYNTLVKKGLKNWSYNTTETY
FKKVERIRSVTKTETNTTIYGKCLIPVSKFRKTEVSVLEKIVCSGFEHIGCKKESDINEKDIEVGFVSMQ
GIIKNGRSVNTAKAYLSPIFGRENKVMKYSRVTKIIVNKTEMKATGVEVQTKFGQTLTKAKLEVLLC
AGAVGSAQILLASGIGPKKHLSEMEVPVVKDLKVGENFLITPVFTGFVMSYDKSVVCNQTEEEIAFKYL
ARHSGPFX

Figure 15 : Séquences en acides aminés des deux peptides identifiés chez *M. persicae*.

Les deux EST identifiées ont été analysées à l'aide du programme BLASTp et présentent un haut pourcentage d'identité en acides aminés (>99%) avec une protéine du puceron *A. pisum* (numéro d'accèsion XP 001949532.1). Cette observation ainsi que l'appartenance de la protéine d'*A. pisum* à la superfamille de GMC (Glucose-Méthanol-

Choline), dont la GOX fait partie, tend à confirmer l'hypothèse d'un gène codant pour une GOX chez *M. persicae*. L'utilisation du logiciel ClustalW nous a permis de constater que les deux EST présentent plus de 90% d'identité avec la séquence d'*A. pisum* et qu'une fois alignées sur celle-ci, seules deux portions de respectivement 70 et 16 acides aminés sont manquantes.

```

>Acyrtosiphon_XP001949532.1
MDDSIYPQDSTRYVINDEEFDFIIVGGGNAGCVLANKLSENVKWKVLLIEAGGDPFPITQIPSLWDRSLN
SVADWQFKIQPDSTTGFGIGGNMKIHKGRGLGGSSITSAQLYVRGSEQLYNSLVKKGLKNWSYNT
TETYFKKVERIRSITKTETNTTIYGKCGLIPVSKFRKTEVSVLEKIVCSGFEHIGCKKESDINEKDIE
VGFVSMQGIHKNGRSINTAKAYLSPIFGRENLKVMSYRVTKIIVNKTEMKATGVEVQTKFGQTL
TIKAKLEVLLCAGAVGSAQILLASGIGPKKHLSEMEVPPVKDLKVGENFLITPVFTGFVISYDKSV
VCNQTDDEEIAFKYLARHSGPLSRPNGMSFGGFLNTGMSGSSFADIEVHQFYIPKNSYSKLCQLKSMF
GFSNLLSVYAKLNYERAISIFTIALINVKSTSKILLRSKNPLDSPHIIGNMLTEKHDIKSFLEAIKLLS
KIEKSDGMNLVNAKLEDIDLDCAKYTKKTNEHWECLLYMVSTTSSTAGSCRMGLETDTDAVV
DGELNVIGISNLRAVGRSVLPMITSAYSHVPCIMVAERAYGMIKSKYN

```

Figure 16 : Alignement des deux EST de *M. persicae* sur la séquence de *A. pisum*

Dans un premier temps, des amorces spécifiques ont été construites sur base de la séquence nucléotidique d'*A. pisum*, de manière à amplifier les deux régions manquantes. Plusieurs combinaisons d'amorces ont été testées, celles-ci étant reprises au point 3.4.3.2.. Les positions des amorces sur la séquence sont présentées sur la figure de l'annexe I.

Dans un second temps, des amorces N- et C-terminales spécifiques au gène codant potentiellement une GOX de *M. persicae* ont été construites afin d'amplifier le gène au complet. Ces amorces possèdent des sites de restriction BamH1 et Pst1 de manière à cloner ensuite l'insert dans le vecteur d'expression pQE30-Xa. Les amorces sont présentées dans la figure de l'annexe X et les sites de restriction sont présentés en gras.

La séquence amplifiée code pour une protéine de 583 acides aminés, son poids moléculaire théorique est de 64,384 kDa et son pI théorique est de 9 (déterminés à l'aide du logiciel ProtCalc)

```

MDDSIYPQDSTRYVINDEEFDFIIVGGGNAGCVLANKLSENIKWKVLLIEAGGDPFPITQVPSLWDRSLN
SVADWQYKIQPDSTTGFGIEGNMKIHKGKCLGGSSTTSAQLYVRGSEQLYNTLVKKGLKNWSYNTTET
YFKKVERIRSVTKTETNTTIYGKCGLPVSKFRKTEVSVLEKIVCSGFEHIGCKKESDINEKDIEVGFVSM
QGIKNGRSVNTAKAYLSPIFGRENKVMKYSRVTKIIVNKTEMKATGVEVQTKFGQTLTKAKLEVLL
CAGAVGSAQILLASGIGPKKHLSEMEVPVVKDLKVGENFLITPVFTGFVMSYDKSVVCNQTEEEIAFKY
LARHSGPLSRPNGMSFGGFLNTGMSGSSFADIEVHQFYIPKNSYSKLCQLKSMFGFSDNLSVYAKLNY
ERAISIFTIALINTKSTSKILLRSKNPLDSPIIVGNMLTEKHDVKSFIEAIKLLSKIEKSDGMKLVNAKLEDI
DLDGCAKYTKTNEHWECLLYMVSTTSSTAGSCRMGLETDKDAVVDSELNVIGISNLRAVGRSVLPL
ITSAYSHVPCIMVAERAYGMIKSKYN

```

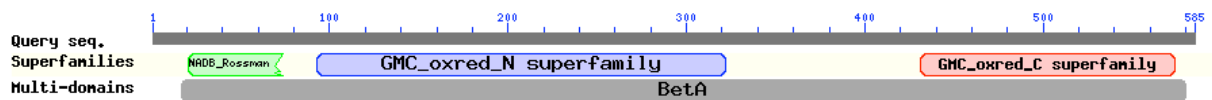


Figure 17: Séquence codante de la GOX et niveau d'appartenance à la superfamille des GMC

L'analyse à l'aide du logiciel BLASTp révèle que la séquence appartient à la superfamille des GMC oxydoréductases. Elle présente un haut degré d'identité avec la séquence XP 001949532.1 d'*A. pisum* (96%). Elle semble également fortement similaire à des séquences encore non identifiées et appartenant à d'autres ordres d'insectes à savoir *Nasonia vitripennis* (99%) et *Tribolium castaneum* (98%). Il semble donc que la protéine clonée soit fortement conservée.

5.3.2 Essais d'expression dans *E. coli*

Notre second objectif était de produire en suffisance la protéine recombinante d'intérêt pour (1) vérifier qu'elle possède bien une activité du type GOX et (2) étudier son effet au niveau biologique (par exemple sur cellules de tabac). Pour se faire, le système d'expression qui a été retenu est la bactérie *Escherichia Coli*. En effet, *E. Coli* est l'un des hôtes les plus largement utilisés pour la production de protéines recombinantes, en raison notamment de la rapidité et de la simplicité du système d'expression ainsi que de la quantité élevée de protéine recombinante produite (de l'ordre du g/l).

5.3.2.1 Induction de la protéine recombinante

Deux méthodes d'induction ont été testées. La première se déroule à 37°C pendant une durée de 5 heures et la seconde pendant toute la nuit à température ambiante.

En comparant sur gel 1D, les fractions cellulaires prélevées avant et après induction à l'IPTG, il apparaît que, quelle que soit la méthode utilisée, le niveau d'induction est relativement faible.

Cette observation a également été faite par Benet et al. (1998) lors de l'expression en bactérie du gène codant pour la GOX d'*A. niger*. La méthode d'induction ne doit donc, a priori, pas être remise en cause.

Le faible niveau d'induction observé pourrait être la conséquence d'autres paramètres à savoir une éventuelle toxicité de la protéine pour la cellule, une faible stabilité de la protéine ou la présence de protéases chez la souche hôte. Il est également possible que les cellules d'*E. coli* identifient la protéine du gène eucaryotique comme étrangère et la détruisent. De manière à améliorer le niveau de production de la protéine recombinante d'intérêt, il serait peut-être utile d'envisager d'autres systèmes d'expression (levure, cellules d'insectes, cellules de mammifères).

5.3.2.2 Purification de la protéine recombinante

Le principe de la purification de la protéine est une chromatographie d'affinité où la protéine, préalablement marquée de 6 résidus consécutifs histidine (6xHis Tag), se lie avec une matrice de nickel (Ni-NTA).

Comme montré à la figure suivante, les différentes étapes du processus de purification engendrent une perte importante de la protéine d'intérêt, celle-ci se situant à 66 kDa. Les marqueurs de poids moléculaires sont situés de part et d'autre du gel.

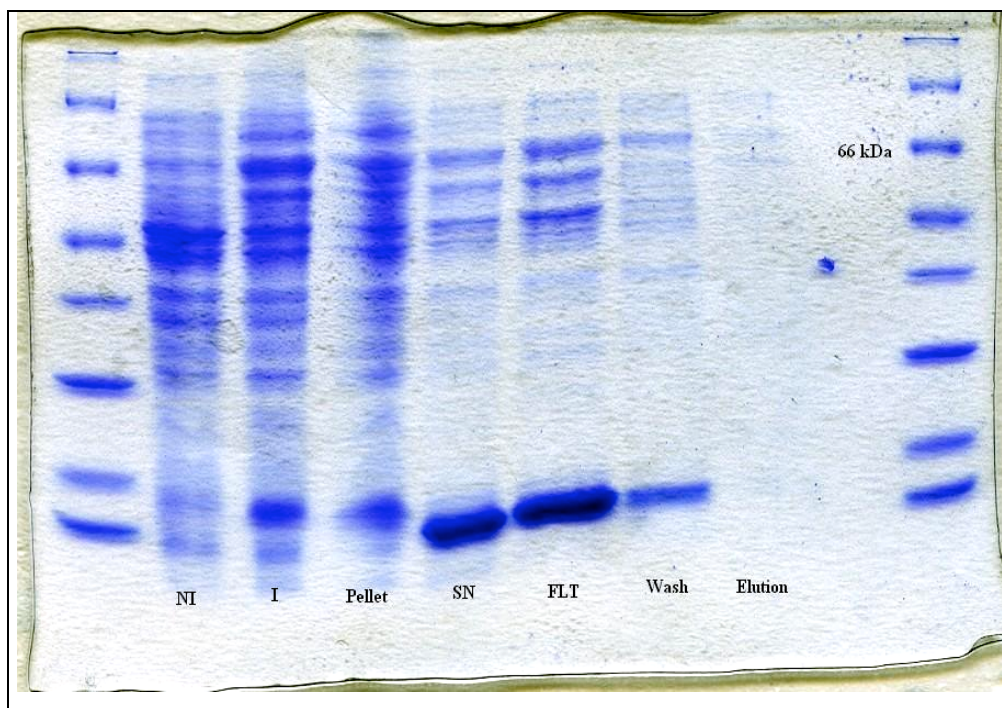


Figure 18: Gel 1D reprenant les différentes fractions à partir de l'étape d'induction jusqu'à la purification [NI : non induit ; I : induit ; Pellet : culot ; SN : surnageant ; FLT : flow through ; Wash : wash ; Elution : elution]

Afin d'essayer de réduire cette perte, différents tampons ont été testés. En effet, les concentrations en imidazole des tampons de lyse et de lavage ont été réduites à respectivement 1mM et 10mM afin de limiter la compétition entre la fixation de l'imidazole et celle de la protéine à la matrice. Cependant, des pertes lors des étapes de purification étant inévitables et compte tenu du faible niveau d'induction obtenu, il ne nous a pas été possible d'obtenir une concentration en protéine recombinante supérieure à 0,49 μ g/ μ l.

5.3.2.3 Test d'activité enzymatique

Afin de confirmer l'activité d'une GOX dans les échantillons, un test d'activité enzymatique a été réalisé sur plusieurs fractions. Le test a été réalisé sur extrait brut, c'est-à-dire avant la purification sur matrice Ni-NTA mais aussi sur « flow through » (fraction comprenant les protéines qui ne se lient pas à la colonne), « wash » (fraction récoltée après lavage de la colonne) et « elution » (fraction récoltée après élution de la protéine d'intérêt). Une GOX purifiée d'*Aspergillus niger* (Sigma Aldrich) est utilisée comme témoin positif afin d'assurer la bonne mise en œuvre du test d'activité. Les absorbances de différentes concentrations en GOX pure ont été mesurées à 400nm et figurent dans le tableau suivant. Les

différentes valeurs obtenues pour la GOX d'*A. niger* permettent de constater que le test d'activité enzymatique est efficace.

<i>Concentration (ng/μl)</i>	<i>Absorbance</i>
1	0,559
10	0,719
100	0,873

Tableau 9: Absorbances mesurées à 400nm pour différentes concentrations en GOX pure

Concernant les valeurs d'absorbance des différentes fractions, celles-ci sont présentées à la figure suivante et mises en relations avec les concentrations en protéines mesurées.

<i>Fractions</i>	<i>Absorbance</i>	<i>Concentration (μg/μl)</i>
Extrait brut	0,064	3,79
Flow through	0,024	3,18
Wash	-0,002	1,12
Eluat	0,012	0,49

Tableau 10: Absorbances mesurées à 400 nm et concentrations des différentes fractions de la purification de la protéine recombinante.

Il apparaît que l'absorbance décroît au fur et à mesure de l'étape de purification, et cela parallèlement à la concentration en protéine.

Lorsque l'on compare les valeurs d'absorbance des différentes fractions à celles de la GOX pure, on remarque que l'activité enzymatique est très faible même pour la fraction « extrait brut » n'ayant pas subi l'étape de purification. La sensibilité du test d'activité enzymatique est relativement importante puisqu'une variation de densité optique est déjà observée avec une concentration en GOX d'*A. niger* de 1ng/μl. Cependant, malgré une concentration en protéines dans l'éluat de 490 ng/μl, l'absorbance mesurée reste quasi nulle. Des résultats similaires ont été observés lors des différentes répétitions. Les résultats obtenus lors du test d'activité enzymatique ne nous permettent donc pas d'affirmer que le gène cloné code effectivement pour une GOX. Au stade actuel, l'amélioration des protocoles d'expression et de purification est nécessaire de manière à pouvoir répéter les tests d'activité sur la protéine purifiée. Néanmoins, au vu des faibles niveaux d'activité observés, l'hypothèse selon laquelle la séquence obtenue pourrait coder pour une Glucose Déshydrogénase (GLD) a

été posée. En effet, lors de nos analyses Blastp, nous avons pu remarquer que les GOX et GLD présentent généralement un important niveau d'identité (>80%). Bien que Harmel (2008) n'ait pas observé d'activité GLD sur salive de pucerons, contrairement au test d'activité GOX qui s'était révélé positif, il serait intéressant de vérifier cette hypothèse sur protéines purifiées.

6 Conclusions et perspectives

Les résultats obtenus lors de l'investigation du protéome de plantes d'*A. thaliana* sains et infestés de pucerons nous permettent d'observer une expression différentielle de protéines. Malheureusement, l'identification de ces protéines n'ayant pas encore eu lieu, il n'est pas encore possible de connaître la nature des protéines induites. Cependant, le fait que le génome d'*A. thaliana* soit complètement séquencé constituera un avantage lors de l'identification de ces protéines. Nous avons également appliqué de la salive de puceron sur le pédoncule de feuilles d'*A. thaliana* coupées à la base afin de vérifier que l'expression des protéines est également induite. Les échantillons sont conservés à -80°C .

Concernant les cellules de tabac, l'analyse 2D-DIGE nous a permis d'observer 15 protéines exprimées différemment. Il serait également intéressant de procéder à une identification de ces protéines afin d'observer d'une part, si il y a correspondance des protéines induites avec celles identifiées chez *A. thaliana*, et d'autre part si les protéines induites diffèrent d'un traitement à l'autre. Pour cela, des échantillons de cellules de tabac élicitées avec de la surfactine, de la salive de *M. persicae* et du miellat sont conservés à -20°C dans l'attente d'être analysés.

Pour que l'analyse soit complète, l'étude des mécanismes de défense sera également réalisée sur plantes entières de tabac. En effet, les conditions du milieu dans lesquelles se trouve la suspension cellulaire sont relativement éloignées de celles rencontrées en champ sur plantes entières.

Enfin, l'évaluation de l'expression de gènes codant pour différentes protéines PR sera réalisée grâce notamment à l'hybridation sur Northern Blot ainsi que sur puces « Microarray ». Ces techniques permettent d'analyser le niveau d'expression d'un gène dans une cellule ou un tissu à un moment donné et dans un état donné, par rapport à un échantillon de référence.

Au niveau cellulaire, après l'ajout de 400 μl de diète contenant de la salive nous avons observé une modification de pH de la suspension de cellules de tabac similaire à celle provoquée par la surfactine. Cependant, nous devons émettre une réserve concernant ce résultat. En effet, le pH de la diète est de 7,5 alors que celui des cellules se situe entre 4,8 et 5,3. La réaction observée pourrait donc être le résultat d'un effet tampon plutôt que d'un mécanisme de défense. De plus, des répétitions doivent être effectuées et le pH de la diète

contenant de la salive doit également être mesuré afin de caractériser au mieux cet événement cellulaire précoce.

La faible émission de photons lors de la mesure du burst oxydatif indique qu'il n'y a pas de libération de formes actives de l'oxygène (FAO) lors de la mise en contact de la diète contenant la salive avec les cellules, même avec un volume de 100 µl, volume correspondant environ à la salive de 50 pucerons.

Une étude a récemment mis en évidence une activité enzymatique de type GOX dans la salive de puceron. Dans le cadre de ce travail, nous avons cloné un gène codant pour GOX et tenté de produire la protéine recombinante d'intérêt dans le vecteur d'expression *E. coli*. A l'issue de ce travail, il apparaît que la protéine d'intérêt n'est que faiblement produite par la bactérie. Au stade actuel, il est donc encore nécessaire d'optimiser les protocoles d'expression et de purification de manière à pouvoir répéter les tests d'activité sur des échantillons suffisamment concentrés en protéine d'intérêt. De manière à améliorer le niveau de production de la protéine recombinante d'intérêt, il serait peut-être utile d'envisager d'autres systèmes d'expression (levure, cellules d'insectes, cellules de mammifères).

Les levures présentent notamment l'avantage d'être un système d'expression eucaryote relativement simple. Ce système d'expression a d'ailleurs été utilisé avec succès pour la GOX d'*A. niger* dans *Hansenula polymorpha* (Hodgkins et al., 1993) et pour la GOX de *Penicillium* dans *Pichia pastoris* (Crognale et al., 2006).

Le système de production en cellules d'insectes garantit en général de bons rendements de production. De plus, nous pouvons penser a priori que les différents cofacteurs nécessaires à la bonne production de la protéine seront présents et que les éventuelles modifications post-traductionnelles garantissant l'activité de la protéine seront réalisées. Cependant, aucun exemple d'expression de GOX en cellules d'insectes n'a encore été référencé.

Le système d'expression en cellules de mammifères peut également être envisagé, il s'avère toutefois plus difficile à mettre en place et génère un coût de production élevé. De plus, les cellules sont lentes à produire. Ce système d'expression a été utilisé notamment pour l'expression d'une GOX de *Spodoptera exigua* (Afshar et al., 2010 ; Communication personnelle).

Une fois que nous aurons obtenu la protéine purifiée en suffisance, un test d'activité GOX sera effectué. Les GOX et GLD présentant généralement d'importants niveaux d'identité (>80%), un test d'activité GLD sera également réalisé.

Des tests biologiques sur cellules de tabac (mesures de pH et de burst oxydatif) pourront ensuite être envisagés afin d'évaluer l'effet éliciteur de la protéine d'intérêt.

Annexes

Annexe I : position des amorces sur la séquence d'*A. pisum*

Apisum	ATGGATGATAGCATATATCCCCAAGACTCCACGCGTTATGTCATAAACGATGAAGAGTTC	60
Myzus_EE262240	-----	
Apisum	GATTTTATTATTGTCGGTGGTGGTAATGCGGGATGCGTTCTAGCAAACAAGCTATCCGAA	120
Myzus_EE262240	-----	
Apisum	AATGTCAAATGGAAGTATTATTAATTGAAGCAGGCGGGGACCCCTCCCTATAACGCAA	180
Myzus_EE262240	-----	
	Gox_1 FWD Gox_1 REV	
Apisum	ATTCCTAGCTTATGGGACAGGTCACTAAATAGTGTGCGACTGGCAGTTCAAAAACAA	240
Myzus_EE262240	-----TGTTGCGACTGGCAGTATAAAATACAA	28

Apisum	CCAGATAGTACAACCTGGATTGGAAATGGAGGTAATATGAAAATACATAAAGGAAGAGGC	300
Myzus_EE262240	CCTGATAGTACAACCGGATTTGGTATTGAAGTAACATGAAAATACATAAAGGAAATGC	88
	** ***** **	
Apisum	TTAGGAGGAAGCAGCATCAGAGTGCTCAACTTTATGTTAGAGGAAGTGAACAATTATAT	360
Myzus_EE262240	TTAGGAGGAAGCAGCACCAGAGTGCTCAACTTTATGTCAGAGGAAGTGAACAATTATAT	148

Apisum	AACTCACTTGTTAAAAAAGGCTTAAAAAATGGTCTTACAATACAACAGAGACCTACTTC	420
Myzus_EE262240	AACACACTTGTTAAAAAAGGTTTAAAGAATTGGTCTTATAATACAACGGAGACTTACTTC	208
	** ***** **	
Apisum	AAAAAGGTCGAAAGAATTCGCTCAATTACAAAACTGAAACAAACTACCATTATGGA	480
Myzus_EE262240	AAAAAGGTCGAAAGAATTCGCTCAGTTACAAAAACCGAACTAACACTACTATTTATGGA	268

Apisum	AAATGTGGACTTATCCCTGTAAGCAAATTCGAAAACTGAAGTAAGCGTTTTAGAAAAA	540
Myzus_EE262240	AAATGTGGACTTATCCCTGTAAGCAAATTCGAAAACTGAAGTGAGCGTTTTAGAAAAA	328

Apisum	ATAGTATGTTCTGGTTTCGAACATATTGGTTGTAAAAAAGAAAGTGACATCAACGAAAAA	600
Myzus_EE262240	ATTGTATGTTCTGGTTTGAACATATCGGTTGTAAAAAAGAAAGTGACATCAACGAAAAA	388
	** ***** **	
Apisum	GACATTGAAGTTGGATTTGTTTCAATGCAAGGAATAATAAAGAACGGTAGATCTATTAAC	660
Myzus_EE262240	GACATTGAAGTTGGATTTGTATCAATGCAAGGAATAATAAAGAACGGTAGGTCGTTAAC	448

Apisum	ACCGCTAAGGCATATTTAAGCCCAATTTTCGGCCGTGAAAACCTAAAAGTTATGAAATAT	720
Myzus_EE262240	ACTGCTAAGGCATATCTAAGCCCAATTTTCGGTCTGAAAACCTAAAAGTTATGAAATAT	508
	** ***** **	
Apisum	TCCAGAGTTACAAAAATTATAGTAAACAAAACAGAAATGAAGGCGACTGGAGTTGAAGTA	780
Myzus_EE262240	TCTAGAGTTACAAAAATTATAGTTAACAAAACAGAAATGAAGGCGACCGGAGTTGAAGTA	568
	** ***** **	
Apisum	CAGACGAAATTCGGTCAGACTCTAACATAAAAGCTAAATTAGAAGTTTACTTTGTGCT	840
Myzus_EE262240	CAGACGAAATTCGGTCAAACCTAACACTGAAAGCTAAATTAGAAGTTTACTTTGTGCT	628

Apisum	GGGGCTGTGGTTCTGCTCAGATATTGTTGGCCTCAGGTATTGGGCCTAAAAGCATTG	900
Myzus_EE262240	GGGGCTGTGGTTCTGCTCAGATATTGTTGGCCTCGGGTATTGGGCCTAAAAGCATTG	688

Apisum	TCTGAAATGGAAGTCCAGTGGTCAAAGACTTAAAAGTAGGTGAGAATTTCTTAATTACT	960
Myzus_EE262240	TCCGAAATGGAAGTCCCAGTAGTCAAAGACCTAAAAGTAGGTGAGAATTTCTTAATTACT	748
	** ***** **	
	Gox_2 FWD	
Apisum	CCAGTGTTTACTGGCTTTGTTATCTCCTACGACAAATCAGTTGTTTGTACCAACACAGAT	1020
Myzus_EE262240	CCAGTGTTTACTGGTTTTGTTATGTCCTACGACAAATCAGTTGTTTGTACCAACACAGAA	808

Apisum GAAGAAATTCCTTCAAATACTTGGCTAGGCATTGAGACCCTTAAGTAGACCAAAATGGT 1080
 Myzus_EE262240 GAAGAAATTCATTCAAATACTTAGCTAGACATTGAGGCCCTTA----- 854
 ***** *
Gox_3 REV

Apisum ATGAGCTTTGGTGGATTCTTAAACACTGGTATGTCTGGATCTTCATTCGCTGATATTGAA 1140
 Myzus_EC389056 -----GTTTAAACACTGGTATGTCTGGATCTTCATTCGCTGATATTGAA 44
 ** *****

Apisum GTTCATCAATTTTACATTCTTAAAACTCTTATTCAAAGTTATGCCAACTAAAAATCAATG 1200
 Myzus_EC389056 GTTCATCAATTTTACATTCTTAAAAATCTTATTCAAATTTATGCCAACTAAAAATCAATG 104

Apisum TTTGGATTTAGTGATAAATTTGTTATCAGTGTATGCTAAATGAATTATGAACGTGCTATT 1260
 Myzus_EC389056 TTTGGATTTAGTGATAAATTCGTTATCGGTGTATGCTAAATGAATTACGAACGTGCTATT 164

Apisum TCTATTTTACAATAGCTTTAATAAACGTAAAAAGTACCAGCAAAATCTTTTAAAGAAGT 1320
 Myzus_EC389056 TCTATCTTACAATAGCTTTGATAAACACGAAAAGTACCAGCAAAATCTTTTAAAGAAGT 224

Apisum AAGAACCATTGGACAGTCCGATTATTATTGGCAACATGTTGACGGAGAAACACGATATT 1380
 Myzus_EC389056 AAGAACCATTAGACAGTCCGATTATTGTTGGCAATATGTTGACGGAGAAAGCATGATGTT 284
 ***** ** **

Apisum AAAAGTTTCTCGAAGCCATCAAAATTAATCTCCAAAATGAAAAATCTGATGGAATGAAT 1440
 Myzus_EC389056 AAAAGTTTCATCGAAGCCATCAAAATTAATCTCCAAAATGAGAAAATCTGATGGAATGAAG 344

Apisum TTAGTAAACGCGAAGTTAGAAGATATTGACCTCGATGGATGTGCAAAAATACACTAAAAAG 1500
 Myzus_EC389056 TTAGTAAACGCGAAGTTAGAAGATATTGATCTCGACGGATGTGCAAAAATACACCAAAAAG 404
 ***** **

Apisum ACCAATGAGCACTGGGAGTGCTTATTAAAAATACATGGTGTCTACAACGTCAAGTACTGCT 1560
 Myzus_EC389056 ACCAATGAACACTGGGAGTGCTTATTGAAATATATGGTATCTACAACGTCCAGTACTGCT 464

Apisum GGATCGTGTGCTATGGGATTAGAACTGACACAGATGCTGTTGTTGATGGTGAAGTGAAC 1620
 Myzus_EC389056 GGATCGTGTGCTATGGGATTAGAACTGACAAAAGATGCTGTTGTTGACAGTGAAGTGAAT 524

Apisum GTGATTGGTATTTCTAATTTGCGAGCAGTTGGCCGATCTGTTTTGCCAATGATTACTAGT 1680
 Myzus_EC389056 GTGATTGGTATTTCTAATTTGCGAGCAGTTGGGTCGATCTGTTTTGCTATTGATTACTAGT 584
 ***** **

Apisum GCTTACAGTCATGTGCCTTGTATCATGGTCGCTGAAAGGCATATGGTATGATAAAAAGT 1740
 Myzus_EC389056 GCTTACAGTCATGTGCCTTGTATCATGGTCGCTGAAAGGCATATGGTATGATAAAAAGT 644

Apisum AAATACAATA 1752 Gox_4 REV
 Myzus_EC389056 AAATACAATAAGATCCAACTACTCAATTG

Bibliographie

- Adie BA., Perez-Perez J., 2007. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19(5), 1665-1681.
- Alborn HT., Turlings TCJ., Jones TH., Stenhagen G., Loughrin JH., Tumlinson JH., 1997. An elicitor of plants volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, 276, 945-949.
- Alborn HT., Hansen TV., Tapey HJ., Bennett DC., Tumlinson JH. & Schmelz EA., 2007. Disulfoxy fatty acids from the American bird grasshopper *Schistocerca americana*, elicitors of plant volatiles. *P Natl Acad Sci USA*, 104(32), 12976-12981.
- Arimura G., Tashiro K., Kuhara S., Nishioka T., Ozawa R. & Takabayashi J., 2000. Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles. *Biochemistry and Biophysiological Research Communication*, 277, 305-310.
- Ayers AR., Ebel J., Finelli F., Berger N., Albersheim P., 1976. Host pathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol* 57, 751-759.
- Balbi V., Devoto A., 2008. Jasmonate signaling network in Arabidopsis thaliana: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol*, 177, 301-318
- Bargen H., Saudhof K. & Poelhing H.M., 1998. Prey finding by larvae and adult females of *Episyrphus balteatus*. *Entomol. Exp. Appl.*, 87, 245-254.
- Bate N.J., Riley J.C.M., Thompson J.E. & Rothstein S.J., 1998. Quantitative and qualitative differences in C6-volatile production from the lipoxygenase pathway in an alcohol dehydrogenase mutant of Arabidopsis thaliana. *Physiol. Plantarum*, 104, 97-104.
- Benhamou N., 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Sciences*, 1, 233-240
- Benet C., 1998. Clonage de la glucose oxydase d'Aspergillus niger, obtention de sondes immunologiques et transformation de la chicorée industrielle. Mémoire FUNDP, 66p
- Bennett RN., Wallsgrove RM., 1994. Secondary Metabolites in Plant Defense-Mechanisms. *New Phytologist*, 127, 617-633.
- Bestwick C. S., Brown IR., et al., 1997. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv phaseolica. *Plant Cell*, 9, 209-221.
- Blackman R.L. & Eastop V.F., 2000. Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide. *John Wiley*, Chichester, UK.

- Bloch C., Richardson M., 1991. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect α -amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat γ -purothionins. *FEBS Lett* 279, 101-104
- Boissy G., de La Fortelle E., Kahn R., Huet J. C., Bricogne G., Pernollet J. C. and Brunie S., 1996. Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* 4: 1429-39.
- Bolwell G. P., 1999. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Plant Biol* 2: 287-294
- Bonnemain JL. & Chollet JF., 2003. L'arsenal phytosanitaire face aux ennemis des plantes. Considérations générales. *C. R. Biologies*, 326:1-7.
- Bonnet P., 1985. Réactions différentielles du tabac à 9 espèces de *Phytophthora*. *Agronomie*. 5: 801-808.
- Bostock, R. M., Kuc, J. A., and Laine, R. A., 1981. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science* 212, 67-69.
- Boudart G., Lafitte C., Barthe J. P., Frasez D. and EsquerreTugaye M. T., 1998. Differential elicitation of defence responses by pectic fragments in bean seedlings. *Planta*. 206, 86-94.
- Bourque S., Binet M.N., Ponchet M., Pugin A. and Lebrun-Garcia A., 1999. Characterisation of cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem*. 274, 34699-34705.
- Bradley D. J., Kjellbom P. and Lamb C. J., 1992. Elicitor-Induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein - A novel, rapid defense response. *Cell*. 70, 21-30.
- Brisson L. F., Tenhaken R. and Lamb C., 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6, 1703-1712.
- Brown I., Trethowan J., Kerry M., Mansfield J., Bolwell GP., 1998. Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *The Plant Journal* 15, 333-343
- Buckley, R.C., 1987. Interactions involving plants, homoptera, and ants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 8: 111-135.
- Budenberg W.J. & Powell W., 1992. The role of honeydew as an ovipositional stimulant for two species of syrphids. *Entomol. Exp. Appl.*, 64, 57-61.
- Bush DS., 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46 : 95-122.
- Chandra S., Low PS., 1995. Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4120-4123.

Chandra S., Stennis M. and Low PS., 1997. Measurement of Ca²⁺ fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J Biol Chem*, 272, 28274-80.

Cherqui A., Tjallingii WF., 2000. Salivary proteins of aphids, a pilot study on identification, separation and immunolocalisation. *J Insect Physiol.*, 46, 1177-86.

Cohen Y., 1993. Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by DL-3-amino-n-butanoic acids. *Phytopathology*, 84, 55-59

Colilla FJ., Rocher A. and Mendez E., 1990. Gamma-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett* , 270, 191-194

Constabel, C. Peter; Lynn Yip and Clarence A. Ryan, 1998. "Prosystemin from potato, black nightshade, and bell pepper: primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides". *Plant Molecular Biology* , 36 (1), 55-62.

Cook BJ., Clay RP., Bergmann CW., Albersheim P., Darvill AG.,1999. Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase inhibiting proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12, 703-711.

Creelman RA., Tierney ML., 1992. Jasmonic acid/ methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of National Academy of Science USA* , 89(11), 4938-4941.

Creelman RA., Mullet JE., 1997. Biosynthesis and action of jasmonate in plants.. *Plant Mol. Biol.*, 48, 355-381

Croft KPC., Jhtner F. and Slusarenko AJ., 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Phys.*, 101, 13-24.

Cronagle S., Pulci V., Brozzoli V., Petruccioli M., Federici F., 2006. Expression of *Penicillium variabile* P16 glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial technology*, 39(6), 1230-1235

Dangl J., 1998. Plants just say NO to pathogens. *Nature*, 394, 525-526

De Laat AMM. and Van Loon JC.,1982. Regulation of ethylenebiosynthesis in virus-infected tobacco leaves II: Timecourse of levels of intermediates and in vivo conversion rates. *Plant Physiol*, 69, 240-245.

Delaney TP., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weymann K., Negrotto D., Gaffney T., Gut-Rella M., Kessmann H., Ward E., Ryals J., 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266, 1247-1249.

Delledonne M., Xia Y., Dixon R. A. and Lamb C., 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394, 585-588.

Delledonne M., Zeier J., Marocco A. and Lamb C., 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98, 13454-13459.

De Moreas CM., Lewis WJ., Paré PW., Alborn HT., Tumlinson JH., 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 393, 570-573.

De Vos M., Van Oosten VR., Van Poecke RM., 2005. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol Plant Microbe Interact*, 18, 923-937.

Doares SH., Narvaez-Vasquez J., Conconi A., Ryan CA., 1995. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol*, 108, 1741-1746

Doherty HM., Selvendram RR., Bowles DJ., 1988. The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acid. *Physiol Mol Plant Pathol*, 33, 377-384.

Dorey S., Baillieul F., Saindrenan P., Fritig B. and Kauffmann S., 1998. Tobacco class I and II catalases are differentially expressed during elicitor-induced hypersensitive cell death and localized acquired resistance. *Mol Plant Microbe Interaction*, 11, 1102-1109.

Dumas B., Freyssinet G. and Pallett KE., 1995. Tissue-Specific Expression of Germin-Like Oxalate Oxidase during Development and Fungal Infection of Barley Seedlings. *Plant Physiol*, 107, 1091-1096.

Durner J., Wendehenne D. and Klessig DF., 1998. Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10328-10333.

Ebel J., Scheel D., 1992. Genes involved in plant defence. *Plant gene research*, 183-205

Ecker JR., 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, 268, 667-675.

Eichenseer H., Mathews MC., Bi JL., Murphy JB., Felton GW., 1999. Salivary glucose oxidase: multifunctional roles for *Helicoverpa zea*? *Arch Insect Biochem Physiol*, 42, 99-99.

Enyedi AJ., Eckardt NA., 1992. Activity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase from potato cultivars with differential response to O₃ stress. *New Phytologist*, 122, 493-500.

Epple P., Apel K. and Bohlmann H., 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol*, 109, 813-820.

Felix G., Grosskopf DG., Regenass M., Boller T., 1991. Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 8831-8834.

- Felix G., Regenass M., Spanu P., Boller T., 1994. The protein phosphatase inhibitor calyculin A mimics elicitor action in plant cells and induces rapid hyperphosphorylation of specific proteins as revealed by pulse labeling with [33P]phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 952-956.
- Flor HH., 1971. Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 9, 275-296.
- Freytag S., Arabatzis N., Hahlbrock K. and Schmelzer E., 1994. Reversible cytoplasmic rearrangements precede wall apposition, hypersensitive cell death and defense-related gene activation in potato/*Phytophthora infestans* interactions. *Planta*, 194, 123-135.
- Fritig B., Heitz T. and Legrand M., 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr Opin Immunol*, 10, 16-22.
- Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J., 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261, 754-756.
- Garcia-Olmedo F., Salcedo G., Sanchez-Monge RF., Gomez L., Royo J. and Carbonero P., 1987. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and β -amylases. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, 4, 275-334.
- Gianinazzi S., Martin C. and Valée JC., 1970. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270, 2383-2386.
- Giordanengo P. and Febvay G., 2007. Comment les pucerons manipulent les plantes. *Biofutur*, 279: 35-38.
- Glazebrook J., Chen W., Estes B., Chang HS., Nawrath C., Métraux JP., Zhu T. and Katagiri F., 2003. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J*, 34, 217-228
- Glazebrook J., 2005. Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 43, 205-227.
- Gomez-Gomez L. and Boller T., 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.*, 7, 251-256.
- Goodman RN., 1994. The hypersensitive reaction in tobacco : A reflection of changes in host cell permeability. *Phytopathology*, 58, 872-875.
- Granado J., Felix G., Boller T., 1995. Perception of fungal sterol in plants. Subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalization in tomato cells. *Plant Physiology*, 107, 485-490.
- Grangemard I., 1997. Surfactine et lichenysine, deux lipéptides biosurfactants de *Bacillus*: obtention d'isoformes, structures par spectrométrie de masse et de RMN et relations activité-structure Lyon. Université de Lyon, 186p.

Grant JJ., Yun BW. and Loake GJ., 2000. Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *Plant J*, 24, 569-582.

Grant M. and Lamb C., 2006. Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 9, 414-420

Halitschke R., Schittko U., Pohnert G., Boland W. and Baldwin IT., 2001. Molecular Interactions between the Specialist Herbivore *Manduca sexta* and Its Natural Host *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiol*, 125, 711-717.

Harborne JB., 1988. *Introduction to ecological biochemistry*. London, UK: Academic Press.

Harmel N., Almohamad R., Fauconnier M.L., Verheggen F., Marlier M., Haubruge E., 2007. Role of terpenes from aphid infested potato as indirect defence on *Episyrphus balteatus* behaviour. *Insect Sci*, 14, 57-66.

Harmel N., Letocart E., Cherqui A., Giordanengo P., Mazzucchelli G., Guillonneau F., De Pauw E., Haubruge E. and Francis F., 2008. Identification of aphid salivary proteins: a proteomic investigation of *Myzus persicae*. *Insect Mol. Biol.* 17, 165-174

Hatanaka A., Kajiwara T. and Sekiya J., 1987. Biosynthesis pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. *Chem. Phys. Lipids*, 44, 341-361.

Heitz T. and Segond S., 1994. Molecular characterization of a novel tobacco PR protein: a new plant chitinase/lysozyme. *Molecular and General Genetics*, 245, 246-254.

Hermesmeier D., Schittko U., Baldwin IT., 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth and defence-related plant mRNAs. *Plant Physiol*, 125, 683-683.

Hildebrand DF., Brown GC., Jackson DM. and Hamilton-Kemp T.R., 1993. Effects of some leaf-emitted volatile compounds on aphid population increase. *J. Chem. Ecol.*, 19, 1875-1887.

Hodgkins M., Mead D., Ballance DJ., Goodey A., Sudbery P., 1993. Expression of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* in *Hansenula polymorpha* and its use as a reporter gene to isolate regulatory mutations. *Yeast*, 9(6), 625-635.

Hogervorst P., Wäckers F., 2007. Effects of honeydew sugar composition on the longevity of *Aphidius ervi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 122, 223-232.

Hopkins WG., Ed. DeBoek, 2003. *Physiologie végétale.*, Paris, 514 p.

Howe GA., Lightner J., Browse J., Ryan CA., 1996. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell*, 8, 2067-2077.

Huang WE., Linfeng, H., 2006. Quantitative in situ assay of salicylic acid in tobacco leaves using a genetically modified biosensor strain of *Acinetobacter* sp. ADP1. . *Plant Journal* , 46(6), 1073-1083.

Hunt MD. and Ryals JA., 1996. Systemic acquired resistance signal transduction. *Critical Review in Plant Science*, 15, 583-606.

6.1

Jabs T., Tschöpe M., 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂. from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 94, 4800-4805.

Jang, EK., Kwang-Hyun M., 2009. Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in the Signaling for Polyamine Biosynthesis in Tobacco. *Plant and Cell Physiology*, 50(3), 658-664.

Jourdan E., 2008. Dialogue moléculaire entre les rhizobactéries et leur hôte végétal : deux nouveaux éliciteurs impliqués dans l'induction de résistance aux pathogènes. Thèse de doctorat, Université de Liège. 194p.

Kaloshian I. and Walling LL., 2005. Hemipterans as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* , 43, 491-521.

Kamoun S., Young M., Glascock CB. and Tyler BM., 1993. Extracellular protein elicitors from *Phytophthora* - Host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. *Mol Plant Microbe Interact*, 6, 15-25.

Kasparovsky T., Milat ML., Humbert C., Blein JP., Havel L., Mikes V., 2003. Elicitation of tobacco cells with ergosterol activates a signal pathway including mobilization of internal calcium. *Plant Physiology and Biochemistry* , 41, 495-501

Kauffmann S., Legrand M., Geoffroy P., Fritig B., 1987. Biological function of "pathogenesis-related" proteins: four PR proteins of tobacco have β -1,3-glucanase activity. *EMBO J.*, 6, 3209-3212.

Kauffmann S., Dorey S. et Fritig B., 2001. Les stratégies de défense. *Pour la Science*, 116-121

Klarzinsky O., et Fritig B., 2001. Stimulation des défenses naturelles des plantes. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*, 324, 953-963.

Knoester M., van Loon L. C., van den Heuvel J., Hennig J., Bol JF. and Linthorst HJM., 1998. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil- borne fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 1933-7.

Knogge W., 1996. Molecular basis of specificity in host/fungus interactions. *Eur. J. Plant Pathol.*, 102, 807-816.

Lait CG., Alborn HT., Teal PE and Tumlinson J., 2003. Rapid biosynthesis of *N*-linolenoyl-L-glutamine, an elicitor of plant volatiles, by membrane-associated enzyme(s) in *Manduca sexta*. . *P Natl Acad Sci USA*, 100 (12), 7027-7032

- Legrand M., Kauffmann S., Geoffroy P., Fritig B., 1987. Biological function of pathogenesis related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6750-6754.
- Leitner M., W. Boland, et al., 2005. Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 10(1111), 1469-8137.
- Lepoivre P., 2003. *Phytopathologie*. Ed. De Boeck, Paris, 427p
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R. and Lamb C., 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79, 583-593.
- Little D., Gouhier-Darimont C., Bruessow F., Reymond P., 2007. Oviposition by pierid butterflies triggers defense responses in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 143, 784-800
- Liu F., Liwang C., Cox Foster D., Felton GW., 2004. Characterization of a salivary lysozyme in larval *Helicoverpa zea*. *Journal of chemical ecology*, 30(12), 2439-2457
- Loake G., Grant M., 2007. Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol*, 10, 466-472
- Low PS. and Merida JR., 1996. The oxidative burst in plant defence: function and signal transduction. *Physiol Plant*, 96, 533-542
- Ma R., Reese J., Black WC., Bramel-Cox P., 1990. Detection of pectinesterase and polygalacturonase from salivary secretions of living greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Journal Insect Physiology*, 36, 507-512.
- Maffei M., Mithofer A., et al., 2007. Insects feeding on plants: Rapid signals and response preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, 68, 2946-2959.
- Malamy J., Carr JP., Klessig DF., and Raskin I., 1990. Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to tobacco mosaic virus. *Science*, 250, 1002-1006.
- Mathieu Y., Kurkdjian A., Xia H., Guern J., Koller A., Spiro M. D., Oneill M., Albersheim P. and Darvill A., 1991. Membrane Responses Induced by Oligogalacturonides in Suspension-Cultured Tobacco Cells. *Plant J*, 1, 333-343
- Mathieu Y., Lapous D., Thomine S., Lauriere C. and Guern J., 1996. Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta*, 199, 416-424.
- Mattiacci L., Dicke M., Posthumus MA., 1995. β -glucosidase: An elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts hostsearching parasitic wasps. *P Natl Acad Sci USA*, 92, 2036.
- Mehdy M., 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*, 105, 467-472.

- Mikes V., Milat ML., Ponchet M., Panabieres F., Ricci P. and Blein JP., 1998. Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 133-139.
- Miles PW., 1985. Dynamic aspects of the chemical relation between the rose aphid and rose buds. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 37, 129-135.
- Miles PW., Oertli JJ., 1993. The significance of antioxidants in aphid–plant interaction: the redox hypothesis. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 67, 273-285.
- Miller KJ., Hadley JA. and Gustine DL., 1994. Cyclic [beta]-1,6-1,3-Glucans of Bradyrhizobium japonicum USDA 110 Elicit Isoflavonoid Production in the Soybean (Glycine max) Host. *Plant Physiol*, 104, 917-923.
- Mirouze M., Sels J., Richard O., Czernic P., Loubet S., Jacquier A., Francois, Lebrun M., Berthomieu P., and Marques L., 2006. A putative novel role for plant defensins: A defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *Plant J*, 47, 329-34
- Mittler R., Vanderauwera S., et al., 2004. The reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science*, 9, 490-498
- Moran PJ., Thompson GA., 2001. Molecular responses to aphid feeding in Arabidopsis in relation to plant defense pathways. *Plant Physiol*, 125, 1074–1085
- Mur LA., Kenton P. et al., 2006. The outcomes of concentration specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol*, 140, 249-262.
- Musser RO., Hum-Musser SM., Eichenseer H., et al., 2002. Caterpillar saliva beats plant defences: A new weapon emerges in the coevolutionary arms race between plants and herbivores. *Nature*, 416, 599-0.
- Musser RO., Farmer E., Peiffer M., Williams SA., Felton GW., 2006. Ablation of caterpillar labial salivary glands: technique for determining the role of saliva in insect-plant interactions. *J Chem Ecol*, 32, 981-2.
- Niki T., Mitsuhashi I., Seo S., Ohtsubo N., Ohashi Y., 1998. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol*, 39, 500-507.
- Nurnberger T., Colling C., Hahlbrock K., Jabs T., Renelt A., Sacks W. R. and Scheel D., 1994. Perception and transduction of an elicitor signal in cultured parsley cells. *Biochem Soc Symp*, 60, 173-182.
- Nurnberger T., Wirtz W., Nennstiel D., Hahlbrock K., Jabs T., Zimmermann S. and Scheel D., 1997. Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense. *J Recept Signal Transduct Res*, 17, 127-136.

- Nurnberger T. and Scheel D., 2001. Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci*, 6, 372-379.
- Nurnberger T., Brunner F., et al., 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198, 249-266.
- 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.
- Paré PW., Alborn HT., Tumlinson JH., 1995. Concerted biosynthesis of an insect elicitor of plant volatiles. *P Natl Acad Sci USA*, 13971-13975.
- Parent C., Capelli N., et al., 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *Comptes Rendus Biologies*, 331(4), 255-261
- Park SW., Kaimoyo E., Kumar D., 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318, 113-116.
- Pautot V., Rabaglia C. et Pernollet JC., 1999. La résistance des plantes aux agents pathogènes. *Phytoma*, 521, 10-15,
- Pearce G., Strydom D., Johnson S., and Ryan CA., 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible inhibitor proteins. *Science*, 253, 895-898
- Pieterse CMJ., Dicke M., 2007. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Sci*, 12, 564-569
- Ponchet M., Panabieres F., Milat ML., Mikes V., Montillet JL., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y. and Blein JP., 1999. Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell Mol Life Sci*, 56, 1020-1047.
- Pontier D., Balague C. and Roby D., 1998. The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *C R Acad Sci III*, 321, 721-734
- Quaglia F., Rossi E., Petacchi R. and Taylor CE., 1993. Observations on an infestation by green peach aphids (Homoptera: Aphididae) on greenhouse tomatoes in Italy. *J Econ Entomol*, 86, 1019-1025
- Rance I., Fournier J. et al., 1998. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *P Natl Acad Sci USA*, 95, 6554-6559.
- Reymond P., Weber H., Damond M., Farmer EE., 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12, 707-0.
- Ricci P., Bonnet P., Huet JC., Sallantin M., Beauvais-Cante F., Bruneteau M., Billard V., Michel G. and Pernollet JC., 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European Journal of Biochemistry*, 183, 555-563.

- Ricci P., 1997. Induction of the hypersensitive response and systemic acquired resistance by fungal proteins: the case of elicitors. *Plant-Microbe Interactions*, 3, 53-75
- Rickauer M., Bottin A. et al., 1992. Regulation of proteinase inhibitor production in tobacco cells by fungal elicitors, hormonal factors and methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 30, 579-584.
- Ross AF., 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, 14, 340-358.
- Rustérucci C., Stallaert V., Pugin A., Ricci P. and Blein JP., 1996. Relationship between AOS, lipid peroxidation, necrosis and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiology*, 111, 885-891.
- Sauge MH., Mus F., Lacroze JP. et al., 2006. Genotypic variation in induced resistance and induced susceptibility in the peach-*Myzus persicae* aphid system. *Oikos*, 113, 305-313.
- Scheel D., (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opin Plant Biol*, 1, 305-310.
- Schuster SC. and Khan S., 1994. The bacterial flagellar motor. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 23, 509-39.
- Schwacke R. and Hager A., 1992. Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca²⁺ and protein-kinase activity. *Planta*, 187, 136-141.
- Shulaev V., Léon J., Raskin I., 1995. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell*, 7, 1691-1701
- Simon-Plas F., Elmayan T. and Blein JP., 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J*, 31, 137-147.
- Simpson S., Ashford D., Harvey D. and Bowles D., 1998. Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *PG*, 579-83.
- Spoel SH., Johnson JS., Dong X., 2007. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 18842-18847
- Tavernier E., Stallaert V. et al., 1995. Changes in lipid composition in tobacco cells treated with cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Science*, 104(2),117-125.
- Terras FRG., Schoofs HME., De Bolle MFC., Van Leuven F., Rees SB., Vanderleyden J., Cammue BPA., Broekaert WF., 1992. Analysis of two novel classes of antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem*, 267, 15301-15309
- Terras F. et al., 1995. Small cysteine-rich anti-fungal proteins from radish (*Xaphanus sativus* L.). Their role in host defense. *Plant Cell*, 7, 573-588.

- Thomma BPHJ., Nelissen I., Eggermont K., Broekaert WF., 1999. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicola*. *Plant J*, 19, 163-171
- Torres MA., Dangl JL. and Jones JD., 2002. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defence response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 517-22.
- Turlings TCJ., Loughrin JH., McCall PJR., Lewis WJ. and Tumlinson JH., 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 4169-4174.
- Turlings T., Alborn HT., Loughrin JH. , Tumlinson JH., 2000. Volicitin, an elicitor of maize volatiles in oral secretion of *Spodoptera exigua*: isolation and bioactivity. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 1.
- Urbanska A., Tjallingii WF., Dixon AFG., Leszczynski B., 1998. Phenol oxidizing enzymes in the grain aphid's saliva. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 686, 197-203.
- Van Loon LC., Van Kammen A., 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN" II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40, 199-211.
- Van Loon LC., Pierpoint W.S., Boller T., Conejero V., 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Reporter*, 12, 245-264.
- Van Loon L.C. and Van Strien E.A., 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 55, 85-97.
- Viard MP., Martin F., Pugin A., Ricci P. and Blein JP., 1994. Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology*, 104, 1245-1249.
- Volkl W., Woodring J., Fisher M., Lorenz MW. and KH. Hoffmann, 1999. Ant-aphid mutualisms: the impact of honeydew production and honeydew sugar composition on ant preferences. *Oecologia* 118: 483-49
- Wäckers FL., 2000. Do oligosaccharides reduce the suitability of honeydew for predators and parasitoids? A further facet to the function of insect-synthesized honeydew sugars. *Oikos*, 90, 197-201.
- Way MJ., 1963. Mutualism between ants and honeydew-producing Homoptera. *Annual Review of Entomology*, 8, 307-344.
- Wei Y., Zhang Z., Andersen CH., Schmelzer E., Gregersen PL., Collinge DB., Smedegaard-Petersen V., Thordal-Christensen H., 1998. An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol*, 36,101-112

- Wendehenne D., Lamotte O., Frachisse J. M., Barbier-Brygoo H. and Pugin A., 2002. Nitrate efflux is an essential component of the cryptogin signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell*, 14, 1937-51.
- Wijaya R., Neumann GM., Condron R., Hughes AB. and Polya GM., 2000. Defence proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Science*, 159, 243-255.
- Woodring J., 2004. Honeydew amino acids in relation to sugars and their role in the establishment of ant-attendance hierarchy in eight species of aphids feeding on tansy (*Tanacetum vulgare*). *Physiological Entomology*, 29, 311-319.
- Wojtaszek P., 1997. Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochem J*, 322, 681-692 .
- Xing T., Ouellet T. and Miki BL., 2002. Towards genomic and proteomic studies of protein phosphorylation in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci*, 7, 224-30.
- Yao I., Akimoto S., 2001. Ant attendance changes the sugar composition of the honeydew of the drepanosiphid aphid *Tuberculatus quercicola*. *Oecologia*, 128, 36-43.
- Yu IC., Parker J. and Bent AF., 1998. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7819-7824.
- Zarate SI., Kempema LA., Walling LL., 2007. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defences and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiol*, 143, 866-875
- Zeringue HJ., 1992. Effects of C6–C10 alkenals and alkanals on eliciting a defence response in the developing cotton boll. *Phytochem*, 31, 2305–2308.
- Zhang S., Du H. and Klessig DF., 1998. Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell*, 10, 435-450.
- Zhao J., Davis L. et al., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23, 283-333
- Zhu-Salzman K., Salzman RA., Ahn JE., Koiwa H., 2004. Transcriptional regulation of sorghum defence determinants against a phloem-feeding aphid. *Plant Physiol*, 134, 420-421.
- Zhu-Salzman K., Bi JL., Liu TX., 2005. Molecular strategies of plant defence and insect counter-defence. *Insect Sci*, 12, 3-5.
- Zimmermann S., Frachisse JM., Thomine S., BarbierBrygoo H. and Guern J., 1998. Elicitor-induced chloride efflux and anion channels in tobacco cell suspensions. *Plant Physiol Biochem*, 36, 665-674.

