

Université
de Liège



*Centre Wallon de
Biologie Industrielle*

**Elicitation de la résistance systémique induite chez la
tomate et le concombre et activation de la voie de la
lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes**

Akram ADAM

**Thèse présentée en vue de l'obtention
du grade de Docteur en Sciences**

Janvier 2008

© Copyright. Aux termes de la loi belge du mars 1886, sur le droit d'auteur, seul l'auteur a le droit de reproduire cet ouvrage ou d'en autoriser la reproduction de quelque manière et sous quelque forme que se soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la loi.

ADAM Akram (2008). Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes, Thèse de Doctorat, Université de Liège, Belgique, 165p.

Résumé

Certaines bactéries de la rhizosphère (PGPR, rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes) exercent un effet bénéfique sur la croissance des plantes en stimulant des mécanismes de défense inductibles chez l'hôte, rendant celle-ci moins susceptible vis-à-vis d'une infection ultérieure par un agent pathogène. Ce phénomène appelé résistance systémique induite (ISR) a été mis en évidence chez plusieurs plantes pour lutter contre une gamme relativement large de pathogènes fongiques, bactériens ou viraux. Cependant, les bases moléculaires des mécanismes de défense proprement dits stimulés lors de l'ISR restent assez méconnues malgré les nombreux travaux réalisés cette dernière décennie. Dans ce contexte, des souches de PGPR (*Bacillus subtilis* et *Pseudomonas putida*) capables de protéger certaines plantes via l'induction de l'ISR sont étudiées depuis plusieurs années au laboratoire. Dans le cadre de cette thèse de doctorat, nous avons étudié l'effet protecteur de ces bactéries dans deux pathosystèmes différents, tomate/*Botrytis cinerea* et concombre/*Colletotrichum lagenarium*.

Nos résultats ont montré la capacité de *P. putida* BTP1 à induire l'ISR chez la tomate et le concombre sur base de la réduction des symptômes de maladie observée et sur base de la séparation spatiale des deux agents, bénéfique au niveau racinaire et pathogène au niveau foliaire. Cette résistance a été clairement associée avec la stimulation de la voie des oxylipines chez la tomate. L'induction de cette voie métabolique a d'abord été mise en évidence biochimiquement par une augmentation des activités lipoxygénase et lipide hydroperoxydase dans les feuilles des plantes traitées avec

Pseudomonas. De plus, au niveau moléculaire, les analyses par northern blot nous ont permis d'identifier un nouvel isoforme de gène *Lox* chez la tomate qui est exprimé différemment chez les plants traités par la bactérie. Ce gène dénommé *LoxF* montre une homologie de 82% avec un des cinq isoformes connus chez cette plante, *LoxC*. *LoxF* est essentiellement surexprimé dans les feuilles de tomates pré-inoculées avec BTP1 suite à l'infection par le pathogène. Il en est de même pour l'activité enzymatique correspondante de la lipoxigénase qui n'augmente significativement chez les plants traités par rapport aux témoins qu'après infection par *Botrytis*. Ces résultats sous-entendent un phénomène de « priming » ou « mise en alerte » étroitement associé avec l'induction de résistance systémique chez les plantes. La reconnaissance de la bactérie au niveau racinaire met en alerte la plante sans que des bouleversements majeurs au niveau métabolique ou génétique ne soient observés. L'hôte réagit alors plus fortement et plus rapidement pour mettre en œuvre ses mécanismes de défense une fois le pathogène perçu. Par biotest sur TLC et analyses HPLC, CPG et LC-MS, nous avons mis en évidence l'accumulation d'une molécule dans les feuilles de tomate prétraitées avec BTP1. Cette molécule semble être de nature apolaire mais non phénolique et ne correspond pas aux phytoalexines connues de la tomate. Des études complémentaires doivent être réalisées pour l'identifier chimiquement mais sa cinétique d'accumulation dans les tissus de la plante est étroitement associée à celle de la stimulation de la lipoxigénase. Elle pourrait donc dériver de cette voie métabolique.

Des réactions de défense similaires ont été observées suite au traitement avec *Bacillus subtilis* chez la tomate et ces essais ont permis de mettre en évidence le rôle des lipopeptides produits en tant qu'éliciteurs impliqués dans l'induction du phénomène de l'ISR par cette souche. Par contre, bien que les deux souches soient capables d'induire la résistance chez le concombre, aucune accumulation claire de phytoalexines ni de stimulation significative de la voie de la lipoxigénase n'ont pu y être associées chez cette plante. Globalement, nos résultats suggèrent que les voies métaboliques activées dans le cadre de l'ISR varient en fonction de l'espèce végétale même si le microorganisme inducteur est identique.

ADAM Akram (2008). Elicitation of induced systemic resistance in tomato and cucumber and activation of the lipoxygenase pathway by non-pathogenic rhizobacteria, *PhD. Thesis*, University of Liège, Belgium, 165p.

Abstract

Some plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are able to stimulate inducible defence mechanisms that render the host plant less susceptible to a subsequent pathogen attack. This phenomenon called induced systemic resistance (ISR) can occur in several plant species against a wide range of bacterial, viral and fungal pathogens. Despite extensive work carried out this last decade, many aspects of the molecular basis underlying this rhizobacteria-mediated ISR remain unclear. In this context, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* strains able to protect plants via induction of ISR have been studied for several years in our laboratory. In this thesis, we first aimed at evaluating the protective effect of these strains in different pathosystems and second at identifying the associated defence mechanisms.

Our results showed the capacity of *P. putida* BTP1 to induce ISR in the tomato/*Botrytis cinerea* and cucumber/*Colletotrichum lagenarium* pathosystems on the basis of reduction of disease symptoms and on the basis of the spatial separation of the two agents, beneficial at the root level and pathogenic at the leaf level. This resistance was clearly associated the stimulation of the oxylipin pathway in tomato. The induction of this metabolic pathway was evidenced biochemically by an increase in the lipoxygenase and lipid hydroperoxidase activities in the leaves of plants treated with *Pseudomonas* compared to controls. Moreover, at the molecular level, northern blot analyses enabled us to identify a new isoforme of *Lox* gene in tomato which is expressed differentially in plants treated with the bacterium. This gene called *LoxF* shows a homology of 82% with one of the five isoformes known in this plant, *LoxC*. *LoxF* is

mainly expressed in tomato leaves pre-inoculated with BTP1 after infection by pathogen. The same applies for the lipoxygenase enzyme activity which increases significantly in treated plants only after infection by *Botrytis*. These results imply a phenomenon of "priming" closely associated with the systemic resistance induction in plants. The recognition of the bacterium at the root level primes the plant but in most cases major changes at the metabolic or genetic level are not observed. The host then reacts more strongly and more quickly to express defence mechanisms once the pathogen is perceived. In addition, by combining the use of TLC-based biotests and analytical methods such as HPLC, CPG and LC-MS analyses, we highlighted the accumulation of a molecule in BTP1-pretreated tomato leaves. This molecule seems to be of a non-polar nature but not phenolic and does not correspond to any phytoalexin known in tomato. Complementary studies must be carried out to identify its structure but its kinetic of accumulation in the plant tissues is closely associated with the stimulation of the lipoxygenase enzyme. It could thus derive from this metabolic pathway.

Similar defence reactions were observed in tomato following treatment with *Bacillus subtilis* and through these tests, we also highlighted the role of some lipopeptides produced by this strain as elicitors responsible for the induction of the ISR phenomenon. On the other hand, although the two strains are able to induce resistance in cucumber, no clear accumulation of phytoalexins nor of significant stimulation of the lipoxygenase pathway could be associated with disease reduction in this plant. All together, our results suggest that the metabolic pathways activated during ISR vary in function of the plant and pathogen species even if the inducing micro-organism is identical.

Remerciement

Au terme de ce travail, je tiens à remercier le Professeur Philippe Thonart pour m' avoir accueilli au sein de son service et pour la permission d' y réaliser ma thèse de doctorat.

Je voudrais également remercier le Professeur Jacques Dommes pour m' avoir accueilli dans son service de « Biologie Moléculaire et de Biotechnologie Végétales ».

J' exprime ma plus profonde reconnaissance au Docteur Marc Ongena pour m' avoir épaulé tout au long de ce travail, pour m' avoir fait profiter de ses connaissances et pour son soutien précieux lors de la rédaction de cette thèse.

J' adresse mes sincères remerciements au Docteur Francéline Duby pour la disponibilité dont elle a fait preuve à mon égard et les conseils qu' elle m' a donné.

Ma gratitude va aux membres du CWBI et plus particulièrement à Mr. E. Jourdan et Mme. C. Ek pour leur disponibilité et accueil sympathique et les conseils qu' ils m' ont donné.

Je voudrais remercier mon père, ma tante, ma belle-mère, mes frères, mes sœurs et mon beau-frère pour tout le soutien, la confiance et leurs mots d' encouragement qu' ils m' ont accordés. Ainsi merci aux autres membres de ma famille pour toutes les agréables tranches de vie.

Que je souhaiterais te remercier et embrasser tes mains. Malgré de ton absence, tu es toujours dans mon cœur, ma très chère maman.

Mais surtout à toi, Mayssaa, ma femme, ma confidente, ma partenaire, ma maman parfois, mon infirmière. Merci pour tout cela, ton soutien, ton amour, ta patience dans un pays étranger et tes encouragements.

Il me tient à cœur de remercier mes amis en Syrie qui ont toujours prié pour moi. Merci encore à tous ceux qui, de près ou de loin, m' ont soutenu.

Enfin, je voudrais adresser mes sincères remerciements et ma plus grande reconnaissance à la Commission de l'Énergie Atomique Syrienne pour m' avoir octroyé une bourse au cours toutes les années d' étude du doctorat.

Je dédie ce travail à mon très cher pays « La Syrie ».

Tables des Matières

Chapitre I Introduction.....	1
I. Biopesticides microbiens.....	1
I.1. Avantages des biopesticides	2
I.2. Le marché des biopesticides	4
I.3. Désavantages	6
II. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) en tant qu'agents de lutte biologique.....	6
III. Mode d'action des PGPR en lutte biologique	7
III.1. Interactions directes PGPR/Pathogène	7
III.1.1. Compétition pour l'espace et les nutriments	7
III.1.2. Compétition pour le fer et production de sidérophores	8
III.1.3. Antibiose et parasitisme	9
III.2. Interactions PGPR/plante.....	10
III.2.1. Promotion de la croissance de l'hôte.....	10
III.2.2. Renforcement de la capacité défensive de l'hôte	10
IV. Interactions plante/pathogène.....	11
V. Les événements précoces dans la HR	12
VI. Les deux types de résistances systémiques.....	14
VI.1. La résistance systémique acquise ou SAR (Systemic Acquired Resistance)	14
VI.2. La résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)	15
VI.2.1. Non spécificité vis-à-vis de l'hôte et du pathogène.....	16
VI.2.2. Intérêt économique dans le contrôle biologique.....	18
VII. Les éliciteurs de la SAR et de l'ISR.....	22
VII.1. Les éliciteurs de la SAR	22
VII.1.1. Composés inorganiques.....	22

VII.1.2.	Composés synthétiques	22
VII.1.3.	Eliciteurs microbiens.....	22
VII.2.	Les déterminants bactériens de l'ISR	23
VII.2.1.	Les composants de la surface des cellules.....	23
VII.2.2.	Les sidérophores.....	24
VII.2.3.	L'acide salicylique	24
VII.2.4.	Les antibiotiques	25

VIII. Signalisation SAR/ISR25

VIII.1.	L'accumulation de l'acide salicylique	25
VIII.2.	Interaction entre le SA et le régulateur NPR1	26
VIII.3.	La réponse liée à l'acide jasmonique et à l'éthylène	27
VIII.3.1.	Dans le cas de la SAR	27
VIII.3.2.	Dans le cas de l'ISR	28
VIII.3.3.	En réponse à la blessure	30
VIII.4.	Le signal lipidique systémique	30
VIII.5.	Interactions entre les signaux.....	32

IX. Mécanismes de défense induits dans la SAR et l'ISR.....33

IX.1.	Accumulation d'enzymes de défenses (PRs).....	34
IX.2.	Renforcement de la paroi cellulaire.....	36
IX.3.	Accumulation de phytoalexines.....	37
IX.4.	Stimulation de la voie de la lipoxygénase (LOX).....	39
IX.5.	Le « priming » ou « mise en alerte » chez les plantes	42

X. Les lipopeptides de *Bacillus subtilis*43

Chapitre II But du travail..... 45

Chapitre III Matériel et Méthodes 47

I. Matériel47

I.1.	Matériel végétal	47
I.2.	Souches bactériennes	47
I.2.1.	<i>Pseudomonas putida</i> BTP1	47
I.2.2.	<i>Bacillus subtilis</i> 168 et ses dérivés.....	48
I.2.3.	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 et BBG100.....	48
I.2.4.	<i>Escherichia coli</i>	49

I.2.5.	Vecteur plasmidien.....	49
I.3.	Champignons pathogènes.....	50
I.3.1.	<i>Botrytis cinerea</i>	50
I.3.2.	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	50
I.3.3.	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	50
I.3.4.	<i>Pythium aphanidermatum</i>	50
I.4.	Milieux de cultures.....	51
I.4.1.	Milieux liquides.....	51
I.4.2.	Milieux solides.....	51
I.5.	Solutions.....	52
I.5.1.	Solutions nutritives.....	52
I.5.1.1.	Pour la tomate.....	52
I.5.1.2.	Pour le concombre.....	52
I.5.2.	Solution d'infection.....	53
I.5.2.1.	Solution de récupération des spores (SRS).....	53
I.5.2.2.	Solution pour l'infection (SUC).....	53

II. Méthodes54

II.1.	Expérience de fonte des semis sur la tomate.....	54
II.2.	Expérience d'induction de résistance <i>in vivo</i> chez les plants de tomate et de concombre.....	55
II.2.1.	Culture en terreau des tomates et des concombres.....	55
II.2.1.1.	Traitement des graines et semis.....	55
II.2.1.2.	Arrosage et rappel bactérien.....	56
II.2.2.	Infection des plants.....	56
II.2.2.1.	Préparation de la suspension de spores.....	56
II.2.2.2.	Infection du concombre.....	57
II.2.2.3.	Infection de la tomate.....	57
II.2.3.	Evaluation de la maladie.....	57
II.2.3.1.	Récupération du matériel végétal.....	57
II.3.	Recherche de phytoalexines.....	58
II.3.1.	Extraction au méthanol.....	58
II.3.2.	Extraction liquide-liquide.....	58
II.3.3.	Analyse HPLC des extraits méthanoliques.....	59
II.3.4.	Biotests de toxicité sur plaque TLC.....	59
II.3.5.	Analyse de spectrométrie de masse.....	60
II.4.	Dosage des volatiles dans les feuilles.....	61
II.5.	Dosage de l'activité lipoxigénase (LOX).....	62
II.5.1.	Extraction de l'enzyme.....	62
II.5.2.	Dosage spectrophotométrique.....	62
II.6.	Dosage de l'activité lipide hydroperoxydase.....	63
II.6.1.	Extraction de l'enzyme.....	63
II.6.2.	Dosage spectrophotométrique.....	63
II.6.2.1.	Synthèse des hydroperoxydes.....	63
II.6.2.2.	Principe et méthode de dosage.....	64

II.7.	Extraction des acides nucléiques	65
II.7.1.	Extraction des DNAs de plante (Méthode CTAB).....	65
II.7.2.	Extraction des RNAs de tomate (Méthode Phénol/SDS).....	66
II.7.2.1.	Homogénéisation des tissus et élimination des protéines	66
II.7.2.2.	Précipitation sélective des RNAs	66
II.7.2.3.	Vérification de la qualité des RNAs.....	67
II.7.3.	Extraction des DNA plasmidiens (Minipréparation).....	67
II.7.4.	Restriction de DNA.....	68
II.7.5.	Hybridation sur Northern Blot	68
II.7.5.1.	Marquage radioactif d'une sonde DNA	69
II.7.5.2.	Transfert de RNA par Northern blotting	69
II.7.5.3.	Hybridation radioactive sur la membrane de nylon	70
II.8.	Mesure de la concentration en acide nucléique	71
II.9.	Transcription inverse	71
II.10.	Amorces utilisées.....	72
II.11.	Réaction de polymérisation en chaîne ou PCR.....	72
II.12.	Electrophorèse d'acides nucléiques sur gel d'agarose.....	73
II.12.1.	Electrophorèse sur gel d'agarose non dénaturant.....	73
II.12.2.	Electrophorèse sur gel d'agarose dénaturant.....	74
II.13.	Purification d'un fragment de DNA à partir du gel d'agarose.....	74
II.14.	Ligation.....	75
II.15.	Transformation bactérienne.....	75
II.15.1.	Préparation des cellules électrocompétentes	75
II.15.2.	Electroporation des cellules compétentes.....	75

Chapitre IV Résultats..... 77

I. Rôle des lipopeptides dans l'ISR..... 77

I.1.	Evaluation de l'induction de la résistance chez la tomate	77
I.2.	Activité de biocontrôle par surproduction de mycosubtiline.....	81
I.3.	Etude des mécanismes de défense induits chez la tomate traitée avec	
<i>B. subtilis</i> BC25		83
I.3.1.	Etude de la stimulation de la voie de la lipoxigénase (LOX).....	83
I.3.2.	Expression différentielle des gènes <i>AOS</i> , <i>HPL</i> et <i>LOX</i>	85
I.3.2.1.	Clonage des cDNA.....	86
I.3.2.2.	Hybridation sur Northern Blot	95
I.3.2.3.	Hybridation des sondes <i>LoxA</i> et <i>LoxB</i>	95
I.3.2.4.	Hybridation de la sonde <i>LoxC</i>	96
I.3.2.5.	Hybridation de la sonde <i>LoxD</i>	97
I.3.2.6.	Hybridation de la sonde <i>LoxF</i>	98

II. Etude de l'induction de résistance systémique chez les plantes par *Pseudomonas putida* BTP199

II.1.	L'ISR chez la tomate	100
II.1.1.	Evaluation de la protection.....	100
II.1.2.	Etude des mécanismes de la résistance induite chez la tomate par <i>P. putida</i> BTP1.....	102
II.1.2.1.	Accumulation de composés fongitoxiques.....	102
II.1.2.2.	Etude de la stimulation de la voie de la LOX.....	110
II.1.2.3.	Dosage des composés volatils dans les feuilles.....	112
II.1.2.4.	Expression différentielle des gènes <i>AOS</i> , <i>HPL</i> et <i>LOX</i>	114
II.2.	L'ISR chez le concombre	120
II.2.1.	Evaluation de la protection.....	120
II.2.2.	Etude des mécanismes de la résistance induite chez le concombre par <i>P. putida</i> BTP1	122
II.2.2.1.	Accumulation de composés fongitoxiques.....	122
II.2.2.2.	Etude de la stimulation de la voie de la LOX.....	123

Chapitre V Discussion 127

I. Effet protecteur des PGPR.....127

II. Caractérisation des mécanismes de défense induits chez les plants129

II.1.	Accumulation de composés fongitoxiques	129
II.2.	Stimulation de la voie de la lipoxygénase	131
II.3.	Mise en alerte des plantes (priming).....	135

III. Conclusion.....136

Chapitre VI Références..... 139

Listes des publications et activités scientifiques 163

Liste des abréviations utilisées

AOS : Allène Oxyde Synthase
BABA : Acide β -aminobutyrique
BE : Bromure d'Ethidium
BTH : Benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester
cDNA : DNA complémentaire
CPG : Chromatographie Phase Gazeuse
DMPC : Diméthylpyrocarbonate
DNA : Acide désoxyribonucléique
dNTP : Désoxynucléotide triphosphate
DO : Densité Optique
ERF1 : Ethylene Response Factor1
ET : Ethylène
GC : Chromatographie Gazeuse
h : Heure
HPL : Hydroperoxyde Lyase
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
HPOTE : Acide hydroxyoctadécatriénoïque
HR : Réponse hypersensible
INA : Acide dichloroisonicotinique
ISR: Induced Systemic Resistance
JA : Acide jasmonique
KB : Kilo base
LA : Acide linoléique
LB : milieu de Luria-Bertani
LHP : lipide hydroperoxydase
LNA : Acide linoléinique
LOX : Lipoxygénase
LPS : Lipopolysaccharide
mg : milligramme

ml : Millilitre
MOPS : Acide morpholinopropanesulfonique
NABD : N,N-dimethyl-N-tetradecyl-N-benzylammonium
NPR1: Non-expressor of Pathogenesis-Related Genes 1
PAL : Phenylalanine Ammonia Lyase
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
Pb : Paire de base
PCD : Mort cellulaire programmée
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria
p/v : Rapport poids/volume
PR : Pathogenesis Related
³²P : Isotope 32 du phosphore
RNA : Acide ribonucléique
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
rpm : tours par minute
RT-PCR : Reverse Transcriptase-PCR
SA : Acide salicylique
SABP2 : SA-Binding Protein2
SAR : Systemic Acquired Resistance
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SNI1 : Suppressor of NPR1, Inducible
SRS : Solution de récupération des spores
SUC : Solution pour l'infection
TLC : Thin Layer Chromatography (Chromatographie sur Couche Mince)
U.V. : Rayons ultraviolets
µg : microgramme
µl : microlitre
v : Volume

Chapitre 1
INTRODUCTION

Chapitre I

Introduction

I. Biopesticides microbiens

Animaux ravageurs, plantes parasites, micro-organismes pathogènes (bactéries, champignons, mycoplasmes, virus), insectes et nématodes sont responsables, chaque année, de la perte de 20 à 40% du rendement des cultures avant récolte (selon l'Organisation Mondiale de la Santé), et entre 1 et 20% après récolte aux USA (Wojcieh et Lise 2002). Actuellement, ce sont essentiellement des pesticides de synthèse qui sont utilisés pour lutter contre ces agents ravageurs. Ces produits chimiques sont considérés comme l'arme la plus efficace pour faire face à ces problèmes, mais ces substances ont des conséquences néfastes (Kouassi 2001; Thakore 2006) sur (1) l'environnement comme l'accumulation de résidus et la pollution des sols, (2) l'apparition et la généralisation des mécanismes de résistance chez les pathogènes, (3) le déséquilibre écologique, dû au fait que beaucoup de ces composés de synthèse ont un large spectre d'action, détruisant non seulement les agents nuisibles, mais également les autres populations de l'écosystème.

Au regard de ces inconvénients, il est important de trouver des solutions alternatives qui permettront de continuer à lutter contre les phytopathogènes tout en diminuant l'emploi de produits chimiques. Celles-ci peuvent faire appel à la rationalisation des pratiques agricoles (fumigation-stérilisation en horticulture, désinfection des graines, rotation des cultures, contrôle du vecteur de la maladie...), à l'utilisation de variétés végétales résistantes (croisements sélectifs, insertion de gènes...) ou au développement des biopesticides.

I.1. Avantages des biopesticides

Ces biopesticides ou agents de lutte biologique, peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés. Ils peuvent donc être constitués d'organismes (plantes, insectes, nématodes) ou de micro-organismes (bactéries, levures, champignons, virus) exerçant une activité protectrice sur les plantes vis-à-vis d'agents phytopathogènes, mais aussi de substances d'origine naturelle telles que des extraits végétaux, phéromones, etc...(Thakore 2006).

Tout comme les autres agents de lutte biologique, les biopesticides microbiens sont écologiquement beaucoup plus compatibles que les produits chimiques et ont une spécificité accrue vis-à-vis des pathogènes contre lesquels ils sont dirigés. Ils sont par conséquent moins dommageables pour les organismes non ciblés de la microflore endogène qui exerce une action bénéfique sur les plantes. De plus, les biopesticides sont souvent efficaces en faibles quantités et leurs activités protectrices peuvent relever de mécanismes multiples et déclenchent donc rarement des phénomènes de résistance chez le pathogène à cause d'une faible pression de sélection. En outre, ils peuvent compléter les pesticides conventionnels une fois utilisés dans les programmes intégrés de la gestion des parasites (IPM) (Fravel 2005; Thakore 2006). Par exemple, l'intégration du contrôle biologique avec des fongicides, les pratiques culturales, et d'autres mesures peuvent contribuer au contrôle de la rouille sur la tomate (Lourenco Junior *et al.* 2006). Les biopesticides peuvent donc être complémentaires au traitement chimique, mais peuvent aussi être utilisés dans des situations pour lesquelles aucune solution de contrôle utilisant des produits de synthèse n'est actuellement disponible. Ces agents microbiens sont utilisés à travers le monde dans les champs et dans les serres (Ji *et al.* 2006; Lee *et al.* 2006; Minuto *et al.* 2006; Saravanakumar *et al.* 2007), pour combattre un grand nombre de maladies causées par des pathogènes du sol, foliaires ou de post-récoltes (Tableau I.1). Ces produits ont été développés pour contrôler de multiples maladies sur diverses céréales, légumes, fruits et fleurs (Paulitz et Bélanger 2001; Fravel 2005).

Tableau I.1. Les micro-organismes inscrits en tant que biopesticides à l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (EPA) (Fravel 2005).

Agent de biocontrôle	Année d'enregistrement	organisme ou maladie ciblée	Cultures concernées
<i>Agrobacterium radiobacter</i> strain K84	1979	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Plantes ornementales, fruits, noix
<i>Agrobacterium radiobacter</i> Strain K1026	1999	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> and <i>A. rhizogenes</i>	Plantes ornementales, fruits, noix
<i>Ampelomyces quisqualis</i> isolate M-10	1994	Powdery mildew	Fruits, légumes et plantes ornementales
<i>Aspergillus flavus</i> strain AF36	2003	<i>Aspergillus flavus</i>	Coton
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 21,882	2004	<i>Aspergillus flavus</i>	Cacahuète
<i>Bacillus licheniformis</i> Strain SB3086	2003	Les pathogènes et rouilles foliaires	plantes ornementales et gazon ornemental
<i>Bacillus pumilus</i> Strain GB 34	2002	<i>Rhizoctonia, Fusarium</i>	Soja
<i>Basillus subtilis</i> GBO3	1992	<i>Rhizoctonia, Fusarium Aspergillus</i> et d'autres	Coton, arachides, soja, blé, orge, pois et haricots
<i>Basillus subtilis</i> MBI 600	1994	<i>Rhizoctonia, Fusarium, Alternaria</i> et <i>Aspergillus</i>	Coton, haricot, orge, blé, corn, pois, arachides et soja
<i>Bacillus subtilis</i> Strain QST 713	2000	Pathogènes, pourriture et rouilles foliaires	Cerises, courges, raisins, légumes foliaires, poivres, pommes de terre, tomates et noix
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>amylolique-faciens</i> strain FZB24	2000	<i>Rhizoctonia</i> et <i>Fusarium</i>	arbres d'ombre et des forêts, plantes ornementales et arbustes
<i>Candida oleophila</i> isolate I-182		Maladies après la récolte	Divers fruits, légumes, fleurs, plantes ornementales et d'autres
<i>Coniothyrium minitans</i> CON/M/91-08	2001	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> et <i>Sclerotinia minor</i>	Sol agricole
<i>Gliocadium catenulaum</i> strains JI446	1998	Pathogènes du sol	Légumes, herbes, épices, gazon, arbres et arbustes
<i>Gliocadium virens</i> GL-21	1990	Pathogènes du sol	Plantes ornementales, légumes, coton
Killed <i>Myrothecium verrucaria</i> : fermentation solids and solubles	1996	Nématodes parasite de la plante	Plantes alimentaires, plantes à fibres et plantes ornementales
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain 63-28	2001	<i>Pythium, Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum</i>	Légumes et plantes ornementales en serre

Agent de biocontrôle	Année d'enregistrement	organisme ou maladie ciblée	Cultures concernées
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> strain TX-1	1999	<i>Sclerotinia homeocarpa</i> , <i>Colletotrichum graminicola</i> , <i>Pythium aphanadermatum</i> , <i>Michrosochium nivale</i>	Gazon de cours de golf
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	1992	Frost damage, fire blight, bunch rot	Fruits, amande, pomme de terre et tomate
<i>Pseudomonas syringae</i> strain ESC-10	1995	Maladies après la récolte	Pommes, poire, citron, oranges ou pamplemousse
<i>Pseudomonas flocculosa</i> strain PF-A22 UL	2002	Powdery mildew	Roses et concombres en serre
<i>Streptomyces griseoviridis</i> strain K61	1993	Pathogènes du sol	plantes alimentaires, petits arbustes ornementaux
<i>Trichoderma harzianum</i> ATCC 20,476	1989	Tree wound pathogens	Blessures chez les plantes ornementales, et les arbres de forêt
<i>Trichoderma harzianum</i> strain T-22	1990	Pathogènes du sol	Le sol des serres, pépinières, gazon, jardins d'amateur
<i>Trichoderma harzianum</i> strain T-39	1996	<i>Botrytis cinerea</i>	La plupart des récoltes alimentaires

I.2. Le marché des biopesticides

Le marché des pesticides synthétiques avait diminué au cours des 5 dernières années grâce au développement des biopesticides et des récoltes génétiquement modifiées. Les biopesticides représentent 2.5% (672 millions \$ en 2005) des ventes de produits phytosanitaires (26 milliards \$) (Figure I.1), alors qu'il était seulement de 0.2% en 2000. En dépit de sa petite taille comparée aux pesticides synthétiques, le marché des biopesticides se développe donc et on prédit qu'il atteindra plus d'un milliard de dollars en 2010 (Thakore 2006). Actuellement, l'Amérique du nord et l'Europe consomment environ 40% et 20% respectivement de la production mondiale de biopesticides. On s'attend à ce que le marché des biopesticides aux USA monte de 205 millions à 300 millions U\$, et le marché européen d'environ 135 millions jusqu'à 270 millions \$ vers la

fin de la décennie. Parmi les biopesticides microbiens, les produits à base de bactéries représentent 74% du marché mondial (Figure I.2).

Plus de vingt-cinq produits microbiens (13 bactéries et 12 champignons) sont actuellement inscrits à la EPA (Fravel 2005) (Tableau I.1), et parmi eux, 36% ont été enregistrés dans les cinq dernières années. *Bacillus thuringiensis* ou Bt est considérée comme la bactérie la plus importante et la plus largement répandue, elle domine le marché des biopesticides microbiens (70%) (Thakore 2006). Ces souches produisent un mélange de différentes protéines (δ -endotoxines), et tue spécifiquement une ou quelque espèces de larves d'insecte.

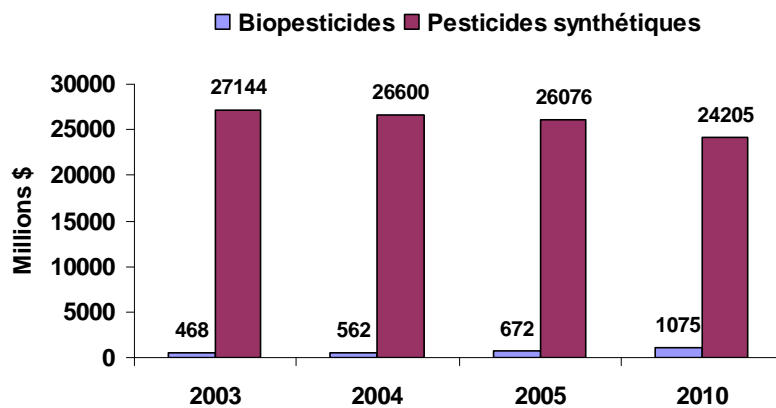


Figure I.1. Le marché mondial des biopesticides et des pesticides synthétiques, 2003-2010 (Thakore 2006).

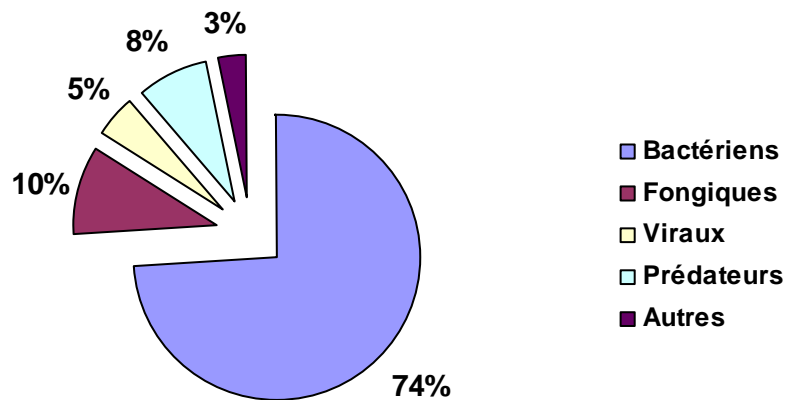


Figure I.2. Le marché mondial des biopesticides microbiens en 2005 (Thakore 2006).

I.3. Désavantages

Malgré les avantages de ces agents biologiques, le marché des biopesticides reste toujours limité à cause de certaines contraintes : premièrement, l'effet protecteur est parfois insuffisant par rapport aux produits chimiques (Shishkoff et McGrath 2002) ou n'est parfois pas constant, dépendant notamment des conditions du milieu (la température, sol, humidité, la plante hôte, pH, etc...) (Larkin et Fravel 2002; Mendoza Garcia *et al.* 2003). Deuxièmement, le coût et le délai sont très élevés pour l'enregistrement en Europe, de même que le coût de la production est élevé pour la plupart des agents de biocontrôle (Fravel *et al.* 1999). Troisièmement, le conditionnement et la formulation sont très difficiles pour des espèces non sporulantes et même parfois pour les espèces sporulantes (Hjeljord *et al.* 2000; Collins et Jacobsen 2003). D'autre part, les pesticides chimiques peuvent offrir rapidement une activité beaucoup plus efficace, tandis que les biopesticides peuvent avoir besoin de temps après leur application pour commencer à agir. Il est important de se rappeler que la plupart des biopesticides sont composés d'organismes vivants qui ont un spectre relativement restreint de ravageurs cibles

II. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) en tant qu'agents de lutte biologique

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de micro-organismes par gramme de sol. Les micro-organismes trouvent en effet dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme : sucres, acides aminés, acides organiques, hormones... Certains de ces micro-organismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la

rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas*. (Haas et Defago 2005) (Tableau I.1). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont faciles à cultiver *in vitro* ou à manipuler en laboratoire. De plus, les bacilles offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu avantage aussi pour la formulation du produit (Raaijmakers *et al.* 2002; Cavaglieri *et al.* 2005).

III. Mode d'action des PGPR en lutte biologique

Les modes d'action des agents microbiens dans le biocontrôle ne sont pas toujours bien connus et peuvent varier pour un micro-organisme donné, en fonction du pathosystème sur lequel ils sont appliqués. Mais de nombreux exemples décrivant un ou plusieurs mécanismes responsables de la réduction de la maladie sont disponibles.

III.1. Interactions directes PGPR/Pathogène

III.1.1. Compétition pour l'espace et les nutriments

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Piano *et al.* 1997; Reyes *et al.* 2004). Cependant, cette corrélation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n'est dans certains cas pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale.

On a beaucoup discuté l'idée qu'une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie. Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un flagelle) (Jofre *et al.* 2004), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (Berggren *et al.* 2001; Gupta 2003; Grover 2004).

Une illustration de l'effet de la compétition pour l'espace concerne la lutte biologique contre le pathogène *Ceratocytis paradoxa* qui est responsable de la maladie de la pourriture noire sur les fruits d'ananas. On a observé que cette maladie a seulement été réduite dans les fruits prétraités avec l'eau de lavage de fruits d'ananas contenant la levure *Pichia guilliermondii*. Ce traitement permet de réduire la germination des spores, la longueur des germes et le poids sec du pathogène *C. paradoxa* et les résultats montrent que le mode d'action de *P. guilliermondii* serait basé sur la compétition pour l'espace et les nutriments parce qu'on n'a observé aucun effet antagonisme de cette levure lorsqu'elle est appliquée après l'inoculation du pathogène (Reyes *et al.* 2004).

III.1.2. Compétition pour le fer et production de sidérophores

Un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. Les micro-organismes ont la capacité de synthétiser des siderophores qui sont des molécules chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. Ces composés ont une grande affinité pour le Fe^{3+} . En s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution de sa croissance. Par exemple, certaines bactéries du genre *Pseudomonas* ont un grand pouvoir de chélation du fer. Elles peuvent reconnaître et utiliser les siderophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser le siderophore qu'elles produisent. Cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour le substrat mieux que

d'autres habitants microbiens de la rhizosphère (Ongena *et al.* 2002b). D'autre part, malgré que la production des sidérophores soit un mécanisme important pour l'activité des PGPR, elle est rarement essentielle dans le biocontrôle (Ongena *et al.* 2000; Meziane *et al.* 2005). Un grand nombre de facteurs environnementaux (pH, température et la source de carbone) influence la production des sidérophores (Duffy et Défago 1999; Valdebenito *et al.* 2006).

III.1.3. Antibiose et parasitisme

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *B. subtilis* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants, par exemple : la zwittermycine-A, la kanosamine (Peypoux *et al.* 1999), des lipopeptides des familles de la surfactine, de l'iturine et de la fengycine (Peypoux *et al.* 1999; Bonmatin *et al.* 2003; Lin *et al.* 2005; Rahman *et al.* 2007) et encore des enzymes hydrolytiques (β -1,3-glucanase) qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques (Leelasuphakul *et al.* 2006). On a récemment montré un rôle de ces lipopeptides dans l'effet protecteur par une souche particulière de *B. subtilis* contre la fonte des semis des plantes d'haricot provoquées par *Pythium ultimum* (Ongena *et al.* 2005b), et contre la moisissure grise de la pomme après la récolte (Touré *et al.* 2004). D'autre part chez *Pseudomonas*, d'autres molécules antifongiques comme le HCN, la viscosamide, la pyoluteorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol, la pyrrolnitrine, les phenazines et les butyrolactones sont impliquées dans le biocontrôle (Raaijmakers *et al.* 1995; Haas et Keel 2003; Haas et Defago 2005). Plusieurs facteurs abiotiques (l'oxygène, la température, des sources spécifiques de carbone et d'azote, et des micro-éléments), biotiques (la plante hôte, le pathogène, la microflore indigène, et la densité de cellules de la souche productrice) et physiologiques tels que le quorum sensing ont été identifiés pour influencer la production des antibiotiques par les agents bactériens de biocontrôle.

Ces PGPR montrent non seulement un large spectre de diversité dans le type mais également dans le nombre d'antibiotiques produits (Raaijmakers *et al.* 2002; McGowan *et al.* 2005). Par exemple, certaines souches de PGPR ont la capacité d'excréter des métabolites qui jouent un rôle important dans l'inactivation des facteurs de germination du pathogène ou la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines. Ainsi, la capacité de certaines bactéries à parasiter et à dégrader les spores des pathogènes à travers la production d'enzymes détruisant la barrière cellulaire a été démontrée (Whipps 2001). Une étude récente a démontré que l'espèce de la plante hôte a une influence significative sur la dynamique, la composition et l'activité des espèces antagonistes indigènes spécifiques de *Pseudomonas* spp. (Bergsma-Vlami *et al.* 2005).

III.2. Interactions PGPR/plante

III.2.1. Promotion de la croissance de l'hôte

Certaines souches de PGPR des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Rhodobacter*, *Azospirillum* ont récemment été décrites pour leur effet direct positif sur la croissance des plantes et l'augmentation du rendement de la culture (légumes, pomme, citron, myrtille, mûre, abricot, framboise, betterave à sucre...) (Esitken *et al.* 2002; Dobbelaere *et al.* 2003; Cakmakci *et al.* 2006; Lee *et al.* 2006; Orhan *et al.* 2006). Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par divers mécanismes tels que la fixation d'azote (N₂) et la solubilisation d'oligoéléments tels que le phosphate (P) (Cakmakci *et al.* 2006; Orhan *et al.* 2006), l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante, la synthèse des phytohormones ou de vitamines (Dobbelaere *et al.* 2003), et en diminuant la toxicité des métaux lourds (Burd *et al.* 1998; Whipps 2001).

III.2.2. Renforcement de la capacité défensive de l'hôte

D'autre part, certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes.

Ce phénomène a été nommé «résistance systémique induite» (ISR, Induced Systemic Resistance) (Van Loon *et al.* 1998; Pieterse, CMJ. *et al.* 2002). C'est à l'étude de ce phénomène qu'est dévolue cette thèse et l'état actuel des connaissances sera détaillé ci-dessous en parallèle avec ce que l'on sait au niveau des interactions plantes/pathogènes qui sont globalement mieux connues.

IV. Interactions plante/pathogène

Les interactions entre la plante et l'agent pathogène impliquent l'échange d'informations. Tout d'abord, l'organisme pathogène est capable de reconnaître la plante grâce à certains facteurs portés par l'hôte (Thordal-Christensen 2003), et ensuite de modifier son métabolisme pour fournir les conditions favorables à la pathogénicité (Alfano et Collmer 2004; Chang *et al.* 2004). Parallèlement, les plantes ont évolué pour identifier des motifs associées aux pathogènes (PAMPs), pour renforcer les défenses existantes et pour développer d'autres mécanismes de défenses puissants (Gomez-Gomez et Boller 2002; Parker 2003). Ces mécanismes de défense peuvent être constitutifs, ou induits après contact avec un agent approprié.

On distingue trois types d'interactions plante/pathogène:

- L'interaction non-hôte ou incompatible de base: la plante est protégée contre l'infection de la plupart des souches d'une espèce pathogène.
- L'interaction compatible: la plante est susceptible et peut être infectée par un pathogène virulent.
- L'interaction incompatible spécifique: elle est basée sur une relation de type gène-pour-gène ; ce type d'interaction fut défini génétiquement par Flor en 1971 dans son modèle qui permet de décrire les deux premiers types d'interactions, compatible et incompatible (Tableau I.2) (Flor 1971). Selon son hypothèse, la réaction de défense est conditionnée par l'expression simultanée d'un gène dominant d'aviorulance (Avr) chez l'agent infectieux, codant pour l'éliciteur spécifique, et d'un gène dominant de résistance (R) chez la plante hôte

(Staskawicz *et al.* 1995; Dangl et Jones 2001). Il s'agit dès lors d'une interaction incompatible. Si l'un de ces deux allèles dominants est absent, l'interaction qui s'ensuit est de type compatible et conduit à la maladie. L'agent pathogène reconnaît donc la plante comme hôte potentiel et est capable de déclencher l'infection mais la plante peut développer rapidement une réponse prévenant sa propagation. Ainsi, l'identification précoce du pathogène avirulent lance une gamme de mécanismes de défense actifs, contribuant à ralentir ou empêcher l'infection (Hammond-Kosack et Jones 1997).

Cette forme de défense liée à l'interaction incompatible est caractérisée par deux types de réponses défensives inductibles qui se succèdent après l'infection initiale. La première, nommée réponse hypersensible ou HR, est une défense locale et rapide. Tandis que la seconde, la résistance systémique acquise ou SAR, est systémique et à long terme, et sera détaillé ci-dessous.

Tableau I.2. Modèle génétique de Flor (1971) des interactions plantes-pathogènes

		Génotype de la plante hôte	
		R1-r2	r1-R2
Génotype de l'agent pathogène	Avr1-avr2	Incompatible	Compatible
	avr1-Avr2	Compatible	Incompatible

V. Les événements précoces dans la HR

Après l'étape initiale de reconnaissance entre la plante et le pathogène avirulent, les premiers événements consistent en perturbations membranaires, sous la forme de transferts d'ions entre compartiments distincts et avec l'extérieur de la cellule (Heath 2000). Ces flux d'ions ont pour principal effet de conduire à une augmentation de la teneur en calcium. Ces ions Ca⁺⁺, messagers secondaires typiques des mécanismes de transmission de signaux, relayeraient le signal initial à travers l'activation de protéines kinases (Bogdanove et Martin 2000), qui à leurs tours initieraient les cascades de

phosphorylations responsables du déclenchement des processus de défense. La réponse hypersensible (HR) fait partie de ces réactions de défense. Elle est caractérisée par la mort cellulaire programmée (PCD) au site d'infection et la restriction de la croissance et de la progression de l'agent pathogène (Lam *et al.* 2001; Lam 2004). Cette HR est associée à la poussée oxydative (oxidative burst) et peut mener à l'activation de gènes codant pour les protéines PR (Xing *et al.* 2001; Ren *et al.* 2002). Le phénomène de poussée oxydative est caractérisé par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) tel que le H₂O₂. Il a été montré que le H₂O₂ chez *Arabidopsis thaliana* activait l'enchaînement de phosphorylation de kinases, conduisant à la mise en place des réactions de défense (Kovtun *et al.* 2000). L'oxyde nitrique pourrait avoir un rôle important dans l'induction de la PCD et des réponses de défense chez la plante, comme chez les animaux (Durner *et al.* 1998; Huang *et al.* 2002; Gerber et Dubery 2004). On a récemment montré que certaines conditions environnementales telles que la lumière et l'humidité ont des effets cruciaux sur la formation de lésions de HR et la production de ROS (Mateo *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2004). Les chloroplastes émergent comme source importante de ROS, Yaeno ayant montré récemment que le transfert de l'acide linoléique dérivé du chloroplaste aux membranes extraplastidiales pourrait activer une oxydase dépendant du NADPH et réguler la production de ROS après l'infection avec des pathogènes avirulents (Yaeno *et al.* 2004). La responsabilité unique des ROS dans la PCD, a récemment été remise en question sur base de leurs cinétiques d'apparition. Plusieurs auteurs suggèrent que ces espèces réactives ne seraient pas la cause directe de la mort cellulaire programmée, mais plutôt un phénomène y concourant, ou même une conséquence (Shapiro et Zhang 2001; Zhang *et al.* 2004). En outre, il faut noter que les cellules subissant la mort cellulaire programmée produisent des signaux qui activent des réponses de défense dans les cellules adjacentes (Durrant et Dong 2004). Bien qu'on a suggéré un rôle important de l'acide salicylique (SA) dans le développement de la HR (Dorey *et al.* 1997; Martinez *et al.* 2000), certaines études ont montré que la HR ne dépend pas du SA (Huckelhoven *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2004b). Chez le tabac par exemple, on a trouvé que le SA agit en amont de la SAR mais en aval de la HR (Zhang *et al.* 2004b).

VI. Les deux types de résistances systémiques

Les défenses mises en œuvre par les plantes ne se limitent pas aux seules réponses locales. Les végétaux sont également capables de déployer des défenses systémiques, c'est-à-dire généralisées à l'ensemble de leurs tissus.

VI.1. La résistance systémique acquise ou SAR (Systemic Acquired Resistance)

Cette résistance est stimulée à la suite d'une infection initiale par un pathogène avirulent. Cette résistance a été démontrée pour la première fois par Ross qui a constaté que suite à une première infection de plants de tabac par le TMV (Tobacco Mosaic Virus), une deuxième infection provoquait moins de dégâts au niveau de la plante entière (Ross 1961). Les plantes semblent donc être capables de mémoriser l'impact d'une première infection afin de se protéger face à une seconde infection. Généralement, ce type de résistance est accompagné de l'accumulation d'acide salicylique (SA) et de protéines liées à la pathogénicité (PR : Pathogenesis-Related Proteins). Il peut être induit après une réponse hypersensible locale (HR), peut être associé à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et parfois à la synthèse de phytoalexines (Sticher *et al.* 1997; Durrant et Dong 2004; Desender *et al.* 2007). Lorsque la plante est dans un environnement sain, ces défenses ne sont pas activées, c'est l'arrivée d'un stimulus qui va enclencher des mécanismes de défenses latents. Le temps nécessaire pour l'établissement de la SAR et le niveau de protection atteint dépendent de la plante et du type d'organisme utilisé pour l'inoculation initiale (Sticher *et al.* 1997). Par exemple, on a estimé que la SAR apparaît de 30 minutes à plusieurs heures après l'infection initiale et entraîne la résistance, lors d'une infection ultérieure, à un grand nombre de pathogènes potentiels aussi différents que des virus, des bactéries ou des champignons (Klarzynski et Fritig 2001). Cette résistance peut durer plusieurs semaines (Madamanchi et Kuc 1991; Hammerschmidt et Kuc 1995). Chez le concombre par exemple, on a observé qu'après la première inoculation par un agent pathogène, les plants ont été protégés jusqu'à la floraison (Madamanchi et Kuc 1991).

VI.2. La résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)

Cette résistance est stimulée par certaines rhizobactéries non-pathogènes (PGPR). Comme il est mentionné plus haut, ces rhizobactéries sont capables de réduire une maladie à travers la stimulation de mécanismes de défense inductibles chez la plante (Van Loon *et al.* 1998). L'induction d'une telle capacité de défense est systémique : le traitement des racines par des PGPR produit des effets protecteurs sur d'autres parties de la plante sans migration des bactéries induisant l'ISR au travers du système vasculaire de la plante ou à travers les tissus (Ramamoorthy *et al.* 2001; Bent 2005). La preuve du rôle d'une souche de PGPR en tant qu'inducteur de l'ISR dans la réduction d'une maladie est donc obtenue en garantissant une séparation spatiale de l'agent pathogène et de l'agent inducteur de la résistance, afin d'exclure toute interaction antagoniste directe. C'est le cas si l'on inocule les bactéries sur les racines et le pathogène sur la surface foliaire de la plante ou en utilisant des systèmes séparant les racines en deux groupes séparés (Van Peer *et al.* 1991; Zhou et Paulitz 1994; Bakker *et al.* 2007).

L'ISR est donc phénotypiquement similaire à la SAR. Cependant, il semble que les voies d'inductions de la SAR et l'ISR soient différentes, comme il sera expliqué plus loin, même si toutes deux se basent sur la transmission d'un signal conduisant à l'activation d'un ensemble de mécanismes de défense. Les mécanismes développés par les plantes permettent de se protéger contre un large spectre de pathogènes pas seulement fongiques, bactériens et viraux, mais aussi vis-à-vis de maladies causées par certains insectes et nématodes (Sticher *et al.* 1997; Van Loon *et al.* 1998; Ramamoorthy *et al.* 2001; Durrant et Dong 2004).

La colonisation efficace des racines par des PGPR est un événement essentiel pour l'expression optimale de l'activité de biocontrôle agissant par compétition pour le substrat ou antibiose (Bloemberg et Lugtenberg 2001), mais aussi pour l'ISR où la population des bactéries sur les racines doit atteindre un niveau seuil suffisant pour déclencher le phénomène. Chez *Pseudomonas* par exemple, il doit être de minimum 10^5 cellules par gramme de racines (Raaijmakers *et al.* 1995). De plus, les mécanismes de résistance dans l'ISR atteignent leur efficacité maximale entre 4 à 5 jours après

l'application d'un agent induisant, mais le niveau de persistance de la résistance diminue avec le temps. Généralement, l'ISR ne confère pas une protection totale contre l'infection (Harman *et al.* 2004) et la durabilité de la résistance induite par les PGPR diffère d'une plante à l'autre, mais aussi en fonction de la souche bactérienne utilisée (Ramamoorthy *et al.* 2001). Par exemple, l'application combinée d'une souche particulière de *Pseudomonas* sur les graines, les racines, le sol et sur les feuilles a augmenté la durabilité de l'ISR chez le riz contre la maladie causée par *Rhizoctonia solani* (Nandakumar *et al.* 2001).

VI.2.1. Non spécificité vis-à-vis de l'hôte et du pathogène

Les souches inductrices de l'ISR peuvent appartenir aux bactéries Gram positives et plus particulièrement les bacilles comme *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus pumilus*, *B. mycoides*, *B. subtilis*, ou aux bactéries Gram négatives surtout le genre *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*) ou des *enterobactériaceae*, comme *Serratia* (*S. marcescens*, *S. plymuthica*) or *Pantoea agglomerans* (Van Loon *et al.* 1998; Ramamoorthy *et al.* 2001; Bent 2005) (Tableau I.3).

La résistance systémique induite a été tout d'abord observée dans beaucoup d'espèces végétales dicotylédones, et plus particulièrement dans les famille des *Cucurbitaceae* (concombre, pastèque) (Ongena *et al.* 2000; Lee *et al.* 2001; Press *et al.* 2001; Zehnder *et al.* 2001; Ongena *et al.* 2005a), des *Solanaceae* (pomme de terre, tomate et tabac) (Hasky-Günther *et al.* 1998; De Meyer *et al.* 1999a; Reitz *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2002; Meziane *et al.* 2005; Ongena *et al.* 2005a), des *Brassicaceae* (radis, Arabidopsis) (Han *et al.* 2000; Krause *et al.* 2003; Ryu *et al.* 2004; Meziane *et al.* 2005), des *Fabaceae* (haricot, petit pois) (Benhamou *et al.* 1996; Meziane *et al.* 2005; Ongena *et al.* 2005c) et des *Caryophyllaceae* (œillet) (Van Peer *et al.* 1991; Van Peer et Schippers 1992). Toutefois, des travaux plus récents ont montré que l'ISR peut aussi être effective chez certaines plantes monocotylédones telles que le riz, le maïs et la canne à sucre (Nandakumar *et al.* 2001; Viswanathan et Samiyappan 2002a; 2002b; De Vleesschauwer *et al.* 2006). Ce phénomène a été aussi occasionnellement observé sur d'autres plantes comme le café (Guzzo et Martins 1996), le thé (Saravanakumar *et al.* 2007) et la pomme

(Momol *et al.* 1999). Comme il a été observé dans le cas de la SAR induite par un agent pathogène, l'ISR induite par des rhizobactéries offre une protection assez peu spécifique en ce qui concerne la nature de l'agent pathogène responsable de la maladie. Puisque la stimulation de l'ISR est systémique, la protection s'exprime vis-à-vis de pathogènes qui attaquent les racines comme *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* ou *Pythium aphanidermatum*, mais aussi peut réduire l'infection par des pathogènes actifs exclusivement sur les feuilles, les fleurs ou les fruits. Parmi eux, on retrouve les champignons *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, diverses espèces de *Colletotrichum*, les bactéries *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris*, et certaines virus (virus de la mosaïque du tabac ou virus de la mosaïque du concombre CMV) (Tableau I.3).

Un intérêt majeur pour la compréhension fondamentale du phénomène et pour l'exploitation des micro-organismes induisant l'ISR en tant que produits biopesticides repose sur le fait qu'une même bactérie peut induire une résistance systémique dans diverses plantes et contre divers pathogènes. Chez le concombre par exemple, les maladies causées par deux champignons (*Fusarium oxysporum*, infectant les racines et le pathogène foliaire *C. orbiculare*), par deux bactéries des feuilles (*Pseudomonas Syringae* et *Erwinia tracheiphila*) et par le scarabée du concombre sont toutes réduites par l'application d'une souche de PGPR (*Serratia marcescens* 90-166 ou *Pseudomonas fluorescences* 89-B-61) à travers l'induction d'une résistance systémique (Tableau I.3). Ces résultats suggèrent que les plantes hôtes peuvent stimuler de multiples mécanismes de défense pour répondre à l'agression de divers pathogènes. Toutefois, cela ne signifie pas que le potentiel inducteur de l'ISR d'une souche donnée soit « universel ». Les souches bactériennes diffèrent dans leur capacité à induire la résistance dans différentes espèces de plantes, et par contre les plantes montrent des variations dans l'expression de l'ISR lors de l'induction par des souches bactériennes spécifiques. Apparemment, la stimulation de l'ISR par une souche de PGPR dépend de l'espèce végétale et des caractéristiques génétiques spécifiques de la souche donnée. Par exemple, chez *Pseudomonas fluorescens* au contraire de la souche WCS358r, la souche WCS374r peut induire l'ISR dans le radis mais pas chez *Arabidopsis*. Par contre, une troisième souche

isolée WCS417r dans la même étude peut éliciter l'ISR chez les deux plantes (Tableau I.3).

VI.2.2. Intérêt économique dans le contrôle biologique

Les stratégies de biocontrôle associées avec l'ISR donnent de grands espoirs, et certaines souches de PGPR induisant l'ISR sont actuellement utilisées comme produits biopesticides tels que les souches *Bacillus subtilis* GBO3 (Kodiak®, Gustafson Company, USA) (Raupach et Kloepper 2000) et *B. subtilis* QST713 (Serenade®, Agraquest, USA), *B. subtilis* GB03 et MBI 600, *B. pumilus* GB34, *B. licheniformis* SB3086, un mélange des souche *B. subtilis* GB122 et le *B. amyloliquefaciens* GB99, et quelques souches de *P. fluorescens*, de *P. putida*, et de *P. chlororaphis* 63-28 (Paulitz et Bélanger 2001; Schisler *et al.* 2004). La liste des organismes identifiés comme inducteur d'ISR a augmenté rapidement ces 15 dernières années, certains sont repris dans le tableau I.3. En plus, l'ISR peut être utilisée avec succès pas seulement dans la serre mais aussi dans le champ (Ramamoorthy *et al.* 2001; Zehnder *et al.* 2001; Saravanakumar *et al.* 2007), et dans les programmes de lutte intégrée (IPM). Par exemple, la combinaison d'agents bactériens de contrôle biologique appliqués sur les feuilles et de PGPR inducteurs de l'ISR appliqués sur les racines a permis d'améliorer le contrôle de maladies causées par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* chez la tomate (Ji *et al.* 2006).

Tableau I.3. Exemples de rhizobactéries induisant l'ISR dans divers pathosystèmes (adapté de Ongena et Thonart 2006)

genre	souche	Pathosystème (plante hôte/pathogène)	Référence
Gram négatives			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	89-B-61	Tomate/ <i>Phytophthora infestans</i>	(Yan <i>et al.</i> 2002)
		Tomate/cucumber mosaic virus	(Raupach <i>et al.</i> 1996)
		Tabac/ <i>Peronospora tabacina</i>	(Zhang <i>et al.</i> 2002)
		Arabidopsis/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Ryu <i>et al.</i> 2003)
		Concombre/ Scarabée du concombre	(Zehnder <i>et al.</i> 2001)
<i>P. fluorescens</i>	63-28	Concombre/ <i>P. aphanidermatum</i>	(Chen 1999; 2000)
<i>P. fluorescens</i>	CHAO	Arabidopsis/ <i>Peronospora parasitica</i>	(Iavicoli <i>et al.</i> 2003)
		Tabac/Tobacco necrosis virus	(Maurhofer <i>et al.</i> 1994; 1998)
<i>P. fluorescens</i>	WCS417r	Tomate/ <i>Meloidogyne javanica</i>	(Siddiqui et Shaukat 2003)
		Oeillet/ <i>F. oxysporum</i>	(Van Peer <i>et al.</i> 1991; Van Peer et Schippers 1992)
			(Steijl <i>et al.</i> 1999)
		Arabidopsis/ <i>F. oxysporum</i>	(Pieterse <i>et al.</i> 1996)
		Arabidopsis/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Van Wees <i>et al.</i> 1997; Pieterse <i>et al.</i> 1998; Ton <i>et al.</i> 2002a)
		Tomate/ <i>Fusarium oxysporum</i>	(Duijff <i>et al.</i> 1997)
		Radis/ <i>Alternaria brassicicola</i>	(Hoffland <i>et al.</i> 1996)
		Radis/ <i>Fusarium oxysporum</i>	(Hoffland <i>et al.</i> 1996; Leeman <i>et al.</i> 1996)
<i>P. fluorescens</i>	WCS374r	Radis/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Hoffland <i>et al.</i> 1996)
		Radis/ <i>F. oxysporum</i>	(Leeman <i>et al.</i> 1995a; 1995b; 1996)
<i>P. fluorescens</i>	C15	Arabidopsis/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Hase <i>et al.</i> 2003)
<i>P. fluorescens</i>	S97	Concombre/. <i>aphanidermatum</i>	(Zhou et Paulitz 1994)
<i>P. fluorescens</i>	EP 1	Haricot/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Alstr.m 1991)
<i>P. fluorescens</i>	PF1	Canne à sucre/ <i>Colletotrichum falcatum</i>	(Viswanathan et Samiyappan 2002a; 2002b)
		Riz/ <i>Rhizoctonia solani</i>	(Nandakumar <i>et al.</i> 2001)
		Canne à sucre / <i>Colletotrichum falcatum</i>	(Viswanathan et Samiyappan 2002a; 2002b)
		Thé/ <i>Exobasidium vexans</i>	(Saravanakumar <i>et al.</i> 2007)
<i>P. fluorescens</i>	7-14	Riz/ <i>Magnaporthe grisea</i>	(Krishnamurthy et Gnanamanickam 1998)
<i>P. fluorescens</i>	WR8-3, WR9	Pastèque/ <i>Didymella byroniae</i>	(Lee <i>et al.</i> 2001)
<i>P. fluorescens</i>	A506	Pomme/ <i>Erwinia amylovora</i>	(Momol <i>et al.</i> 1999)
<i>P. fluorescens</i>	sp.	Betterave/ <i>Heterodera schachtii</i>	(Oostendorp et Sikora 1990)
<i>P. fluorescens</i>	sp.	Tomate/ <i>Meloidogyne incognita</i>	(Santhi et Sivakumar 1995)
<i>P. putida</i>	BTP1	Concombre/ <i>P. aphanidermatum</i>	(Ongena <i>et al.</i> 1999; 2000)
		Concombre/ <i>C. lagenarium</i>	(Ongena <i>et al.</i> 2007b)
		Haricot/ <i>Botrytis cinerea</i>	(Ongena <i>et al.</i> 2004; 2005c)

genre	souche	Pathosystème (plante hôte/pathogène)	Référence
<i>P. putida</i>	WCS358	Arabidopsis/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Van Wees <i>et al.</i> 1997; Meziane <i>et al.</i> 2005)
		Arabidopsis/ <i>F. oxysporum</i>	(Van Wees <i>et al.</i> 1997; Meziane <i>et al.</i> 2005)
		Haricot/ <i>Botrytis cinerea</i>	(Meziane <i>et al.</i> 2005)
	KKM1	Tomate/ <i>Botrytis cinerea</i>	(Meziane <i>et al.</i> 2005)
		Canne à sucre/ <i>Colletotrichum falcatum</i>	(Viswanathan et Samiyappan 2002a; 2002b)
	89-B-27	Concombre/ <i>C. orbiculare</i>	(Wei <i>et al.</i> 1991)
WR9-16 V14i	Concombre / <i>Pseudomonas syringae</i>	Concombre / <i>Pseudomonas syringae</i>	(Liu <i>et al.</i> 1995a)
		Concombre / <i>Fusarium oxysporum</i>	(Liu <i>et al.</i> 1995b)
	Pastèque/ <i>Didymella byroniae</i>	(Lee <i>et al.</i> 2001)	
<i>P. aeruginosa</i>	7NSK2	Riz/ <i>Magnaporthe grisea</i>	(Krishnamurthy et Gnanamanickam 1998)
		Haricot/ <i>Botrytis cinerea</i>	(De Meyer et Höfte 1997; De Meyer <i>et al.</i> 1999b)
		Haricot/ <i>C. lindemthianum</i>	(Bigirimana et Höfte 2002)
		Tabac/Tobacco mosaic virus	(De Meyer <i>et al.</i> 1999a)
<i>Serratia marcescens</i>	90-166	Tomate/ <i>Botrytis cinerea</i>	(Audenaert <i>et al.</i> 2002)
		Riz/ <i>Magnaporthe grisea</i>	(De Vleeschauwer <i>et al.</i> 2006)
		Concombre/ <i>Colletotrichum orbiculare</i>	(Press <i>et al.</i> 2001)
		Concombre/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Press <i>et al.</i> 1997)
		Concombre/ <i>Fusarium oxysporum</i>	(Liu <i>et al.</i> 1995b)
		Tabac/ <i>Peronospora tabacina</i>	(Zhang <i>et al.</i> 2002)
		Arabidopsis/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Ryu <i>et al.</i> 2003)
		Concombre/ Scarabée de concombre	(Zehnder <i>et al.</i> 2001)
		Loblolly pine/ <i>Cronartium quercum</i>	(Enebak et Carey 2000)
		Tomate/cucumber mosaic virus	(Raupach <i>et al.</i> 1996)
<i>Serratia plymuthica</i>	RIGC4	Tomate/ <i>Fusarium oxysporum</i>	(Benhamou et Bélanger 1998)
	2-67	Concombre/ <i>C. orbiculare</i>	(Wei <i>et al.</i> 1991)
<i>Pantoea agglomerans</i>	E278Ar	Radis/ <i>Xanthomonas campestris</i>	(Han <i>et al.</i> 2000)
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	C9-1	Pomme/ <i>Erwinia amylovora</i>	(Momol <i>et al.</i> 1999)
	IN 114	Tomate/Cucumber mosaic cucumovirus	(Zehnder <i>et al.</i> 2000)
<i>Flavomonas oryzihabitans</i>	INR-5	Concombre/ Scarabée de concombre	(Zehnder <i>et al.</i> 2001)
<i>Rhizobium elti</i>	G12	Pomme de terre/Potato cyst nematode	(Reitz <i>et al.</i> 2002)
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	G12	Pomme de terre/Potato cyst nematode	(Hasky-Günther <i>et al.</i> 1998)
Gram-positives			
<i>Bacillus</i> spp.		Radis/ <i>Xanthomonas campestris</i>	(Krause <i>et al.</i> 2003)
		Tomate/cucumber mosaic virus	(Murphy <i>et al.</i> 2003)

<i>B. subtilis</i>	Bs2500	Tomate/ <i>Botrytis cinerea</i>	(Ongena <i>et al.</i> 2007)
	Bs2508	Tomate/ <i>Botrytis cinerea</i>	(Ongena <i>et al.</i> 2007)
	sp.	Coton/ <i>Meloidogyne incognita</i>	(Sikora 1992)
	FZB-G	Tomate/ <i>Fusarium oxysporum</i>	(Gupta 2003)
	GBO3	Concombre/ <i>Erwinia tracheiphila</i> - Scarabée de concombre	(Raupach et Kloepper 2000)
		<i>Arabidopsis</i> / <i>Erwinia carotovora</i>	(Ryu <i>et al.</i> 2004)
	IN937b	Tomate/Cucumber mosaic cucumovirus	(Zehnder <i>et al.</i> 2000)
		Tomate/tomato mottle virus	(Zehnder <i>et al.</i> 2000)
	M4 (S499)	Concombre/ <i>Colletotrichum</i> <i>lagenarium</i>	(Ongena <i>et al.</i> 2005a)
		Tomate/ <i>Pythium aphanidermatum</i>	(Ongena <i>et al.</i> 2005a)
<i>Bacillus pumilus</i>		Haricot/ <i>Botrytis cinerea</i>	(Ongena <i>et al.</i> 2005b)
	SE34	Tabac/ <i>Peronospora tabacina</i>	(Zhang <i>et al.</i> 2002)
		<i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas syringae</i>	(Ryu <i>et al.</i> 2003)
		Concombre/Cucumber beetle	(Zehnder <i>et al.</i> 2001)
		Tomate/Cucumber mosaic cucumovirus	(Zehnder <i>et al.</i> 2000)
		Tomate/tomato mottle virus	(Murphy <i>et al.</i> 2003)
		Loblolly pine/ <i>Cronartium quercum</i>	(Enebak et Carey 2000)
		Petit pois/ <i>Fusarium oxysporum</i>	(Benhamou <i>et al.</i> 1996)
		Tomate/ <i>Fusarium oxysporum</i>	(Benhamou et Bélanger 1998)
		Tomate/ <i>Phytophthora infestans</i>	(Yan <i>et al.</i> 2002)
T4	Tabac/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Park et Kloepper 2000)	
	<i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas syringae</i>	(Ryu <i>et al.</i> 2003)	
INR-7	Loblolly pine/ <i>Cronartium quercum</i> f	(Enebak et Carey 2000)	
	Concombre/ Scarabée de concombre	(Zehnder <i>et al.</i> 1997; Zehnder <i>et al.</i> 2001)	
<i>B. amyloliquifaciens</i>	203-6, 203-7	Betterave/ <i>Cercospora beticola</i>	(Bargabus <i>et al.</i> 2004)
	IN937	Tomate/Cucumber mosaic cucumovirus	(Zehnder <i>et al.</i> 2000)
		Tomate/tomato mottle virus	(Murphy <i>et al.</i> 2000)
		Concombre/ Scarabée de concombre	(Raupach et Kloepper 2000)
		<i>Arabidopsis</i> / <i>Erwinia carotovora</i>	(Ryu <i>et al.</i> 2004)
	EXTN-1	Tabac/pepper mild mottle virus	(Ahn <i>et al.</i> 2002)
		Concombre/ <i>C. orbiculare</i>	(Jeun <i>et al.</i> 2001)
		<i>Arabidopsis</i> /pepper mild mottle virus	(Ahn <i>et al.</i> 2002)
		Café/ <i>Hemileia vastatrix</i>	(Guzzo et Martins 1996)
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Berliner	
<i>B. mycoides</i>	BacJ	Betterave/ <i>Cercospora beticola</i>	(Bargabus <i>et al.</i> 2002)
<i>B. pasteurii</i>	C-9	Tabac/ <i>Peronospora tabacina</i>	(Zhang <i>et al.</i> 2002)
<i>Bacillus sphaericus</i>	B43	Pomme de terre/Potato cyst nematode	(Hasky-Günther <i>et al.</i> 1998)
<i>Bacillus cereus</i>	B1	Trèfle blanc/Clover cyst nematode	(Kempster <i>et al.</i> 2001)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	B2	<i>Arabidopsis</i> / <i>Erwinia carotovora</i>	(Timmusk et Wagner 1999)

VII. Les éliciteurs de la SAR et de l'ISR

VII.1. Les éliciteurs de la SAR

VII.1.1. Composés inorganiques

Le traitement des feuilles de plants avec des sels de phosphate et de potassium a stimulé la protection systémique contre divers pathogènes foliaires chez différentes plantes telles que le concombre, le maïs, la rose, la vigne, la pomme, le mangue et la nectarine (Reuveni et Reuveni 1998).

VII.1.2. Composés synthétiques

Certains composés chimiques tels que l'acide salicylique (SA), l'acide dichloroisonicotinique (INA) et le S-méthyl-ester de l'acide benzo-1,2,3-thiadiazole-7-carbothioïque (BTH) et l'acide β -aminobutyrique (BABA) (Kessmann *et al.* 1994; Friedrich *et al.* 1996; Lawton *et al.* 1996; Oostendorp *et al.* 2001; Bovie *et al.* 2004; Andreu *et al.* 2006) sont capables de déclencher la SAR dans différentes plantes contre plusieurs pathogènes.

VII.1.3. Eliciteurs microbiens

Dans beaucoup de cas d'interactions incompatibles gène pour gène, la nature de l'éliciteur microbien n'est pas connue. Mais l'interaction directe ou indirecte des produits d'un gène de résistance avec un produit de gène d'avirulence stimule une voie de transmission menant à la HR, puis à la SAR. D'une manière générale, les composés microbiens des agents pathogènes, qui ont des propriétés élicitrices de la SAR, ne sont pas spécifiques d'une souche de l'agent pathogène et varient grandement dans leur nature chimique. Ils peuvent être des composés de surface comme les lipopolysaccharides (LPS) de bactéries Gram négatives (Gerber et Dubery 2004; Gerber *et al.* 2006; Sanabria et Dubery 2006), le peptidoglycane de bactéries Gram positives (Underhill et Ozinsky

2002), des β -glucanes, des oligomères dérivés de la chitine, des fragments de pectine (libérées du champignon pathogène ou de la plante hôte), mais aussi des flagellines, des protéines riches en glycine, des peptides comme la syringoline isolée de bactéries pathogènes, ou des acides gras insaturés (Ebel et Mithofer 1998; Waspi *et al.* 1998; Imler et Hoffmann 2001; Kuc 2001; Nürnberger et Scheel 2001; Underhill et Ozinsky 2002; Fliegmann *et al.* 2003; Klarzynski *et al.* 2003; Tanaka *et al.* 2003). Certaines espèces de *Phytophthora* peuvent sécréter des petits peptides nommés « élicitines » et capables de stimuler la SAR chez le tabac contre *Pernospora parastica* (Yu 1995).

VII.2. Les déterminants bactériens de l'ISR

Au contraire de la SAR, les éliciteurs produits par les PGPR et impliqués dans l'ISR sont moins bien connus, mais les recherches menées ces dernières années ont permis d'identifier plusieurs molécules bactériennes jouant ce rôle (Bakker *et al.* 2007).

VII.2.1. Les composants de la surface des cellules

Les flagelles bactériens sont nécessaires pour la mobilité et l'adhérence des bactéries sur les racines et par conséquent elles sont importantes pour une colonisation efficace (Persello-Cartieaux *et al.* 2003). Il a été récemment démontré que la flagelline (protéine du filament flagellaire des Eubactéries) de la rhizobactérie *P. putida* WCS358 peut agir comme éliciteur de résistance systémique chez *Arabidopsis* contre *P. syringae* (Meziane *et al.* 2005).

Les lipopolysaccharides (LPS) sont d'autres composés de surface cellulaire des bactéries Gram-négatives, qui contribuent avant tout à la croissance et à la survie des micro-organismes sur les plantes en facilitant la colonisation (Newman *et al.* 1995). Cependant, une activité élicitrice des LPS ou, plus spécifiquement, de la chaîne latérale O-antigénique, a été montrée sur différentes plantes (Reitz *et al.* 2002; Meziane *et al.* 2005). Le pouvoir éliciteur des LPS de PGPR varie avec la plante hôte. Par exemple, *P. putida* WCS358 est capable d'induire l'ISR via le LPS dans plusieurs plantes telles que le haricot, la tomate mais pas chez le radis et *Arabidopsis* (Meziane *et al.* 2005).

VII.2.2. Les sidérophores

Les sidérophores, produits par les PGPR dans des conditions de carence en fer, peuvent déclencher l'ISR dans certaines plantes. Les pyoverdines (aussi appelées pseudobactines) et la pyocheline sont des sidérophores synthétisés typiquement par le genre *Pseudomonas* pour lesquels une activité élicitrice de l'ISR a été démontrée (Budzikiewicz 2004). Par exemple, la souche *P. putida* WCS358 peut éliciter l'ISR dans différentes plantes tels que *Arabidopsis*, le haricot, la tomate ou l'eucalyptus grâce à ses pseudobactines (Bakker *et al.* 2003; Meziane *et al.* 2005; Ran *et al.* 2005a). La souche mutante, qui ne produit plus la pseudobactine, a perdu sa capacité à induire l'ISR chez la tomate mais pas chez le haricot (Meziane *et al.* 2005). On a récemment montré le rôle de la pyocyanine dans l'ISR chez le riz contre *Magnaporthe grisea* (De Vleeschauwer *et al.* 2006). L'étude de la souche *P. putida* BTP1 a montré que ses pyoverdines ne sont pas impliquées dans l'ISR chez le haricot (Ongena *et al.* 2002a). Les recherches sur cette souche ont mené à la purification d'un dérivé de la benzylamine (le NABD pour N,N-diméthyl-N-tetradecyl-N-benzylammonium), responsable en grande partie de l'induction de l'ISR chez le haricot, le concombre et la tomate (Ongena *et al.* 2005c; Ongena *et al.* 2007b).

VII.2.3. L'acide salicylique

Certaines souches de PGPR sont capables de produire de l'acide salicylique (SA) sous des conditions limitantes en fer. Dans certains cas, ce SA d'origine bactérienne joue le rôle d'éliciteur de l'ISR. Par exemple, le SA produit par la souche *P. aeruginosa* 7NSK2 élicite l'ISR dans quelques pathosystèmes tels que tabac/virus de mosaïque du tabac (TMV) (De Meyer *et al.* 1999), haricot/*Botrytis cinerea* et *Colletotrichum lindemuthianum* (De Meyer et Höfte 1997; Bigirimana et Höfte 2002). Un mutant de la souche *P. aeruginosa* 7NSK2 qui n'est plus capable de produire le SA, a perdu sa capacité à stimuler l'ISR chez le haricot (De Meyer et Höfte 1997). Par contre, certaines études ont montré que la production de SA par d'autres souches n'est pas un déterminant de l'ISR (Press *et al.* 1997; Ran *et al.* 2005b).

VII.2.4. Les antibiotiques

Certains composés synthétisés par les PGPR et isolés à l'origine pour leur activité antifongique sont également inducteurs de l'ISR. Ainsi, un rôle dans l'induction de l'ISR de la pyocyanine a été rapporté lors du traitement de plantes de tomate par *P. aeruginosa* 7NSK2 (Audenaert *et al.* 2002). De même, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) produit par *P. fluorescens* CHA0 et Q2-87 est essentiel pour induire des réactions de défense chez *Arabidopsis* et chez la tomate (Audenaert *et al.* 2002; Siddiqui et Shaukat 2002; Iavicoli *et al.* 2003; Weller *et al.* 2004).

D'autre part, certaines bactéries Gram positives telles que *Bacillus spp.* ont démontré leur capacité à stimuler des mécanismes de défense chez la plante, mais le plus souvent la nature de leur déterminant provoquant l'ISR n'est pas connue (Kloepper *et al.* 2004). Jusqu'à récemment, les composés volatils organiques, et plus particulièrement le 2,3-butendiol, étaient les seuls déterminants de l'ISR connus chez *Bacillus* (Ping et Boland 2004; Ryu *et al.* 2004).

VIII. Signalisation SAR/ISR

VIII.1. L'accumulation de l'acide salicylique

La SAR, induite par un agent pathogène incompatible, est notamment caractérisée par une accumulation d'acide salicylique (SA) (Van Loon et Van Strien 1999). Cette accumulation de SA se produit localement et systématiquement. Les plantes exprimant le gène *nahG* (codant pour la salicylate hydroxylase qui convertit le SA en catéchol) ne sont plus capables de développer la SAR, indiquant que le SA est une molécule essentielle au développement de cette résistance (Van Loon *et al.* 1998).

Pour l'instant, la nature du signal émis lors de la SAR n'est pas encore bien établie mais comme on en parlera plus loin, il y a la possibilité d'une molécule de nature lipidique (Durrant et Dong 2004). Bien que le SA puisse être synthétisé à partir de la L-phénylalanine par la phénylalanine ammonia lyase (PAL), la voie prédominante pour la

biosynthèse de SA *de novo* pendant l'infection se fait à partir du chorismate via l'isochorismate synthase (ICS) et l'isochorismate pyruvate lyase (IPL) (Shah 2003). La surexpression de ces deux enzymes dans les plantes transgéniques augmente l'accumulation de SA (Mauch *et al.* 2001). Chez *Arabidopsis*, l'expression du gène *SID2* (Salicylic Acid Induction Deficient2), qui code pour l'ICS, est activée dans les tissus infectés par un agent pathogène incompatible induisant la SAR (Wildermuth *et al.* 2001).

Contrairement à la SAR, l'induction de l'ISR dans les plantes par des PGPRs est souvent indépendante du SA (Pieterse *et al.* 1996; Van Wees *et al.* 1997; Yan *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2002; Iavicoli *et al.* 2003; Ryu *et al.* 2003). Cependant, certains exemples de l'ISR liée au SA ont été de temps en temps rapportés (Maurhofer *et al.* 1998; De Meyer *et al.* 1999a; Park et Kloepper 2000; Bargabus *et al.* 2004) (Tableau I.4).

VIII.2. Interaction entre le SA et le régulateur NPR1

Dans le cas de la SAR, la séquence d'événements allant de la reconnaissance au niveau local de l'agent pathogène à l'induction de l'expression des gènes de défense est extrêmement complexe. Mais il est évident que le régulateur protéique NPR1 (Non-expressor of Pathogenesis-Related Genes1) aussi connu sous le nom NIM1 (Non Immunity 1) joue un rôle crucial. Il est considéré comme un régulateur positif central de la cascade de signalisation du phénomène qui mène à l'expression des gènes de défense tels que ceux codant pour les protéines PR (Durrant et Dong 2004; Pieterse et Van Loon 2004). Les plants d'*Arabidopsis* mutants *npr1*, ne répondent plus au SA, ne peuvent déclencher l'expression de protéines PR et sont rendus fortement susceptibles à divers agents pathogènes (Cao *et al.* 1998). Le NPR1 agit indirectement pour induire la transcription des gènes *PRs* en agissant avec des facteurs de transcription de la famille TGA. Ces facteurs TGA activés se lient au promoteur de certains gènes *PRs* et induisent leur transcription (Durrant et Dong 2004).

Puisque la SAR est un processus coûteux, la transcription des gènes associée à ce phénomène doit être étroitement régulée. En plus du régulateur positif NPR1, on a récemment trouvé chez *A. thaliana* un régulateur négatif SNI1 (Suppressor of NPR1, Inducible) de la SAR qui est nécessaire pour amortir l'expression basal des gènes *PRs* (Li

et al. 1999; Mosher *et al.* 2006). Cette protéine SN11 s'accumule dans le noyau et ensuite provoque une répression des gènes stimulés par NPR1 (Mosher *et al.* 2006).

VIII.3. La réponse liée à l'acide jasmonique et à l'éthylène

VIII.3.1. Dans le cas de la SAR

Certaines études ont montré que le niveau de résistance liée à la SAR est modulé par l'éthylène (ET) et l'acide jasmonique (JA) ce qui suggère que l'induction et l'expression de la SAR soient régulées par plusieurs composés de signalisation (Figure I.3) (Dong 1998; Pieterse et van Loon 1999; van Loon *et al.* 2006). Cependant, l'activation induit ici l'expression de différents gènes *PR* chez *Arabidopsis* comprenant les protéines antifongiques telles que des défensines (PDF1.2) (Penninckx *et al.* 1996), la thionine (Thi2.1) (Epple et Bohlmann 1995; Vignutelli *et al.* 1998) et PR4 (Norman-Setterblad *et al.* 2000). Il apparaît de plus en plus clairement que la SAR induite par le SA est efficace contre les agents pathogènes biotrophes, alors que la transmission du signal lié à JA/ET confère la résistance contre les agents pathogènes fongiques nécrotrophes (Thomma *et al.* 2001; Ton *et al.* 2002b). Apparemment, une défense efficace contre les pathogènes biotrophes implique généralement la mort cellulaire programmée (PCD) liée à la réponse hypersensible (HR) et à la voie de la signalisation dépendante du SA. En revanche, les pathogènes nécrotrophes peuvent réellement bénéficier des cellules hôtes mortes et donc ne sont pas contrôlés par la PCD et les voies de défense sont plutôt liées à la signalisation via le système JA/ET (Glazebrook 2005).

En outre, on a montré que les voies de l'éthylène et de l'acide jasmonique convergent dans l'activation de la transcription du facteur de réponse à l'éthylène ERF1 (Ethylene Response Factor1) (Figure I.3), qui régule l'expression des gènes en réponse à un agent pathogène pour empêcher la progression de la maladie. L'expression d'ERF1 peut être activée rapidement et synergiquement par l'ET et le JA. Cela suggère que le ERF1 agisse en aval de ces deux hormones et que ce facteur de transcription soit l'élément clé de l'intégration des deux voies pour la régulation des gènes de réponse de la défense (Lorenzo *et al.* 2003). Récemment, l'effet synergique entre le SA, le JA et l'ET a

été montré pour l'expression des gènes de défense spécifiques tels que la défensine (*PDF2.1*) et la thionine (*Thi1.2*) activés par le JA, et la PR1 activé par le SA (Mur *et al.* 2006).

VIII.3.2. Dans le cas de l'ISR

Contrairement à la SAR, la voie de signalisation de l'ISR n'est généralement pas associée avec l'accumulation de SA (Pieterse *et al.* 2000), mais elle est plutôt liée à la perception du JA et de l'ET (Figure I.3) (Pieterse *et al.* 2001; Ton *et al.* 2002a; Ton *et al.* 2002b; Kishimoto *et al.* 2006a). Chez *A. thaliana*, la dépendance de l'ISR au JA et à l'ET est basée sur une sensibilité augmentée à ces hormones, plutôt que sur l'augmentation de leur production (Pieterse *et al.* 2000). Les études avec des mutants de réponse au JA (*jar1-1*), ou à l'éthylène (*etr1-1*) démontrent que la perception du JA et de l'ET est essentielle pour déclencher l'ISR (Pieterse *et al.* 1998; van Wees *et al.* 2000; van Loon *et al.* 2006). Par exemple, l'application du précurseur d'éthylène ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) a stimulé l'ISR dans les plants d'*A. thaliana* exprimant le gène *etr-1* (qui ne sont pas capable produire de l'éthylène) de la même façon que des plantes traitées avec une bactérie PGPR (Van Loon et Bakker 2005). Par contre, Hase a démontré que la capacité de convertir l'ACC en éthylène est une réponse générale chez *Arabidopsis* au traitement avec *P. fluorescens* WCS417r. Mais le traitement des plantes avec *P. fluorescens* WCS417r les a mis en alerte pour augmenter fortement la production d'éthylène lors de l'arrivée d'un agent pathogène. Cette augmentation d'éthylène peut participer à l'amélioration de la capacité de défense contre les pathogènes (Hase *et al.* 2003). Une autre étude avec la souche *B. subtilis* BG03 a montré que la voie n'est pas associée au JA mais bien à l'ET, suggérant que le signal dû à l'éthylène est essentiel dans *Arabidopsis* avec ce PGPR (Ryu *et al.* 2004).

D'autre part, le JA est aussi impliqué comme signal dans certaines réponses de défense. Les plantes mutantes *jar-1* ne sont plus capables de développer l'ISR, mais l'application de méthyle JA (MeJA) a stimulé l'ISR comme dans le cas de l'ACC. Cependant, le MeJA n'est pas capable de stimuler l'ISR dans les mutants *etr-1*. Par contre, l'ACC est toujours efficace pour induire l'ISR dans les mutants *jar-1*. Ces

observations indiquent que la perception de JA est nécessaire avant celle de l'éthylène. D'autre part, on a montré que l'ISR dépend du régulateur NPR1 (Pieterse *et al.* 1998). Les plants mutants *npr-1* d'*Arabidopsis* ne sont plus capables de stimuler l'ISR. Les analyses sur ce mutant ont montré que ni le MeJA, ni l'ACC n'induisent la résistance dans les plants *npr-1*, ce qui confirme que leur action est en amont du NPR-1 (Pieterse *et al.* 1998).

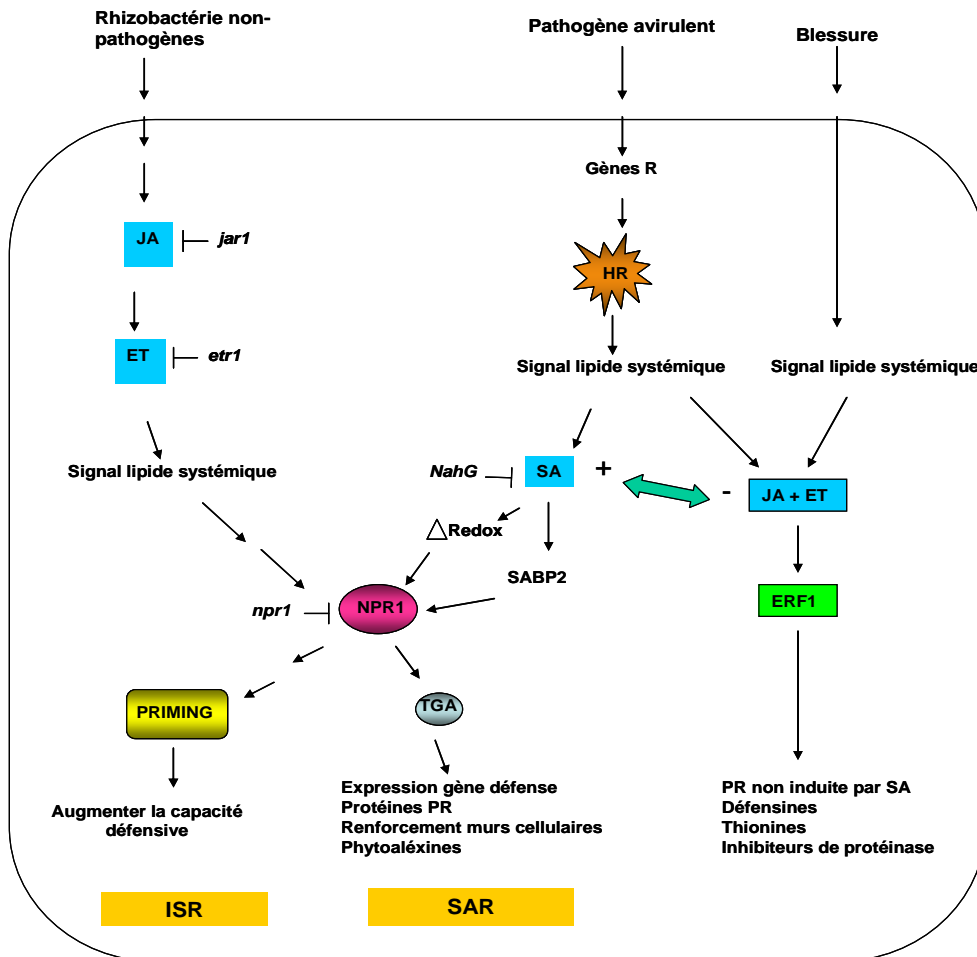


Figure I.3. Modèle de réseau de transmission du signal impliqué dans la résistance systémique acquise (SAR) stimulée par un pathogène avirulent et dans la résistance systémique induite (ISR) stimulée par une rhizobactérie non-pathogène. (adapté de Pieterse et van Loon 1999, Lorenzo 2003 et Van Loon *et al.* 2006)

VIII.3.3. En réponse à la blessure

En plus, on a récemment trouvé que tous les gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du JA sont exprimés en réponse à la blessure. Ce JA est synthétisée par la voie des octadécanoïdes qui est détaillée en point IX.4. et est considéré comme un signal systémique essentiel dans les plantes (Wasternack *et al.* 2006). On a montré que ces voies de signaux dépendants de l'éthylène (ETR1), du jasmonate (JAR1) et même de phytoalexines (PAD2) sont stimulées par traitement avec des composés aldéhydes (C6) tels que l'hexénal (un des composés secondaires de la voie oxylipine), alors que la synthèse de NPR1 n'a pas été induite (Kishimoto *et al.* 2006a). Le JA et l'ET semblent donc émerger comme un signal important dans la réponse à la blessure (Figure I.3) (Wasternack et Parthier 1997; Wasternack *et al.* 2006).

VIII.4. Le signal lipidique systémique

Les premiers événements impliqués dans la réponse défensive ainsi que les mécanismes impliqués dans la transmission du signal sont de mieux en mieux caractérisés. Dans la SAR et après l'élicitation par le pathogène avirulent, la plante réagit directement en activant les gènes de résistance (gène R) et déclenchant les réponses de défense tels que la production de ROS et la réponse HR (Figure I.3). Sur la base de récentes études, il apparaît que le signal mobile pour la SAR pourrait être une molécule de nature lipidique (Durrant et Dong 2004; Mosher *et al.* 2006). La signalisation par les phospholipides est un composant important dans les voies signalétiques chez l'Eucaryote. Elle joue un rôle principal dans la croissance des plantes et le développement aussi bien qu'en réponse systémique aux stress environnementaux, y compris l'attaque par des agents pathogènes (Song et Goodman 2002; Profotová *et al.* 2006). Des indices en faveur de la participation d'un (phospho)lipide signalant la voie dans ces processus ont été rapportés. Les phospholipases, enzymes hydrolysant les phospholipides, sont divisées en groupes selon le site de clivage des substrats (phospholipase A, C et D ; PLA, PLC et PLD). Des études récentes ont montré l'implication des PLC et PLD dans les premières réponses après le traitement des plants de *Brassica napus* avec des inducteurs chimiques

de la SAR tels que l'acide salicylique (SA), le benzothiadizole (BTH) ou le méthyle jasmonate (MeJA) (Profotová *et al.* 2006). L'activation de la PLD par l' H_2O_2 a été montrée dans différentes plantes (Zhang *et al.* 2003; Yamaguchi *et al.* 2004). Chez *Arabidopsis* par exemple, on a clairement démontré que la PLD δ liée à la membrane plasmique est activée après le traitement avec H_2O_2 et ensuite ces plantes sont plus susceptibles à la mort cellulaire programmée favorisée par l' H_2O_2 . En conséquence, la PLD δ joue probablement un rôle en influençant la réponse de la plante au stress oxydant (Zhang *et al.* 2003). De plus, on a également montré le rôle d'une protéine liée au SA (SABP2 : SA-Binding Protein2) dans la SAR après l'infection du tabac par le virus de la mosaïque de tabac (TMV) (Kumar *et al.* 2006). Cette protéine est une lipase dont l'activité est stimulée en s'attachant au SA et cela peut ensuite produire un signal dérivé de nature lipidique. Par ailleurs, le gène *SFD1* (Suppressor of Fatty acid Desaturase Deficiency1) code pour la dihydroxyacétone phosphate réductase, qui forme l'épine dorsale glycerol-3-phosphate des phosphoglycérolipides. *SFD1* est nécessaire pour l'accumulation locale et systémique du SA après l'infection par un agent pathogène. Les plantes mutantes *sfd1* ne sont plus capables de stimuler la résistance contre un agent pathogène, suggérant que *SFD1* fonctionne dans la génération, la translocation et/ou la perception d'un signal systémique de la SAR (Nandi *et al.* 2004). De plus, l'analyse sur un double mutant *sfd1* et *npr1* a montré que *SFD1* fonctionne en amont de NPR1 (Nandi *et al.* 2004).

Dans le cas de l'ISR, la participation d'un (phospho)lipide signalant la voie de défense a été aussi proposé ces dernières années, mais cela reste peu clair. Comme dans le cas de la SAR, les phospholipases et les signaux dérivés de lipides tels que JA et JAME (jasmonic acid methyl ester) sont impliqués dans les premiers processus menant aux réponses systémiques de blessure et de l'ISR dans les plantes. Ils sont probablement les premiers activés au niveau post traductionnel (Profotová *et al.* 2006; Wasternack *et al.* 2006). On a montré récemment le rôle essentiel du peptide systémine dans l'activation locale de la voie du JA. Cette systémine, qui est clivée à partir d'une prosystémine lors de la blessure, agit en tant que signal mobile qui lance la biosynthèse du JA nécessaire pour l'activation systémique des gènes de défense PI (protéinase inhibitor) dans les plantes.

VIII.5. Interactions entre les signaux

Comme signalé plus haut, les plantes sont capables d'activer différenciellement des voies de défense distinctes. Cette diversité dans les événements de transmission de signal liée à la blessure, au contact avec un agent pathogène ou avec un PGPR pourrait résulter d'une adaptation des plantes pour répondre différenciellement selon les (micro)organismes perçus (Pieterse et Van Loon 2004; Wasternack *et al.* 2006). La figure I.3 montre la diversité entre les voies de signal induites par ces (micro)organismes ou la blessure.

Dans tous les cas, les voies indépendantes de l'acide salicylique impliquent les voies de l'acide jasmonique et l'éthylène. L'infection par un pathogène biotrophe provoque principalement une activation de la SAR dépendante du SA, et qui mène à l'accumulation de protéines PR. Par contre, les réponses de défense induites par le JA et l'ET sont activées soit après l'infection par un pathogène nécrotrophe ou une blessure ou soit par le traitement avec un PGPR. Selon l'agent pathogène envahisseur, la composition des composés défensifs produits après l'infection pourrait principalement varier entre les composés induits par le SA et les autres induits par le JA ou l'ET. A cet égard, le JA et l'ET ont un effet positif (synergique) sur l'action du SA. Par conséquent, l'activation simultanée de la SAR et de l'ISR conduiront à une résistance contre les maladies plus importante que chacune d'elle prise séparément (van Wees *et al.* 2000). Par exemple chez le tabac, le traitement combiné avec le méthyle jasmonate et l'acide salicylique a mené à l'induction plus forte de l'expression du gène *PR-1* que le traitement avec de l'acide salicylique seul (Xu 1994). De même chez *Arabidopsis*, l'éthylène sensibilise les plants vis-à-vis de l'acide salicylique, menant à un niveau plus élevé d'accumulation du mRNA de *PR-1* après le traitement par l'acide salicylique (Lawton *et al.* 1994). Le SA semble par contre avoir un effet négatif sur les réponses de défense induites par le JA et l'ET. Cette effet antagoniste dépendant du SA est régulé par NPR1 (Spoel *et al.* 2003). Ainsi, il semble que la résistance dépendante du SA ait la priorité sur celle dépendante du JA (Pieterse *et al.* 2001).

La blessure provoque également une activation des réponses de défense dépendantes du JA et de l'ET. Cependant, leur nature peut différer de celles induites

après l'infection par un agent pathogène. C'est probablement parce que le JA et l'ET sont des signaux dominants au cours de la réponse à une blessure, alors que le niveau du SA ne monte pas.

D'autre part, on a déjà montré que l'ISR et la SAR, dépendent du régulateur central NPR1 (Figures I.3) (Pieterse et al. 1998). La voie d'ISR partage donc des événements de signalisation avec les autres voies déclenchées après l'infection par un organisme pathogène ou une blessure mais la réponse de défense activée en aval de NPR1 est clairement différente et n'est pas associée à l'activation des gènes codant pour des défensins, des thionins ou des PRs (Figures I.3). De plus, le NPR1 module également l'interférence entre les deux signaux SA et JA, et pourrait fonctionner comme rhéostat moléculaire pour intégrer et ajuster des réponses systémiques dépendant de la nature de l'agent pathogène (Grant et Lamb 2006). Les analyses de séquence ont indiqué que NPR1 contient un domaine constitué de répétition d'un motif ankyrin qui pourrait être impliqué dans des interactions protéine-protéine (Cao *et al.* 1997; Ryals *et al.* 1997). La fixation des protéines spécifiques de la voie au NPR1 pourrait donc expliquer la séparation des voies de la SAR et de l'ISR en aval de NPR1.

IX. Mécanismes de défense induits dans la SAR et l'ISR

Les différentes réponses de défense décrites précédemment conduisent à un état nouveau, tant physiologique que biochimique et moléculaire, en équilibre dynamique, qui confère à la plante la capacité de résister aux agents phytopathogènes. Cette résistance nécessite la mise en œuvre de cascades d'événements souvent complexes, faisant intervenir de nombreux intermédiaires, depuis le mécanisme initial de perception de l'agression jusqu'à sa mise en place effective. Ces cascades moléculaires et biochimiques, ou voies de transmission, constituent une cible préférentielle des recherches menées sur les mécanismes de résistance. En effet, leur compréhension fine devrait constituer la clé de voûte du développement de procédés plus efficaces et/ou plus durables pour la protection des cultures basée sur ce phénomène.

IX.1. Accumulation d'enzymes de défenses (PRs)

Les réponses des plantes à l'attaque par des micro-organismes sont complexes, et comportent l'induction de l'expression d'un grand nombre de gènes codant pour des protéines diverses, dont beaucoup peuvent avoir un rôle dans la défense. Comme il est mentionné plus haut, la SAR est caractérisée par l'accumulation de SA et de protéines PR qui servent de marqueurs du phénomène (Sarosh *et al.* 2005). Ces protéines PR sont actuellement classées en 17 groupes selon leurs propriétés biochimiques et moléculaires et sont définies comme protéines codées par la plante hôte, mais induites spécifiquement dans des situations pathologiques ou relatives. Elles ne s'accumulent pas seulement localement dans le secteur infecté mais sont également induites systémiquement (Van Loon et Van Strien 1999). L'induction de la SAR a ainsi été associée avec l'augmentation d'enzymes hydrolytiques telles que β -1,3-glucanases (PR-2) et chitinases (PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11) qui sont capables de détériorer les parois de cellules fongiques ou bactériennes (Andreu *et al.* 2006; Chandrashekar et Satyanarayana 2006).

L'ISR n'est par contre généralement pas associée avec les protéines PR (Pieterse *et al.* 1996; Pieterse *et al.* 1998). Cependant, comme mentionné plus haut, certaines rhizobactéries non-pathogènes peuvent parfois induire une réponse de défense de type SAR associée à l'accumulation d'enzymes hydrolytiques (Maurhofer *et al.* 1998; Timmusk et Wagner 1999; Ramamoorthy *et al.* 2001) (Tableau I.4). Par exemple, le traitement des graines de pois par *P. fluorescens* 63-28 a induit la production d'enzymes hydrolytiques telles que chitinases et β -1,3-glucanases. Ces enzymes hydrolytiques s'accumulent au site de pénétration de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* et par conséquent, elles peuvent être directement impliquées dans la dégradation des parois cellulaires fongiques (Benhamou *et al.* 1996). Dans d'autres exemples, l'ISR induite par la souche *P. fluorescens* Pf1 chez le riz et le thé a été associée avec l'accumulation de certaines enzymes de défense telles que la peroxidase, la polyphenol oxidase, la chitinase et la β -1,3-glucanases qui peuvent inhiber la croissance des champignons pathogènes (Nandakumar *et al.* 2001; Saravanakumar *et al.* 2007).

Tableau I.4. Les mécanismes de défense associés avec l'ISR dans différents pathosystèmes.

genre	plante hôte/pathogène	signal	Mécanismes de défense	Référence
Gram-négatives				
<i>P. fluorescens</i> 89-B-61	Tomate/ <i>Ph. infestans</i>		?	(Yan <i>et al.</i> 2002)
	<i>Arabidopsis</i> / <i>P. syringae</i>		?	(Ryu <i>et al.</i> 2003)
<i>P. fluorescens</i> 63-28	Concombre/ <i>C. orbiculare</i>	?	Calose, composés phénoliques	(Jeun <i>et al.</i> 2004)
	Concombre/ <i>Py. aphan.</i>	?	Peroxydase, lignifications	(Chen 1999; Chen <i>et al.</i> 2000)
	Pois/ <i>Py. aphan.</i>	?	Callose, lignification	(Duijff <i>et al.</i> 1997)
<i>P. fluorescens</i> CHAO	Pois/ <i>F. oxysporum</i>	?	Chitinase, β -1,3-glucanase	(Benhamou <i>et al.</i> 1996)
	<i>Arabidopsis</i> / <i>P. parasitica</i>		?	(Iavicoli <i>et al.</i> 2003)
	Tabac/TNV	SA/PR	SA, PR protéines	(Maurhofer <i>et al.</i> 1994; Maurhofer <i>et al.</i> 1998)
<i>P. fluorescens</i> PF1	Riz/ <i>Rhizoctonia solani</i>	?	Chitinase, peroxydase	(Nandakumar <i>et al.</i> 2001)
	Thé/ <i>Exobasidium vexans</i>	?	Chitinase, PAL peroxydase,	(Saravanakumar <i>et al.</i> 2007)
<i>P. fluorescens</i> WCS417r	Oeillet/ <i>F. oxysporum</i>	?	Phytoalexine, composition parois	(Van Peer <i>et al.</i> 1991; Van Peer et Schippers 1992)
	<i>Arabidopsis</i> / <i>F. oxysporum</i>		?	(Pieterse <i>et al.</i> 1996)
<i>P. putida</i> BTP1	<i>Arabidopsis</i> / <i>P. syringae</i>	JA-ET	?	(Pieterse <i>et al.</i> 1998; Ton <i>et al.</i> 2002a; Hase <i>et al.</i> 2003)
	Concombre/ <i>Py. aphan.</i>	?	Phytoalexine	(Ongena <i>et al.</i> 1999; Ongena <i>et al.</i> 2000)
<i>P. aeruginosa</i> 7NSK2	Haricot/ <i>Botrytis cinerea</i>	SA-ind	LOX, HPL, Oxilipin	(Ongena <i>et al.</i> 2004)
	Haricot/ <i>Botrytis cinerea</i>	SA/PR	SA, PAL	(De Meyer et Höfte 1997; De Meyer <i>et al.</i> 1999b)
<i>S. marcescens</i> 90-166	Tabac/TNV	SA/PR	SA	(De Meyer <i>et al.</i> 1999a)
	<i>Arabidopsis</i> / <i>P. syringae</i>	JA-ET	?	(Ryu <i>et al.</i> 2003)
	Concombre/ <i>C. orbiculare</i>	?	Calose, composés phénoliques	(Jeun <i>et al.</i> 2004)
Gram-positives				
<i>B. subtilis</i> M4 (S499)	Concombre/ <i>C. lagenarium</i>	SA-ind	?	(Ongena <i>et al.</i> 2005a)
	Tomate/ <i>Py. aphan.</i>	SA-ind	?	(Ongena <i>et al.</i> 2005a)
<i>B. subtilis</i> GB03	<i>Arabidopsis</i> / <i>E. carotovora</i>	ET	?	(Ryu <i>et al.</i> 2004)

genre	plante hôte/pathogène	signal	Mécanismes de défense	Référence
<i>B. pumilus</i> SE34	Tabac/ <i>Per. tabacina</i>	SA-ind	?	(Zhang <i>et al.</i> 2002)
	<i>Arabidopsis</i> / <i>P. syringae</i>	JA-ET	?	(Ryu <i>et al.</i> 2003)
	Petit pois/ <i>F. oxysporum</i>	?	composition parois Callose, phénoliques	(Benhamou <i>et al.</i> 1996)
	Tomate/ <i>F. oxysporum</i>	?	dépôts polymorphiques	(Benhamou et Bélanger 1998)
	Tomate/ <i>Ph. infestans</i>	JA-ET	?	(Yan <i>et al.</i> 2002)
<i>B. cereus</i> B101R	Tomate/ <i>P. syringae</i>	?	LOX, peroxidase	(Silva <i>et al.</i> 2004)
<i>B. pumilus</i> T4	Tabac/ <i>P. syringae</i>	SA/PR	SA, PR protéines	(Park et Kloepper 2000)
	<i>Arabidopsis</i> / <i>P. syringae</i>	ET	?	(Ryu <i>et al.</i> 2003)
<i>B. pumilus</i> 203-6	Betterave/ <i>Cerc. beticola</i>	SA/PR	PR protéines	(Bargabus <i>et al.</i> 2004)
<i>B. amyl.</i> IN937	<i>Arabidopsis</i> / <i>E. carotovora</i>	JA-ET	?	(Ryu <i>et al.</i> 2004)
	Tabac/ mottle virus	SA/PR	PR protéines	(Ahn <i>et al.</i> 2002)
<i>B. amyl.</i> EXTN-1	Concombre/ <i>C. orbiculare</i>	?	Callose	(Jeun <i>et al.</i> 2001)
	<i>Arabidopsis</i> /mottle virus	SA/PR	PR protéines	(Ahn <i>et al.</i> 2002)
<i>B. thuringiensis</i> Berl.	Café/ <i>He. vastatrix</i>	SA/PR	PR protéines	(Guzzo et Martins 1996)
<i>B. mycoides</i> BacJ	Betterave/ <i>Cerc. beticola</i>	SA/PR	PR protéines	(Bargabus <i>et al.</i> 2002)
<i>Paen. polymyxa</i> B2	<i>Arabidopsis</i> / <i>E. carotovora</i>	JA-ET	?	(Timmusk et Wagner 1999)

IX.2. Renforcement de la paroi cellulaire

Dans la SAR, et plus précisément dans la réponse locale liée à la HR, il est devenu évident que la réponse de plantes à l'organisme pathogène ou à la blessure est corrélée avec les changements de la biochimie et de la physiologie de cellules qui sont accompagnés des modifications structurales comprenant l'épaississement de la paroi des cellules corticales, et le dépôt de barrières nouvellement formées comme la callose, la lignine ou des composés phénoliques aux sites de pénétration du pathogène (Benhamou et Nicole 1999; Zhao *et al.* 2005b; Zhao *et al.* 2005c; Soylu 2006).

Dans le cas de l'ISR également, certaines études ont démontré quelques mécanismes de défense qui sont étroitement liés à l'établissement des barrières chimiques ou physiques à l'entrée de pathogène. Ainsi, une grande quantité de callose et de composés phénoliques (lignification) sont rapidement accumulés au site d'infection chez les plantes traitées par des PGPR et dans certains pathosystèmes tels que

concombre/*Colletotrichum orbiculare* par traitement avec *Serratia marcescens* 90-166 (Jeun *et al.* 2004), tomate/*F. oxysporum* par traitement avec *B. subtilis* SE34 (Benhamou et Bélanger 1998) et pois/*Pythium ultimum* par traitement avec *Pseudomonas fluorescens* 63-28R (Duijff *et al.* 1997). Ces réactions rapides au niveau des sites d'infection vont donc retarder la propagation de l'infection et donner à la plante hôte le temps nécessaire pour mettre en place d'autres mécanismes de défense pour restreindre la croissance du pathogène (Tableau I.4).

IX.3. Accumulation de phytoalexines

L'accumulation de phytoalexines antimicrobiennes a été largement décrite dans le cas de la SAR chez beaucoup d'espèces végétales. Elles sont définies comme des composés antifongiques et/ou antibiotiques de faible poids moléculaire, synthétisés chez les plantes lors de stress biotiques ou abiotiques (Li et Ouyang 1990; Mansfield 2000; Soyly *et al.* 2002; Wang *et al.* 2005; Chandrashekar et Satyanarayana 2006). Ces composés s'accumulent dans les tissus de la plante à l'emplacement d'infection ou de pénétration d'un agent pathogène, permettant ainsi de réduire ou de stopper sa progression en désorganisant et en tuant ses cellules. Dans certains cas, la rapidité de l'accumulation des phytoalexines est associée avec la résistance de la plante face à la maladie causée par une bactérie ou un champignon (Kuc 1995a; Hammerschmidt 1999). On a observé qu'après le deuxième traitement (ou stimulation) les plantes résistantes produisent des phytoalexines plus rapidement en réponse à l'infection par le pathogène (McNally *et al.* 2003b).

Les phytoalexines appartiennent à des familles chimiques différentes selon les plantes, par exemple, des isoflavonoïdes chez les légumineuses, des sesquiterpènes chez les solanacées (Harborne 1999), des coumarines chez les Euphorbiacées (Giesemann *et al.* 1986) et des diterpènes chez les Ulmacées (Dumas *et al.* 1983) (Figure I.4). Généralement, on trouve les phytoalexines sous forme libre et active mais aussi sous forme de précurseurs, c'est à dire conjuguées à des sucres (aglycones FIII) (Higgins *et al.* 1995; Daayf *et al.* 1997; Daayf *et al.* 2000). Dans ce cas, l'activation consiste en une

déglycosylation catalysée par une enzyme qui peut provenir soit de la plante, soit du pathogène (Higgins *et al.* 1995; Morandi 1996).

Les différents types de phytoalexines produites sont donc fonction de l'activation de certaines enzymes appartenant à des voies métaboliques distinctes. Les études biochimiques examinant les plantes résistantes aux maladies ont indiqué dans certains cas des activités accrues pour les enzymes biosynthétiques principales impliquées dans la production des composés phénoliques comprenant la phénylalanine ammonia lyase (PAL) (Chen *et al.* 2000; Cools et Ishii 2002), la phénol- β -glucosidase (Politycka 1998), la chalcone synthase et la chalcone isomérase (Fofana *et al.* 2002).

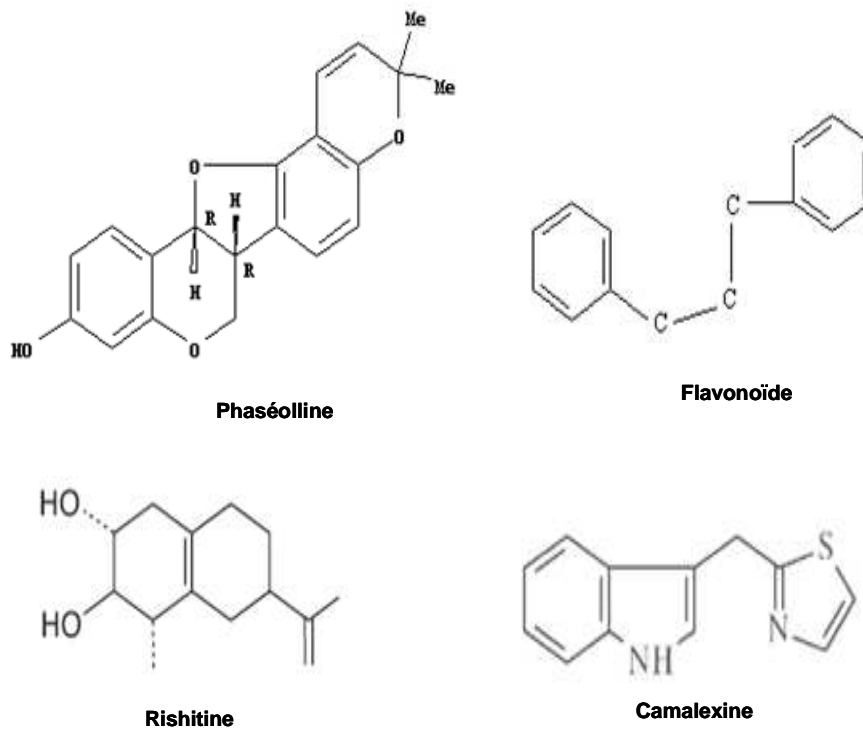


Figure I.4. Exemples de phytoalexines chez le concombre (flavonoïde), Arabidopsis (camalexine), haricot (phaséolline) et tomate (rishitine).

Par contre, dans le cas de l'ISR, l'accumulation de phytoalexines dans les plantes traitées par les PGPR en tant que mécanisme de défense est encore mal connue. Cependant, certains exemples d'accumulations de phytoalexines ou des enzymes hydrolytiques sont de temps en temps reportés dans différentes plantes (Van Peer *et al.*

1991; Ongena *et al.* 1999; Ongena *et al.* 2000; Nandakumar *et al.* 2001). Par exemple, le traitement des plants d'œillet avec *Pseudomonas* WCS417r a stimulé la synthèse de phytoalexines contre le flétrissement de *Fusarium oxysprum* (Van Peer *et al.* 1991). Dans une autre étude sur le concombre traité par *Pseudomonas putida* BTP1, on a observé l'accumulation de phytoalexines localement et systématiquement dans les plants, ces phytoalexines étaient sous forme glycosylée (Ongena *et al.* 1999; Ongena *et al.* 2000).

IX.4. Stimulation de la voie de la lipoxygénase (LOX)

La voie métabolique de la LOX est constituée d'une suite de réactions qui transforment des acides gras polyinsaturés en un large spectre de composés aux fonctions chimiques et biologiques diverses, regroupés sous le terme d'oxylipines (Figure I.6). Ces molécules peuvent être impliquées dans les stratégies de résistance (Feussner et Wasternack 2002; Baysal et Demirdoven 2007). Les lipoxygénases (LOX, EC 1.13.11.12) constituent une famille d'enzymes contenant les dioxygénases d'acides gras, qui sont omniprésentes chez les plantes et les animaux (Blée 2002). Les LOX catalysent l'incorporation de l'oxygène moléculaire dans les acides gras polyinsaturés (PUFAs) comme l'acide linoléique (LA) et l'acide α -linoléique (α -LeA). L'insertion de l'oxygène aux acides linoléique et linoléique est stéréo et régio-sélective, elle a lieu dans la position 9 ou 13 pour produire les 9- et 13-HPODE (acide hydroperoxy-octadécadiénoïque) et les 9- et 13-HPOTE (acide hydroperoxyoctadécatriénoïque) respectivement (Feussner et Wasternack 2002). Ces hydroperoxydes instables et toxiques sont ensuite transformés en molécules moins réactives (phyto-oxylipins) par plusieurs voies métaboliques bien caractérisées parmi lesquelles, (i) la voie de la peroxygénase (POX) menant à la conversion en dérivés époxy et hydroxy (fongitoxiques); (ii) l'allène oxyde synthase (AOS) menant à la production du jasmonate (impliqué dans la signalisation et la régulation de l'expression des gènes de défense chez les plantes) ; (iii) l'hydroperoxyde lyase (HPL) formant les aldéhydes à chaînes courtes (qui peuvent être des phytoalexines volatiles), et (iv) la divinyl éther synthase (DES) qui a été détectée seulement chez les *Solanaceae* (Feussner et Wasternack 2002; Shah 2005) (Figure I.5). Cette voie peut être stimulée sous différentes conditions de stress telles que des

dommages mécaniques (Diaz *et al.* 2003), en réponse au traitement avec le SA (Weichert *et al.* 1999), le méthyle jasmonate (Kohlmann *et al.* 1999) ou certains éliciteurs biotiques (Rusterucci *et al.* 1999) mais également après des interactions avec des organismes pathogènes (Montillet *et al.* 2002). Les lipoxygénases végétales peuvent être impliquées dans la croissance et le développement, la biosynthèse des molécules de contrôle telles que l'acide jasmonique (JA) et la traumatine, la biosynthèse des composés volatiles comme l'hexanal, l'hexénal, et l'hexenol impliqués dans l'attraction d'insecte, la défense et la réponse à la blessure ou au stress (Feussner et Wasternack 2002; La Camera *et al.* 2004; Shah 2005; Baysal et Demirdoven 2007).

Certaines études ont montré le rôle essentiel des lipoxygénases dans les stratégies de défense chez les plantes. Par exemple, la réduction de la maladie chez *Arabidopsis* a été associée à la production de molécules d'aldéhydes volatiles (C6) tels que (E)-2-hexenal et (Z)-3-hexenal (produits grâce à l'activité de la HPL) dans les plantes, suggérant que ces molécules ont mis en alerte les plantes pour stimuler des gènes de défense, la lignification et l'accumulation de composés fongitoxiques tels que la défensine1.2 (PDF1.2), PR3 (la chitinase B) et la camalexine (Kishimoto *et al.* 2006a; 2006b). On a également rapporté que l'exposition des plants de maïs aux composés volatils (C6) a amorcé les plantes pour répondre plus fortement et rapidement contre l'attaque par des insectes herbivores en augmentant la biosynthèse du JA et l'émission de composés volatiles (Engelberth *et al.* 2004).

D'autre part, il a été suggéré que la transmission du signal de l'ISR dépende de la stimulation de la voie de lipoxygénase dans la plante et surtout du JA produit par la voie des oxilipines (Shah 2005; Profotová *et al.* 2006; Wasternack *et al.* 2006). Par exemple, l'augmentation de l'activité de la LOX chez la tomate traité avec certains PGPR a été reliée à l'ISR contre l'agent pathogène *P. syringae* pv. *tomato* (Silva *et al.* 2004). On a aussi montré que l'ISR chez le haricot a été clairement associée à la stimulation de deux activités enzymatiques principales impliquées dans la voie de la LOX (la lipoxygénase et l'hydroperoxyde lyase) (Ongena *et al.* 2004) menant à la production d'aldéhydes volatiles (C6) (Blée 2002; Feussner et Wasternack 2002; Gomi *et al.* 2003).

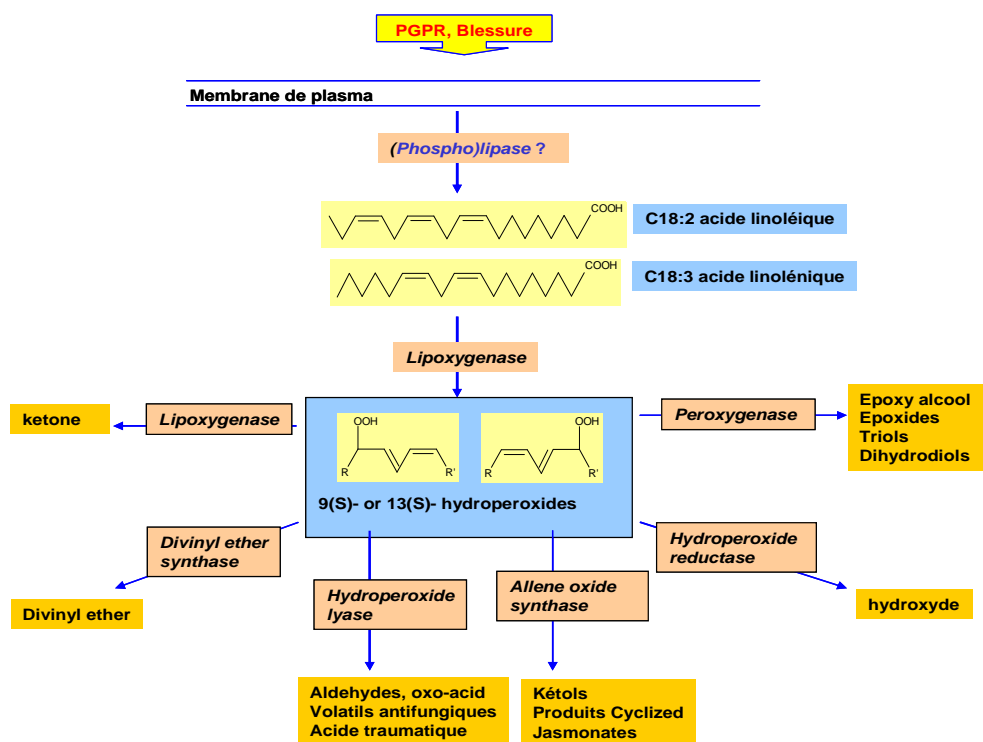


Figure I.5. La voie de la lipoxygénase : métabolisme oxydant des acides gras polyinsaturés dans les plantes par la lipoxygénase (LOX) produit des hydroperoxydes qui sont transformés avec certaines enzymes de la voie oxilipine en produits secondaires dont des volatiles antifongiques.

Il y a au moins cinq gènes de *LOX* chez la tomate, le *LoxA* et le *LoxB* (Ferrie *et al.* 1994), le *LoxC* et le *LoxD* (Heitz *et al.* 1997), et le *LoxE* (No. d'accession NCBI AY008278). *LoxA*, *LoxB*, et *LoxE* sont de 72% à 77% identiques au niveau de la séquence en acides aminés, alors que *LoxC* et *LoxD* ont une identité de 42% et de 47%, respectivement, par rapport à la protéine *LoxA*, et une identité entre eux de 46%. Différents isoformes de *LOX* sont différenciellement régulés et peuvent avoir des fonctions distinctes dans la maturation de fruits, dans les réactions de défense et la biosynthèse des composés aromatiques. *LoxA*, *LoxB* sont exprimés dans le péricarpe pendant le mûrissement du fruit. *LoxC* et *LoxD* contiennent un signal de localisation chloroplastique et sont importés dans des chloroplastes *in vitro* (Heitz *et al.* 1997). *LoxD* est exprimé à un niveau très bas au stade du fruit vert et au début de la maturation, tandis que *LoxC* est exprimé pendant la maturation (Heitz *et al.* 1997). L'expression de *LoxB* et de *LoxC* est augmentée par l'éthylène (l'hormone de la maturation), tandis que

l'expression de LoxA est diminuée (Griffiths *et al.* 1999). LoxC est un isoforme de lipoxygénase chloroplastique qui peut utiliser les acides linoléiques et linoléiques comme substrats pour produire des composés C6 aromatiques volatils (Chen *et al.* 2004).

IX.5. Le « priming » ou « mise en alerte » chez les plantes

Généralement dans la plante, les réponses de défense cellulaires impliquées dans la résistance induite peuvent ne pas être activées directement mais seulement mises en alerte pour augmenter leur expression lors de l'infection subséquente par un agent pathogène. Ce phénomène dénommé « priming » a été démontré dans différentes espèces de plantes dans le cadre de la résistance contre les pathogènes (la SAR et l'ISR), les insectes et les stress abiotiques (Conrath *et al.* 2002; Engelberth *et al.* 2004; Ton *et al.* 2006; Kishimoto *et al.* 2006a).

Dans la SAR chez *Arabidopsis*, on a trouvé que le traitement des plants avec le BTH active l'expression des gènes *PR-1*, mais l'induction de l'expression de la *PAL* n'a été visiblement que mise en alerte pour s'exprimer pleinement juste après l'infection par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) ou après une blessure (Conrath *et al.* 2001; Kohler *et al.* 2002). De même, chez *Arabidopsis* traité avec une souche avirulente de *P. syringae* pv. *tomato*, les plants ne sont qu'amorcés pour mieux exprimer la *PAL* et *PR-1* lors de l'infection par une souche virulente de la même espèce (Cameron 1999; Conrath *et al.* 2001).

Ce phénomène de mise en alerte des réponses de défense n'est pas seulement confiné à la SAR, mais il a également été démontré dans l'ISR stimulée par les PGPR. Ce phénomène a été rapporté pour la première fois chez l'œillet traité par *Pseudomonas fluorescens* WCS417r chez lequel l'accumulation de phytoalexines n'est exprimée qu'après l'infection par *Fusarium oxysprum* f. sp. *danthi* (Van Peer *et al.* 1991). De plus, on a démontré ce phénomène en utilisant des mutants dans des gènes principaux de l'ISR tels que *jar1-1* et *npr1-1* et étudié la capacité des plantes mutantes à convertir l'ACC en éthylène après traitement des racines d'*Arabidopsis* par *P. fluorescens* WCS417r. On a trouvé que cette bactérie a amorcé les plants pour produire plus d'éthylène juste après l'infection par le pathogène *P. syringae* pv. *tomato* (Hase *et al.* 2003). On a également

montré que l'expression des gènes de défense est induite localement dans les racines colonisées par la souche *P. fluorescens* WCS417r mais elle n'est amorcée systématiquement dans les tissus de feuille qu'après l'infection par un agent pathogène (Verhagen *et al.* 2004).

X. Les lipopeptides de *Bacillus subtilis*

Les lipopeptides excrétés par l'espèce bactérienne *Bacillus subtilis* peuvent être classés en trois familles : les surfactines, les iturines et les fengycines. Ces molécules renferment un cycle, composé de 7 ou 10 résidus d'acides α -aminés L ou D, relié à un acide gras β -hydroxylé ou β -aminé à longue chaîne carbonée. Pour chaque famille, on distingue des isoformes, se différenciant par la nature des acides aminés dans le cycle, et des homologues, qui varient suivant la longueur (de 13 à 18 atomes de C) et l'isomérisation (linéaire, iso ou antéiso) de la chaîne lipidique. Le tableau I.5 présente la structure primaire des différents lipopeptides de *Bacillus subtilis*.

Une des caractéristiques principale des lipopeptides de *Bacillus subtilis* réside dans leurs propriétés tensioactives. En raison de leur structure amphiphile caractérisée par une partie polaire chargée négativement et une chaîne hydrocarbonée hydrophobe, ces lipopeptides sont en effet susceptibles de diminuer la tension de surface, modifier et perturber les bicouches lipidiques (Deleu *et al.* 2003; Heerklotz et Seelig 2007). Malgré leurs structures globalement similaires et leurs propriétés détergentes, surfactines, iturines et fengycines présentent des activités biologiques et notamment antimicrobiennes différentes, pouvant s'expliquer par une action dépendant de la composition membranaire des cellules cibles.

Tableau I.5. Structures primaires des lipopeptides de *Bacillus subtilis*.

Lipopeptides	Structure générale																																										
<p>Surfactines</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="flex: 1;"> $\begin{array}{c} \text{CO} \rightarrow \text{L AA}_1 \rightarrow \text{L Leu} \rightarrow \text{D Leu} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{R}-\text{CH} \\ \\ \text{O} \leftarrow \text{L AA}_7 \leftarrow \text{D Leu} \leftarrow \text{L Asp} \end{array}$ <p style="text-align: center;">R=10 à 12 C</p> </div> <div style="flex: 2;"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;"></th> <th style="width: 15%;">AA₁</th> <th style="width: 15%;">AA₄</th> <th style="width: 15%;">AA₇</th> <th style="width: 40%;"></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>Glu</td> <td>Val</td> <td>Leu</td> <td>Surfactine standard ¹</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Glu</td> <td>Val</td> <td>Val</td> <td>[Val₇] surfactine ²</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Glu</td> <td>Val</td> <td>Ile</td> <td>[Ile₇] surfactine ³</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Glu</td> <td>Ala</td> <td>Leu</td> <td>[Ala₄] surfactine ⁴</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Gln</td> <td>Val</td> <td>Ile</td> <td>[Gln₁] surfactine ⁵</td> </tr> </tbody> </table> </div> </div>		AA ₁	AA ₄	AA ₇			Glu	Val	Leu	Surfactine standard ¹		Glu	Val	Val	[Val ₇] surfactine ²		Glu	Val	Ile	[Ile ₇] surfactine ³		Glu	Ala	Leu	[Ala ₄] surfactine ⁴		Gln	Val	Ile	[Gln ₁] surfactine ⁵												
	AA ₁	AA ₄	AA ₇																																								
	Glu	Val	Leu	Surfactine standard ¹																																							
	Glu	Val	Val	[Val ₇] surfactine ²																																							
	Glu	Val	Ile	[Ile ₇] surfactine ³																																							
	Glu	Ala	Leu	[Ala ₄] surfactine ⁴																																							
	Gln	Val	Ile	[Gln ₁] surfactine ⁵																																							
<p>Fengycines</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="flex: 1;"> $\begin{array}{c} \text{R} \rightarrow \text{L Glu} \rightarrow \text{D Orn} \rightarrow \text{L Tyr} \rightarrow \text{D Allo Thr} \rightarrow \text{L Glu} \rightarrow \text{D AA}_6 \\ \\ \text{O} \leftarrow \text{L Ile} \leftarrow \text{D Tyr} \leftarrow \text{L Gln} \leftarrow \text{L Pro} \end{array}$ <p style="text-align: center;">R=15 à 18 C</p> </div> <div style="flex: 2;"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;"></th> <th style="width: 15%;">AA₆</th> <th style="width: 70%;"></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>Ala</td> <td>Fengycine A ^{8,9}</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Val</td> <td>Fengycine B ^{8,9}</td> </tr> </tbody> </table> </div> </div>		AA ₆			Ala	Fengycine A ^{8,9}		Val	Fengycine B ^{8,9}																																	
	AA ₆																																										
	Ala	Fengycine A ^{8,9}																																									
	Val	Fengycine B ^{8,9}																																									
<p>Iturines</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="flex: 1;"> $\begin{array}{c} \text{CO} \rightarrow \text{L AA}_1 \rightarrow \text{D Tyr} \rightarrow \text{D Asn} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{R}-\text{CH} \\ \\ \text{NH} \leftarrow \text{L AA}_7 \leftarrow \text{D AA}_6 \leftarrow \text{L AA}_5 \end{array}$ <p style="text-align: center;">R=11 à 14 C</p> </div> <div style="flex: 2;"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">AA₁</th> <th style="width: 10%;">AA₄</th> <th style="width: 10%;">AA₅</th> <th style="width: 10%;">AA₆</th> <th style="width: 10%;">AA₇</th> <th style="width: 40%;"></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>Asn</td> <td>Gln</td> <td>Pro</td> <td>Asn</td> <td>Ser</td> <td>Iturine A</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Asn</td> <td>Gln</td> <td>Pro</td> <td>Ser</td> <td>Asn</td> <td>Mycosubtiline</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Asn</td> <td>Pro</td> <td>Glu</td> <td>Ser</td> <td>Thr</td> <td>Bacillomycine D</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Asn</td> <td>Gln</td> <td>Pro</td> <td>Asn</td> <td>Thr</td> <td>Bacillomycine F</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Asp</td> <td>Ser</td> <td>Gln</td> <td>Ser</td> <td>Thr</td> <td>Bacillomycine L</td> </tr> </tbody> </table> </div> </div>		AA ₁	AA ₄	AA ₅	AA ₆	AA ₇			Asn	Gln	Pro	Asn	Ser	Iturine A		Asn	Gln	Pro	Ser	Asn	Mycosubtiline		Asn	Pro	Glu	Ser	Thr	Bacillomycine D		Asn	Gln	Pro	Asn	Thr	Bacillomycine F		Asp	Ser	Gln	Ser	Thr	Bacillomycine L
	AA ₁	AA ₄	AA ₅	AA ₆	AA ₇																																						
	Asn	Gln	Pro	Asn	Ser	Iturine A																																					
	Asn	Gln	Pro	Ser	Asn	Mycosubtiline																																					
	Asn	Pro	Glu	Ser	Thr	Bacillomycine D																																					
	Asn	Gln	Pro	Asn	Thr	Bacillomycine F																																					
	Asp	Ser	Gln	Ser	Thr	Bacillomycine L																																					

Chapitre II
BUT DU TRAVAIL

Chapitre II

But du travail

L'étude à l'échelle moléculaire des phénomènes régissant l'induction de la résistance dans les plantes par les PGPR suscite un intérêt croissant. L'ISR est en effet de plus en plus perçue comme un mécanisme prometteur dans le contexte du contrôle biologique. Or, beaucoup de choses restent à découvrir, à la fois sur les mécanismes de défense induits dans la plante par les PGPR mais également concernant la nature des déterminants microbiens responsables de l'élicitation de ce phénomène. Ce travail s'inscrit dans le cadre de la caractérisation des mécanismes de défense induits chez la tomate et le concombre par des PGPR.

Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire sur deux souches bactériennes *Pseudomonas putida* BTP1 et *Bacillus subtilis* S499 ont montré la capacité de ces bactéries à stimuler l'ISR dans différents pathosystèmes (Ongena *et al.* 2000; Ongena *et al.* 2002a; Ongena *et al.* 2004; Ongena *et al.* 2005b). Le premier objectif de ce travail est de tester cet effet protecteur de *P. putida* BTP1 via l'induction de résistance dans d'autres pathosystèmes, tomate/*Botrytis cinerea* et concombre/*Colletotrichum lagenarium*. Dans le cas de *Bacillus subtilis*, l'objectif était également d'utiliser différentes souches et mutants pour mieux comprendre le rôle des lipopeptides produits par cette espèce dans le contrôle biologique en général et dans l'induction de la résistance en particulier.

D'autre part, ces études antérieures ont également montré que le traitement des plants avec ces bactéries était associé au développement de certaines réponses défensives dans les tissus des plantes hôtes (Ongena *et al.* 1999; Ongena *et al.* 2000; Ongena *et al.* 2004; Ongena *et al.* 2005a).

Le deuxième objectif vise donc à approfondir notre connaissance sur les mécanismes de défense induits par ces souches en étudiant les réponses chez la tomate et le concombre infecté par *Botrytis* et *Colletotrichum* respectivement sur base des résultats obtenus précédemment. Nous nous focalisons sur la recherche de phytoalexines et sur la possible induction de la voie de la lipoxygénase. Pour ce faire, notre stratégie est de combiner une approche (bio)chimique de détection/identification de(s) molécule(s) antifongique(s) accumulée(s) dans les tissus végétaux avec une approche « moléculaire » de l'étude de l'expression différentielle des gènes impliqués dans la voie de la LOX chez les plantes induites.

Chapitre III
MATERIEL ET METHODES

Chapitre III

Matériel et Méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Les végétaux utilisés pour les tests d'infection sont

- la tomate *Lycopersicon esculentum* L. cv Merveille des Marchés, de la famille des Solanacées.
- le concombre *Cucumis sativus* cultivar Raider

I.2. Souches bactériennes

I.2.1. *Pseudomonas putida* BTP1

Une des souches bactériennes de PGPR utilisée est une espèce fluorescente du genre *Pseudomonas*. Cette souche, *Pseudomonas putida* BTP1, a été isolée de racines d'orge et sélectionnée à l'origine pour la production de pyoverdines. Pour une utilisation régulière, cet isolat est repiqué tous les 7 jours sur boîte de pétri contenant un milieu gélosé de casamino acides « CAA » (composition au paragraphe I.4.2.), incubé dans une chambre à 30°C pendant 24 heures puis stocké à 4°C. Pour une utilisation à plus long terme, la bactérie est maintenue sur microbilles (Microbank de marque Pro-lab Diagnostic) à -80°C.

I.2.2. *Bacillus subtilis* 168 et ses dérivés

Les souches de *Bacillus subtilis* (WT ou 168, BC21, BC25 et BC27) testées dans notre travail ont été fournies par le Centre d'Ingénierie des protéines de l'Université de Liège. Le séquençage et l'annotation du génome de *Bacillus subtilis* 168 a indiqué que la bactérie a conservé des gènes fonctionnels *srfA* et *fen* responsables de la biosynthèse des surfactines et des fengycines respectivement (Kunst *et al.* 1997; Kobayashi *et al.* 2003). Cependant, à cause d'une modification dans le gène *sfp* codant pour une enzyme essentielles à la biosynthèse de type thiotemplate, le taux de production de ces deux lipopeptides par *B. subtilis* 168 est très faible (Tsuge *et al.* 1996). Dans cette étude, nous avons testé trois mutants construits pour surproduire un ou deux types de lipopeptide. Le premier dérivé, BC21, produit des niveaux plus élevés de surfactine mais les quantités de fengycine sont toujours très basses (Tableau 1). Ce mutant a été obtenu par insertion dans le gène *AmyE* du gène *sfp* fonctionnel de *B. subtilis* S499, une souche naturellement bonne productrice de lipopeptides. Le deuxième dérivé BC25 a été obtenu en remplaçant le promoteur faible de la fengycine (*pFen*) par le promoteur fort de S499. La souche, BC25, surproduit donc aussi bien la surfactine que la fengycine (Brans *et al.* 2004). Le troisième dérivé testé dans cette étude, BC27, a été obtenu à partir de BC25 par la suppression de l'expression de l'opéron de la surfactine par double mutation dans *srfAB* et *srfAD*. Cette souche produit donc seulement la fengycine en quantités semblables à BC25 (Tableau 1).

I.2.3. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et BBG100

La souche *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et son mutant BBG100 ont été fournis par le laboratoire des bioprocédés microbiens, Université des sciences et technologie de Lille, France. Le mutant BBG100 a été produit en remplaçant le promoteur original P_{myc} de la souche ATCC6633 (codant pour la mycosubtiline et des autres lipopeptides mais en faibles quantités) par une cassette $P_{repU-neo}$ pour surproduire la mycosubtiline (Leclère *et al.* 2005).

Toutes les souche de *Bacillus subtilis* utilisées sont repiquées toutes les semaines sur milieu gélosé 863 dans une boîte de pétri (composition en section I.4.2) pour une utilisation régulière, incubées à 30°C pendant 48 heures et conservées à 4°C. Pour une conservation plus longue, elles sont maintenues à -80°C sur microbilles comme pour BTP1.

Tableau 1. Quantités de lipopeptides produits par *B. subtilis* 168 et ses dérivés après croissance dans le milieu optimal pendant 72 h.

Souche	Surfactine mg/L	Fengycine mg/L
168	t	t
BC21	750	t
BC25	697	434
BC27	t	452

I.2.4. *Escherichia coli*

La souche *E. coli* DH10B a été utilisée pour l'amplification et la conservation des vecteurs plasmidiens. Son génotype est : F⁻, araD139 Δ (ara, leu) 7697, Δ lacX74, galU, galK, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), rpsL, dor, ϕ 80dlacZ Δ M15, endA1, nupG, recA1. La culture d'*E. coli* s'effectue à 37°C, en un milieu LB, en présence, lorsqu'ils sont requis, des antibiotiques appropriés. Les cultures liquides sont incubées sous agitation orbitale (200 rpm), tandis que les milieux gélosés sont étuvés 24h. Les souches d'*E. coli* sont conservées à -70°C dans un mélange LB : glycérol (85 : 15 v/v).

I.2.5. Vecteur plasmidien

Le plasmide pGEMT-Easy est un vecteur commercial (Promega, Leiden, Pays Bas) de 3kb destiné au clonage des produits de PCR amplifiés à l'aide de la *Taq* DNA polymérase. Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r), une origine de réplication (ori), une partie du gène *lacZ* codant pour l' α -peptide de la β -galactosidase et un site de clonage multiple inséré dans la partie N-terminale du gène *lacZ*.

I.3. Champignons pathogènes

I.3.1. *Botrytis cinerea*

Le champignon phytopathogène utilisé pour infecter la tomate est la souche R16 de *Botrytis cinerea*, agent de la « pourriture grise ». Il possède un large spectre d'action et infecte les feuilles et les fruits de nombreuses plantes. On le conserve à l'obscurité à température ambiante sur boîte de pétri contenant un milieu gélosé à base de farine d'avoine ou sur milieu PDA (composition des deux milieux en section I.4.2). Sept jours après son repiquage, il est exposé pendant sept jours à une faible irradiation continue par les UV pour favoriser sa sporulation. Pour une conservation à plus long terme, les spores sont mises en suspension dans un mélange eau/glycérol (1 : 1, V/V) et stockées à -80°C.

I.3.2. *Colletotrichum lagenarium*

Le champignon phytopathogène utilisé pour infecter le concombre est *Colletotrichum lagenarium*. Il est conservé à l'obscurité à température ambiante sur boîte de pétri contenant un milieu gélosé PDA afin de stimuler sa sporulation.

I.3.3. *Cladosporium cucumerinum*

Le champignon utilisé pour réaliser des tests de toxicité sur TLC (section II.2.4) est *Cladosporium cucumerinum*. Il est conservé à l'obscurité à température ambiante sur milieu gélosé PDA afin de stimuler sa sporulation.

I.3.4. *Pythium aphanidermatum*

Le champignon phytopathogène utilisé pour infecter la tomate dans les expériences de fonte des semis est *Pythium aphanidermatum*. Il est cultivé à l'obscurité pendant cinq jours à 30°C sur boîte de pétri contenant le milieu gélosé de PDA. Le champignon est conservé à long terme en mélangeant le mycélium à du terreau stérile et en congelant à -20°C.

I.4. Milieux de cultures

Pour toutes les manipulations, l'eau utilisée est de l'eau de qualité milli-ro.

Tous les milieux sont autoclavés 20 minutes à 121°C.

La composition des milieux est donnée par litre d'eau distillée.

I.4.1. Milieux liquides

Le milieu CAA (Casamino acides) se compose de 5 g de CAA, 0,9 g de K_2HPO_4 et 0,25 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Le milieu Landy se compose de 20 g de glucose, 5 g d'acide glutamique, 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g de KCl, 1 g de K_2HPO_4 , 1 g d'extrait de levure, 0,4 mg de $Mn(SO_4)_3$, 1,2 mg de $Fe(SO_4)_3$ et 1,6 mg de $CuSO_4$. Le pH est ajusté à 7,0, ensuite le milieu est réparti dans des fioles, avec un rapport (volume de culture/volume de fiole) entre 0,1 et 0,2 avant de stériliser.

Le milieu LB (Luria-Bertani) se compose de 10 g de bactotryptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl. Le pH est ajusté à 7,0 à l'aide de NaOH. L'antibiotique (Ampicilline) est ajouté à une concentration finale de 50-100 $\mu g/ml$ de culture après l'autoclavage.

Milieu (SOB) se compose de 20 g de bactotryptone, 5 g d'extrait de levure, 10 mM de NaCl et 2,5 mM KCl.

Milieu (SOC) se compose du même milieu SOB en ajoutant 20 mM de glucose, 20 mM de Mg^{+2} (10 mM $MgSO_4$ + 10 mM $MgCl_2$).

I.4.2. Milieux solides

Les milieux CAA et LB ont les mêmes compositions de base que les milieux liquides et sont additionnés, avant autoclavage, de 15 g d'agar.

Le milieu 863 se compose de 10 g de peptone de caséine, 10 g de extrait de levure, 10 g de glucose et 15 g d'agar.

Le milieu PDA se compose de 39 g de Peptone Dextrose Agar composé de 4 g d'infusat de pomme de terre, 20 g de glucose et 15 g d'agar.

Le milieu avoine se compose de 25 g de farine d'avoine et 15 d'agar. Les 25 grammes de farine d'avoine sont dissous dans 500 millilitres d'eau que l'on fait bouillir pendant 30 minutes. Une fois le mélange refroidi, celui-ci est filtré sur gaze et on ajuste le filtrat à 1 litre avec de l'eau distillée, puis on ajoute l'agar avant de stériliser.

I.5. Solutions

I.5.1. Solutions nutritives

I.5.1.1. Pour la tomate

Solution n°1 se compose de 129,8 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 16 g de NH_4NO_3 , 87 g de KNO_3 , 49,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 34 g de KH_2PO_4 , 22 g de HNO_3 et 10,4 g de H_2SO_4 .

Solution n°2 se compose de 6,45g de Fe-EDTA (13%), 1,69 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,15 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,9 g de Borax, 0,12 g de $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et 0,18 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

La solution nutritive pour les plants de tomates est obtenue en mélangeant 100 ml de la solution n°1 à 20 ml de la solution n°2 dans 20 litres d'eau déminéralisée.

I.5.1.2. Pour le concombre

Solution n°1 se compose de 95 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 61 g de KNO_3 et 49 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Solution n°2 se compose de 33,2 g de $\text{CHN}_2\text{Na}_2\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 g de NaOH, 2,7 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 g de H_3BO_3 , 0,4 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 0,025 g de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

La solution nutritive pour plants de concombres est obtenue en mélangeant 50 ml de la solution n°1 à 10 ml de la solution n°2 dans 20 litres d'eau déminéralisée.

I.5.2. Solution d'infection

I.5.2.1. Solution de récupération des spores (SRS)

La solution SRS se compose de 5 gouttes de Tween 80 et un litre de l'eau péptonée (1 g de Peptone et 5 g de NaCl).

I.5.2.2. Solution pour l'infection (SUC)

Pour le concombre, elle se compose de 0.4% de glucose et 0.013 M de KH_2PO_4 ; et pour la tomate, se compose de 0.01 M glucose et 6.7 mM de KH_2PO_4

II. Méthodes

II.1. Expérience de fonte des semis sur la tomate

Les graines qui donneront les plants témoins positifs (sans bactérisation et sans infection par le pathogène) ou négatif (sans bactérisation mais avec infection) sont trempées dans 30 millilitres d'une solution de $MgSO_4$ 0,01M stérile pendant 10 minutes. Celles qui donneront les plants traités baignent dans 30 ml de suspension bactérienne (dans une solution de $MgSO_4$ 0,01M) à 10^8 cellules/ml pendant 10 minutes.

Les cellules de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et de son mutant BBG100 utilisées pour l'inoculation sont obtenues suite à une culture dans le milieu Landy et incubées à 30°C pendant 48h. les milieux de cultures sont centrifugés à 8000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est récupéré avec une solution de $MgSO_4$ 0,01M stérile. La concentration est déterminée, après dilution appropriée, par lecture de densité optique à 540 nm en sachant qu'une densité optique de 1 correspond à une concentration de $4,5 \times 10^8$ cellules/ml.

Après stérilisation 20 minutes à 121°C, le terreau (BRIL, norme NF 44 551) utilisé pour les plants témoins positifs est humidifié avec une solution stérile de $MgSO_4$ 0,01M soit 1 litre pour 3 kg de terreau. Le terreau pour les plants témoins négatifs ou pour les plants traités par les bactéries est infecté par une suspension de débris de mycélium du pathogène préparée à partir de *P. aphanidermatum* cultivé sur milieu PDA (composition en section I.4.2.) à raison du contenu d'une boîte de pétri pour 500g de terreau passée au moulin à café pendant une minute. Ensuite ils sont mis en suspension avec une solution stérile de $MgSO_4$ 0,01M.

Les graines sont semées dans des plateaux de polystyrène désinfectés (200 graines/ plateau de 30 x 50 cm par traitement), recouvertes de terreau tamisé stérile, et disposés sur des feutres stériles dans des bacs de polystyrène désinfectés. Ces bacs sont ensuite placés dans une chambre de croissance à 27°C avec une photopériode longue soit 16 heures de lumière par jour.

Les plants sont maintenus humides par arrosage quotidien par le feutre avec de l'eau déminéralisée stérile, ou avec de la solution nutritive. Cette méthode d'arrosage par capillarité est préférée à un arrosage classique afin d'éviter un lessivage des bactéries ou pathogènes inoculées au niveau des graines et du terreau.

II.2. Expérience d'induction de résistance *in vivo* chez les plants de tomate et de concombre

II.2.1. Culture en terreau des tomates et des concombres

II.2.1.1. Traitement des graines et semis

Les graines qui donneront les plants témoins sont trempées dans 30 millilitres d'une solution de MgSO_4 0,01M stérile pendant 10 minutes. Celles qui donneront les plants traités baignent dans 30 ml de suspension bactérienne (dans une solution de MgSO_4 0,01M) à 10^8 cellules/ml pendant 10 minutes.

Les cellules de la souche BTP1 utilisées pour l'inoculation sont obtenues suite à une culture dans le milieu CAA liquide et incubée à 30°C pendant 24 heures. La souche BC25 est inoculée dans un milieu Landy et incubée à 30°C pendant 48h. La concentration est déterminée, après dilution appropriée, par lecture de densité optique à 540 nm en sachant qu'une densité optique de 1 correspond à une concentration de 4×10^8 cellules/ml pour BTP1 et $4,5 \times 10^8$ cellules/ml pour BC25.

Après stérilisation 20 minutes à 121°C, le terreau est humidifié avec une solution stérile de MgSO_4 0,01M soit 1 litre pour 3 kg de terreau pour les plants témoins et avec une suspension bactérienne à 3×10^7 cellules/ml pour les plants traités par BTP1 ou BC25, on obtient donc une concentration bactérienne finale de 1×10^7 cellules/g de terreau. Les graines sont semées dans des pots individuels (une graine/pot de 8 cm pour le concombre et 4 graines/pot de 10 cm pour la tomate), recouvertes de terreau tamisé stérile. Les pots sont disposés sur des feutres stériles dans des plateaux de polystyrène désinfectés. Ces plateaux sont ensuite placés dans une chambre de croissance à 27°C avec une photopériode longue soit 16 heures de lumière par jour.

II.2.1.2. Arrosage et rappel bactérien

Les plants sont maintenus humides par arrosage quotidien par le feutre avec de l'eau déminéralisée stérile, ou avec de la solution nutritive.

Six jours (pour le concombre) ou 14 et 28 jours (pour la tomate) après le semis, on procède à un rappel bactérien sur les plants traités par BTP1 ou BC25, chaque pot est arrosé avec 15 millilitres pour le concombre et 20 ml pour la tomate, d'une suspension bactérienne à 1×10^8 cellules/ml obtenue d'une culture en liquide de milieu CAA. Les plants témoins sont arrosés par une solution MgSO_4 0.01M. Le rappel se fait à la base des tiges afin d'éviter un contact direct des bactéries avec les feuilles ou les cotylédons où sera inoculé le champignon pathogène.

II.2.2. Infection des plants

II.2.2.1. Préparation de la suspension de spores

10 millilitres de la solution de SRS (composition dans la section I.5.2.1) stérile sont versés sur une boîte de *Botrytis* âgée d'environ 15 jours. Le mycélium et les spores sont mis en suspension en grattant avec une anse de platine stérile ; la solution ainsi obtenue est filtrée sur de la gaze stérile afin d'éliminer le mycélium.

Après une dilution appropriée, la concentration en spores du filtrat est déterminée à l'aide d'une cellule de Bürker. Le filtrat est réparti dans des eppendorfs puis centrifugé 10 minutes à 13000 rpm (centrifugeuse Heraeus sepatech de type BIOFUGE A). Le surnageant est éliminé et les spores sont reprises dans un volume de solution SUC (voir la section I.5.2.2) tomate nécessaire pour obtenir une concentration finale de 1×10^5 spores/ml pour infecter la tomate.

La méthode est pratiquement identique s'agissant de *Colletotrichum* : les spores sont récupérées par raclage au râteau stérile, la solution obtenue n'est pas filtrée et la concentration finale voulue est de 2.5×10^7 spores/ml pour infecter le concombre.

II.2.2.2. Infection du concombre

L'infection a lieu sur des plants âgés de 10 jours. 24 heures avant l'infection, les plants sont transférés dans une serre saturée en humidité à 28°C.

L'infection du concombre se pratique sur les cotylédons à raison de 6 gouttes de 7 microlitres par cotylédon. Une précaution supplémentaire est à prendre : après infection les plants sont placés 16 heures à l'obscurité.

II.2.2.3. Infection de la tomate

Les plantes sont transférées 24 heures avant l'infection dans une serre à 21°C saturée en humidité. La troisième vraie feuille est coupée et la tige est entourée par un papier absorbant puis les feuilles sont placées sur une grille dans des bacs de polystyrène contenant un fond d'eau de manière à ce que l'eau atteigne la tige par capillarité via le papier absorbant. Les bacs sont couverts avec des plaques en PVC transparentes pour permettre l'obtention des conditions d'humidité. L'infection de la tomate se pratique sur la 3^{ème} vraie feuille à raison de 10 gouttes de 5 µl par feuille.

II.2.3. Evaluation de la maladie

L'infection est quantifiée en dénombrant les lésions s'étendant de manière significativement plus large que la surface correspondant à la goutte de dépôt par rapport au nombre total de sites d'infection. Les pourcentages d'infection sont observés 1 à 4 jours après l'infection de la tomate par *Botrytis* ou 7 à 10 jours après l'infection du concombre par *Colletotrichum*. Lors de la comparaison des différents traitements, on utilise le degré d'infection des plants témoins (variant entre 65 et 90 % selon les expériences) comme référence, soit 100% d'infection.

II.2.3.1. Récupération du matériel végétal

Le matériel végétal, c'est-à-dire les feuilles saines et les feuilles infectées de plants témoins et de plants traités, est récolté avant et différents temps après infection en

vue d'être analysé. Aussitôt après avoir été prélevées, les feuilles sont gelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C . Les feuilles sont ensuite broyées dans un mortier refroidi à l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine à l'aide d'un mortier et d'un pilon.

II.3. Recherche de phytoalexines

II.3.1. Extraction au méthanol

10 millilitres de méthanol 80% sont ajoutés à 1 g de poudre végétale, le mélange est incubé en agitant pendant 20 heures à température ambiante et à l'ombre. Puis le mélange est filtré sur papier Whatmann n° 1. Le filtre est récupéré et conservé à 4°C . Une seconde extraction avec 10 ml de méthanol pur est effectuée sur les tissus pendant 4 h. Les deux filtrats obtenus sont rassemblés et séchés au rotavapor. Le résidu sec est repris dans 2 ml de MeOH pur auxquels sont ajoutés 2 ml d'eau.

II.3.2. Extraction liquide-liquide

Sur cet échantillon obtenu après extraction au méthanol, on procède à une extraction à l'hexane pour éliminer les molécules très apolaires non désirées : un volume d'hexane égal au volume de l'échantillon (soit 4 ml) est ajouté à celui-ci. Le mélange est agité plusieurs fois énergiquement puis décanté. La phase hexane est récupérée et une deuxième et troisième extraction avec 4 ml d'hexane sont effectuées sur la phase aqueuse. De la même manière, une autre extraction est effectuée avec l'éther diéthylique pour extraire les phytoalexines libres.

Une hydrolyse acide sur la phase aqueuse permet de libérer les phytoalexines qui pourraient se trouver sous forme conjuguée. Pour cela, un volume équivalant d'acide chlorhydrique 4N (soit 4 ml) est ajouté et le mélange est placé une heure et demie au bain-marie à 100°C . Après refroidissement, une nouvelle extraction avec l'éther diéthylique est procédée comme décrit ci-dessus.

Les différents extraits obtenus sont séchés au Speed-Vac et les résidus sont repris dans 1 ml de méthanol pur.

II.3.3. Analyse HPLC des extraits méthanoliques

Les échantillons hydrolysés et non hydrolysés ainsi obtenus sont analysés selon une méthode HPLC appropriée aux analyses de composés phénoliques.

Avant leur injection dans l'HPLC, les échantillons sont centrifugés 10 minutes. 20 µl de ces échantillons sont injectés sur une colonne analytique (de type Lichrospher®. C-18.5.µm.250*4mm.de marque Merck) placée sur un appareillage Hewlett Packard série 1100, équipé d'un injecteur automatique.

Deux solvants sont utilisés : - solvant A (équilibre) : eau milliQ + acide acétique 0,1%

- solvant B (élution) : acetonitrile

L'analyse se fait à température ambiante avec le programme d'élution suivant :

Temps (min)	% A	% B	Débit (ml/min)
0	95	5	0,25
2	95	5	0,25
2.5	95	5	1
5	95	5	1
15	70	30	1
25	60	40	1
40	55	45	1
50	40	60	1
60	35	65	1
65	5	95	1
75	5	95	1
76	95	5	1
83	95	5	1

Les composés élués de la colonne sont détectés grâce à un détecteur à barrettes de diodes avec balayage de l'absorbance entre 200 et 500 nm.

L'appareillage HPLC, l'acquisition et le traitement des données sont gérés par le logiciel Chemstation (AGILENT TECHNOLOGIES).

II.3.4. Biotests de toxicité sur plaque TLC

Les phytoalexines possèdent des propriétés antifongiques. Les extraits méthanoliques hydrolysés ou non vont donc être testés contre *Cladosporium*

cucumerinum afin de détecter une éventuelle fongitoxicité et donc une présence de phytoalexines. 50 µl de chaque échantillon sont déposés à 1,5 cm du bas d'une feuille d'aluminium de TLC (de type Gel de silice 60F₂₅₄ et de marque Merck) préalablement séchée dans un four. La plaque de TLC est mise dans un cuve de migration contenant un fond du mélange des solvants le tampon de : dichlorométhane : hexane : méthanol dans la proportion 6 : 4 : 1 (v/v/v). La migration du solvant permet de séparer les composés contenus dans l'extrait selon leurs degrés d'hydrophobicité.

De manière stérile, des spores de *Cladosporium*, cultivé sur milieu PDA, sont récoltées à l'aide d'un râteau avec 10 ml de la solution SRS (composition dans la section I.5.2.1 de ce chapitre) et mélangées à 50 ml de milieu PDA encore liquide. Une fine couche de ce mélange est étalée de manière homogène sur la plaque TLC séchée. La plaque est ensuite incubée le temps nécessaire au développement du champignon (environ 48 heures), à 30°C à l'abri de la lumière dans une boîte saturée en eau. Une zone (tache blanche) d'inhibition de croissance, correspondant à la zone de migration des molécules fongitoxiques où le pathogène ne se sera pas développé, indiquera une toxicité dans l'échantillon testé.

II.3.5. Analyse de spectrométrie de masse

L'analyse de spectrométrie de masse a été réalisée avec un spectromètre de masse de type 9.4 tesla Apex-Qe FTICR (Bruker Daltonics, Billerica, MA) dans le mode ion positif. L'échantillon (10 µl de l'échantillon, 490 µl de MeOH et 500 µl d'eau) a été introduit directement par infusion dans la source electrospray à un débit de 120 µl/h avec l'aide du gaz nébulisateur N₂. Une différence de potentiel -4 kV a été appliquée à la sortie du capillaire d'admission pour la génération des ions chargés positivement. Le séchage par N₂ (250°C) a été appliqué pour permettre la désolvation des gouttelettes générées par la source. La fragmentation par CID (collision dissociation induite) a été réalisée en utilisant l'argon comme gaz de collision à une pression de 10⁻³ mbar avec une tension de -12.5 V dans la cellule de collision.

II.4. Dosage des volatiles dans les feuilles

Dans un vial spécifique, 0.25 g de poudre de feuilles sont incubés avec 2 ml de tampon phosphate 100 mM, pH 7 et 100 µl de HCl 1N. Le flacon est scellé directement après le mélange. L'échantillon est injecté en CPG de type Headspace sur un appareillage de marque PERKIN ELMER de modèle HS 40 XL pour l'échantillonneur et Autosystem XL pour le CPG. La technique consiste à faire chauffer l'échantillon de manière à faire passer les volatils de la matrice solide ou liquide vers la phase gazeuse, dont un volume sera prélevé et injecté automatiquement sur la colonne CPG.

Les paramètres spécifiques importants au niveau de l'échantillonneur du Headspace sont les suivants :

- Température du four pour l'incubation de l'échantillon : 90°C
- Durée d'incubation de l'échantillon : 15 minutes
- Température de l'aiguille de prélèvement : 100°C
- Durée du prélèvement de l'échantillon : 0,16 minutes
- Température de la ligne de transfert vers le CPG : 110°C

Au niveau du chromatographe CPG, l'échantillon est injecté sur une colonne de marque ALLTECH et de type EC-WAX 30 m x 0,25 mm. Les composés volatils sont élués par augmentation de la température selon le programme suivant : 5 minutes 40°C, montée de 5°C par minute jusqu'à 220°C, 1 minute à 220°C. Ils sont détectés au moyen d'un détecteur à ionisation de flamme à 250°C. La gestion de l'appareillage, l'acquisition et le traitement des données sont réalisés au moyen du logiciel Turbochrom Navigator-autosystem (PERKIN ELMER).

II.5. Dosage de l'activité lipoxygénase (LOX)

II.5.1. Extraction de l'enzyme

Un tampon d'extraction spécifique à la lipoxygénase est préparé à partir d'un tampon phosphate 100 mM, pH 7.0, qui est le pH d'activité optimum de l'enzyme, auquel on ajoute 0,04 g de metabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) et 0,25g de Tween 20 par litre. 0.75 ml de tampon d'extraction sont ajoutés à 0.25 g de tissu végétal broyé dans un eppendorf. Le mélange est incubé une heure sur glace en vortexant toutes les dix minutes. Puis il est centrifugé 10 minutes à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant obtenu contenant l'enzyme est utilisé tel quel pour le dosage de l'activité.

II.5.2. Dosage spectrophotométrique

Le principe de ce dosage repose sur l'absorbance des hydroperoxydes à 234 nm. Le test consiste à mesurer l'augmentation de l'absorbance à 234 nm, ce qui indique l'apparition des hydroperoxydes produits par la LOX.

Le substrat utilisé pour le dosage est l'acide linoléique (LNA) car c'est le substrat préférentiel de la LOX de tomate. Dans une cuvette en quartz de 3 mL, 50 μl de surnageant enzymatique obtenu après extraction sont ajoutés à 2,93 mL de tampon phosphate 0,1 M pH 7.0 : cette solution sert de référence. La réaction catalysée par cette enzyme étant une oxydation, le tampon est au préalable oxygéné pendant 20 minutes et amené à la température de 30°C. 7 μl de substrat (LNA) à une concentration de 7 μM sont ensuite ajoutés et l'apparition des hydroperoxydes à 234 nm est mesurée pendant 3 minutes. L'activité est calculée en se basant sur la variation maximale de l'absorbance en une minute. La concentration des hydroperoxydes dans l'échantillon est déterminée en utilisant la loi de Beer-Lambert avec un coefficient d'extinction molaire des hydroperoxydes est égal à 25000 $\text{m}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

II.6. Dosage de l'activité lipide hydroperoxydase

II.6.1. Extraction de l'enzyme

Un tampon d'extraction spécifique de l'hydroperoxyde lyase est préparé à partir d'un tampon phosphate pH 6.8, 50 mM en ajoutant 0.175 g de cystéine, 0.11 g d'EDTA et 0.5 g de triton X-100 par litre. 0.75 ml de tampon d'extraction sont ajoutés à 0.25 g de végétal dans un eppendorf. Le mélange est incubé une heure sur glace en vortexant toutes les dix minutes. Puis il est centrifugé 10 minutes à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant obtenu contenant l'enzyme est utilisé pour le dosage de l'activité.

II.6.2. Dosage spectrophotométrique

II.6.2.1. Synthèse des hydroperoxydes

Les hydroperoxydes d'acides gras, les substrats utilisées pour doser l'activité totale de l'ensemble de LHP, sont synthétisés en utilisant l'activité catalytique d'une lipoxygénase commerciale (lipoxygénase de soja : Sigma, L-7395, 15000000 d'unités). La réaction se déroule à pH 9.0 et à basse température, ces conditions étant favorables à l'activité de l'enzyme. Dans un Berlin de 500 ml, 75 ml de tampon borate (0.2N, pH 9.0) sont oxygénés pendant 15 minutes dans de la glace. 135 mg d'acide linoléique (Aldrich) ou d'acide linoléique (Aldrich) (respectivement pour la synthèse des HPODE ou HPOTE) sont additionnés de 5 ml d'eau et de 1 ml de NaOH 1N et ajoutés au tampon borate. Puis est ajoutée la lipoxygénase (20 mg dans 10 ml d'eau). Le mélange est incubé dans la glace pendant 35 minutes en maintenant une légère oxygénation. A la fin de la réaction le pH est ajusté à 3.0 avec de l'acide chlorhydrique 6N : les hydroperoxydes précipitent et la solution prend un aspect laiteux. Le milieu réactionnel est passé sur cartouche moyenne C18 (75mm), 6 g de marque ALLTECH pour purifier le substrat en suivant le protocole ci-dessous :

- 5 ml d'acétonitrile pur
- 5 ml d'acétonitrile et méthanol (v/v)

- 5 ml de MeOH pur
- 75 ml du milieu réactionnel
- 5 ml d'eau milliQ
- 5 ml d'hexane pur
- 4 ml de MeOH pur

La fraction du méthanol contenant le substrat est centrifugé à 13000 rpm pendant 10 minutes, le surnageant est éliminé et le culot (les hydroperoxydes) est stocké à -25°C .

II.6.2.2. Principe et méthode de dosage

Le dosage spectrophotométrique de la LHP est basé sur la mesure de l'absorbance à 234 nm. Le test consiste à mesurer non plus l'apparition mais la consommation des hydroperoxydes par l'activité LHP donc une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde. Pour la réaction, les hydroperoxydes sont dilués dans le méthanol pur pour obtenir une concentration égale à $7\ \mu\text{M}$.

De la même manière que pour la LOX, $50\ \mu\text{l}$ du surnageant obtenu après extraction sont utilisés pour le dosage. L'extrait LHP est ajouté à $2,93\ \text{ml}$ de tampon phosphate $0,1\ \text{M}$ pH 6,7 : cette solution sert de référence. Le tampon est au préalable amené à la température de 30°C et maintenu à cette température tout au long des mesures. La réaction est démarrée par ajout de $10\ \mu\text{l}$ de substrat, ce qui donne une concentration de $20\ \mu\text{M}$ dans le milieu réactionnel au départ. La mesure de l'absorbance est suivie pendant 3 minutes, et l'activité est calculée en se basant sur la variation maximale de l'absorbance en une minute. L'activité de la LHP est donc déduite de cette concentration en unités d'enzyme (μmol de substrat consommé/minute)/g de matériel végétal.

II.7. Extraction des acides nucléiques

II.7.1. Extraction des DNAs de plante (Méthode CTAB)

Un gramme de feuilles de tomate est broyé dans l'azote liquide et la poudre obtenue (300-500 mg) est transférée dans un tube Nalgène de 40 ml auquel on ajoute 4-8 ml de tampon d'extraction 2-ME (2-mercaptoéthanol)/CTAB (CTAB 2% (p/v), Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0 et NaCl 1,4 M) 2% (v/v) chaud (65°C). Le broyat est incubé entre 10 et 60 minutes à 65°C en mélangeant par inversion toutes les 10-15 minutes. Les échantillons sont refroidis pendant 10 minutes et un égal volume de chloroforme/octanol ou chloroforme/alcool isoamylique 24 :1 est ajouté. Les échantillons sont centrifugés pendant 5 minutes à 7500g à 4°C. La phase aqueuse est ensuite prélevée, et transférée dans un tube auquel on ajoute 1/10^{ème} de volume de tampon CTAB/NaCl (CTAB 10% (p/v) et NaCl 0,7 M) à 65°C. Un égal volume de chloroforme/octanol ou chloroforme/alcool isoamylique 24 :1 est ajouté. Les échantillons sont centrifugés pendant 5 minutes à 7500g à 4°C et la phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube. Le DNA est précipité par addition d'un volume de tampon de précipitation CTAB (CTAB 1% (p/v), Tris-HCl 50 mM pH 8.0 et EDTA 10 mM pH 8.0) et l'incubation à température ambiante pendant environ 30 minutes. Les échantillons sont centrifugés pendant 5 minutes à 4°C à 500g et le surnageant est éliminé. Le culot est récupéré dans 500 µl de tampon High-Salt TE à l'aide d'une pipette pasteur et transféré dans un eppendorf de 1,5 ml auquel 0,6 volume d'isopropanol est ajouté. Après 15 minutes de centrifugation à 10000 rpm dans une minifuge à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol 70%. Les échantillons sont centrifugés pendant 5 minutes à 13000 rpm, le surnageant est éliminé et le culot est séché sous vide. Le culot est resuspendu dans 100-500 µl de tampon high-salt TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0,1 mM pH 8.0 et NaCl 1 M). Enfin le DNA est conservé à -20°C.

II.7.2. Extraction des RNAs de tomate (Méthode Phénol/SDS)

Afin d'éviter toute activité RNase, toutes les solutions employées (à l'exception des solutions contenant du Tris ou du MOPS) sont traitées au DMPC (Diméthylpyrocarbonate) 0,1 % puis autoclavées. La vaisselle doit être maintenue au four Pasteur à 180°C pendant au moins 8 heures.

II.7.2.1. Homogénéisation des tissus et élimination des protéines

La méthode utilisée pour l'extraction des RNA de tomate est la méthode Phénol/SDS décrite par Ausubel et al. (1995).

Des feuilles congelées (environ 2g) sont tout d'abord broyées en présence d'azote liquide dans un mortier jusqu'à obtenir une poudre fine. La poudre obtenue est transférée dans un tube Nalgène de 40 ml contenant 15 ml de tampon de broyage (tampon TLE (Tris- HCl 0,2 M pH 8.2, LiCl 0,1 M et EDTA 5 mM pH 8.2), SDS 1%) et 5 ml de phénol équilibré dans du TLE. Après une minute d'homogénéisation à l'Ultraturax à vitesse modérée, 5 ml de chloroforme sont ajoutés. Les échantillons sont mélangés, puis incubés 20 minutes à 50°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 20200 g à 4°C. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube contenant 5 ml de phénol équilibré dans du TLE et 5 ml de chloroforme. Le tout est mélangé par inversion puis centrifugé pendant 15 minutes à 20200 g à 4°C. La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube Nalgène contenant 10 ml de chloroforme. Les deux phases sont mélangées par inversion et une dernière centrifugation de 15 minutes à 20200g à 4°C est réalisée.

II.7.2.2. Précipitation sélective des RNAs

La dernière phase aqueuse contenant le DNA et les RNAs est transférée dans un tube en verre de 30 ml. Afin de précipiter sélectivement les RNAs, un volume de LiCl 8M égal à 1/3 volumes de l'échantillon est ajouté de façon à obtenir une concentration finale en LiCl de 2M. Après une précipitation d'environ 16 heures à 4°C, les échantillons sont centrifugés pendant 30 minutes à 27000g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot

est rincé avec 500 µl de LiCl 2M. Le culot est ensuite repris dans 300 µl d'eau traitée au DMPC puis précipité à l'éthanol (ajouter 0,1 volume de NaAc 3M pH 5.0, 2,5 volumes d'éthanol 100%, précipitation à -70°C pendant ½ heure) dans un eppendorf de 1,5 ml. Le mélange subit alors une centrifugation pendant 15 minutes à 13000 rpm dans une minifuge à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol 70 % (v/v). Les échantillons sont enfin soumis à une dernière centrifugation pendant 5 minutes à 13000 rpm. Après élimination du surnageant, le culot est séché sous vide puis repris dans 100 µl d'eau traitée au DMPC. Les échantillons de RNA sont conservés à -80°C.

II.7.2.3. Vérification de la qualité des RNAs

La qualité des RNA extraits est vérifiée en soumettant une aliquote de chaque échantillon à une électrophorèse sur gel d'agarose 1% non dénaturant. Après migration, les RNAs non dégradés apparaissent sous forme d'une série de bandes distinctes.

II.7.3. Extraction des DNA plasmidiens (Minipréparation)

L'extraction des plasmides est réalisée par une méthode basée sur la lyse alcaline. Deux millilitres de milieu liquide (LB + ampicilline) sontensemencés par une bactérie transformée et incubés pendant 16 heures à 37°C sous agitation. Un ml et demi de cette culture sont centrifugés à 12000 g pendant 2 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 150 µl de solution 1 (glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0 et EDTA 10 mM pH 8.0) refroidie sur glace et incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Les bactéries sont ensuite lysées par ajout de 200 µl d'une solution alcaline (solution 2 : NaOH 0,2 N et de 10 g/l de SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) 1%) fraîchement préparée et incubées sur glace pendant 5 minutes. Cent cinquante µl de solution 3 (acétate de potassium 3 M et acide acétique glacial 5 M pour amener le pH à 5.5) refroidie sont ensuite ajoutés, et après une dernière incubation de 5 minutes sur glace, les échantillons sont centrifugés pendant 5 minutes à 13000g à 4°C.

Les plasmides sont alors purifiés en ajoutant un volume de phénol-chloroforme (1 :1) au surnageant. Après mélange et centrifugation d'une minute à 13000 g, la phase

aqueuse est récupérée puis précipitée à l'éthanol (2 volumes) à -70°C pendant 30 minutes (ou 0,7 volumes d'isopropanol). Après centrifugation de 5 minutes à 13000 g, le culot est rincé à l'éthanol 70 %, et recentrifugé 5 minutes à 13000 g. Après avoir été séché sous vide, le culot est remis en suspension dans 25 µl d'eau ou de TE stérile additionné 0,5 µl de RNaseA (100mg/ml).

Les plasmides destinés au séquençage ou à la préparation de sondes moléculaires sont extraits au moyen du kit « GFX™ Micro Plasmid Prep Kit » (Amersham Pharmacia Biotech), selon les instructions du fournisseur. Le principe de cette méthode est également basé sur la lyse alcaline, ainsi que sur l'utilisation d'une matrice de silice permettant la fixation du DNA plasmidien. Après la lyse des cellules et la précipitation sélective du DNA génomique et des débris cellulaires, le surnageant contenant le DNA plasmidien est déposé sur la matrice. Après adsorption des plasmides, la matrice est lavée plusieurs fois avec un tampon contenant de l'éthanol. Ensuite, le DNA plasmidien est élué par passage sur la colonne d'une solution de faible force ionique.

II.7.4. Restriction de DNA

Les enzymes de restriction utilisées pendant les manipulations sont fournies par Roche, Gibco, Biolabs et Promega.

La digestion s'effectue avec 1 à 5 unités d'enzyme par µg de DNA, durant une à deux heures à 37°C, dans le tampon recommandé par le fournisseur.

Les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% non dénaturant.

II.7.5. Hybridation sur Northern Blot

Les manipulations avec des RNA nécessitent toutes les précautions décrites au paragraphe II.5.2.

II.7.5.1. Marquage radioactif d'une sonde DNA

Les sondes cDNA sont marquées au ^{32}P par « random priming » à l'aide du kit « Random Primers DNA Labeling System » (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur.

Le DNA est d'abord dénaturé pendant 5 minutes dans l'eau bouillante puis directement refroidi sur glace. Ensuite, les hexanucléotides ainsi que les dNTP (dont l' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ d'ATP) sont ajoutés. La réaction de marquage, initiée par ajout du fragment klenow de la DNA polymérase d'*E. coli*, se déroule pendant une heure à 25°C.

La réaction est arrêtée par l'addition de solution stop (formamide 98% (v/v), EDTA 500 mM pH8.0, bleu de bromophénol 3 mg/ml, xylène de cyanol 3 mg/ml).

Les dNTP ainsi que les hexanucléotides non incorporés sont éliminés par passage sur une colonne de purification Microspin G-25 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Une aliquote de la solution est prélevée avant et après passage sur la colonne, afin de déterminer le rendement du marquage.

Les aliquotes sont diluées dans du liquide à scintillation et l'activité totale de la sonde marquée est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (PerkinElmer, life sciences, WinSpectral™ 1414 Liquid Scintillation counter). Le rendement de marquage est déterminé par le rapport entre la radioactivité incorporée (mesure après passage sur colonne) et la radioactivité totale (mesure avant passage sur colonne), multiplié par le rapport entre les volumes avant et après passage sur la colonne. La sonde marquée est utilisée à une concentration minimum de 10^6 cpm par millilitre de solution d'hybridation et par 10 cm^2 de membrane à hybrider.

II.7.5.2. Transfert de RNA par Northern blotting

Les échantillons de RNA (20 μg de RNAs totaux) sont d'abord séparés par électrophorèse sur gel agarose 1%, en conditions dénaturantes. Le gel est ensuite rincé dans de l'eau traitée au DMPC. Les RNA sont alors transférés par capillarité, en présence de tampon SSC 20x (NaCl 3 M et citrate de sodium 0,3 M, pH 7.0), sur une membrane de nylon (Hybond N⁺, Amersham) préalablement équilibrée dans ce même tampon. Au

terme d'une nuit de transfert, la membrane est récupérée et rincée quelques minutes dans de l'eau traitée au DMPC ou dans du SSC 2x, avant d'être déposée sur un papier Whatmann humide. L'ensemble est placé dans un UV-crosslinker et une énergie de 12000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ est appliquée. Cette dernière étape permet la fixation des RNA sur la membrane.

II.7.5.3. Hybridation radioactive sur la membrane de nylon

La membrane de nylon, humidifiée dans du SSC 2x, est placée dans un tube à hybridation. Afin d'éviter toute fixation aspécifique de la sonde, la membrane est préalablement préhybridée pendant 2 heures dans un four rotatoire (Shake'n'Stake, Hybaid) à 68°C, à l'aide de solution de préhybridation (SSC 5x, solution bloquante 1x, N-Laurylsarcosine 0,1% (v/v) et SDS 0,02%), à raison d'un ml de cette solution par 10 cm^2 de surface membranaire. La solution bloquante (ou Blocking reagent) 10x se compose de 10 g de Blocking en poudre, 100 ml tampon maléique (acide maléique 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5)

L'hybridation est réalisée à l'aide de solution d'hybridation qui est la même solution que celle de préhybridation mais additionnée de sonde marquée radioactivement par avoir une activité spécifique de l'ordre de 10^6 à 2×10^7 cpm/ml de solution. La sonde est dénaturée dans la solution d'hybridation en chauffant l'ensemble à 100°C pendant 10 minutes, puis refroidie rapidement sur glace avant d'être versée dans le tube à hybridation. L'hybridation se réalise ensuite à 68°C pendant une nuit (environ 16 heures) dans un four rotatoire.

Après l'hybridation, la membrane est lavée plusieurs fois pour éliminer les sondes non hybridées ainsi que les sondes hybridées non spécifiquement. Deux lavages de 10 minutes sont réalisés à température ambiante dans une solution de SSC 2x, SDS 0,1%, puis deux lavages supplémentaires de 15 minutes sont effectués à 68°C dans une solution de SSC 0,2x, SDS 0,1%.

Enfin, la membrane est scellée dans un sachet plastique, puis exposée quelques heures à un film autoradiographique (X-ray, Fuji).

II.8. Mesure de la concentration en acide nucléique

La concentration en acides nucléiques d'une solution peut être déterminée par spectrophotométrie. Une aliquote des échantillons est diluée dans un volume connu d'eau traitée au DMPC et leur absorbance est mesurée à 260 nm, longueur d'onde proche d'un maximum d'absorption des acides nucléiques.

Sachant que la longueur des cuvettes en quartz utilisées pour réaliser les mesures est de 1 cm et qu'une D.O. de 1 à 260 nm équivaut à une concentration de 40 µg/ml de RNA, la concentration en RNA est calculée par la formule suivante :

$$C (\mu\text{g/ml}) = A_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{facteur de dilution}$$

De même, pour calculer la concentration des échantillons de DNA, sachant qu'une D.O. de 1 à 260 nm équivaut à une concentration de 50 µg/ml de DNA, la concentration en DNA est calculée par la formule ci-dessous :

$$C (\mu\text{g/ml}) = A_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{facteur de dilution}$$

La concentration de DNA dans un échantillon peut également être déterminée en déposant un volume connu de la solution de DNA sur gel d'agarose 1% non dénaturant et en réalisant une électrophorèse, en parallèle avec un marqueur de poids moléculaire (SMART LADDER, Eurogentec). Connaissant la quantité en DNA de chacun des fragments du marqueur moléculaire, il est possible d'évaluer la concentration en DNA de l'échantillon en comparant l'intensité de fluorescence de ses bandes par rapport à celle des fragments du Smart Ladder.

II.9. Transcription inverse

Les réactions de transcription inverse effectuées dans le cadre des expériences de RT-PCR ont été réalisées en moyen de l'enzyme superscript II RNase H (Invitogen). Environ 1 µg de RNA totaux est d'abord dénaturé pendant 5 minutes à 65°C dans de l'eau traitée au DMPC et refroidis sur glace, en présence d'un oligonucléotide (une amorce) s'hybridant du côté 3' du mRNA d'intérêt. La synthèse du premier brin de DNA complémentaire est réalisée en ajoutant les 4 dNTP (dATP, dGTP, dCTP et dTTP, chacun

à une concentration finale de 0,5 mM) ainsi que 200 unités de transcriptase inverse (SuperscriptTM II RT, Invitrogen) et le tampon de transcription (concentration finale 1x) et 40 unités de RNase out et du DTT 10 mM. La réaction se déroule pendant 50 minutes à 42°C et la transcription inverse est ensuite inactivée par une incubation de 15 minutes à 70°C. Les échantillons peuvent être conservés à -20°C.

II.10. Amorces utilisées

Nom d'amorce	séquence	caractéristiques
AOS11F	CTA CAG TGG GGA ATA AAC AGT GC	Bases 1430 à 1452 du cDNA <i>AOS1</i> (GeneBank n° AF230371)
AOS11R	CAC CCA TTT TGT GAA AAC ATT ACT	Bases 1701 à 1678 du cDNA <i>AOS1</i> (GeneBank n° AF230371)
AOS2 1F	TTG AAC TCA ACC TTC GCT TGT TG	Bases 1 à 23 du cDNA <i>AOS2</i> (GeneBank n° AJ271093)
AOS2 1R	CTA ATG GTA GTG CAT AAT CTC CAG G	Bases 310 à 286 du cDNA <i>AOS2</i> (GeneBank n° AJ271093)
HPL 1F	CTC CTC TAT CAA CTC CGG CG	Bases 180 à 199 du cDNA <i>HPL</i> (GeneBank n° AF230372)
HPL 1R	AGC TCT TTA AGT AGT GTA GGC ACC C	Bases 630 à 606 du cDNA <i>HPL</i> (GeneBank n° AF230372)
LoxC 1F	ATCCTAGAAGGTGTAGAACCGGTC	Bases 820 à 843 du cDNA <i>LoxC</i> (GeneBank n° U37839)
LoxC 1R	GTGTCTGGACCTCCAGAATCA	Bases 1325 à 1305 du cDNA <i>LoxC</i> (GeneBank n° U37839)

II.11. Réaction de polymérisation en chaîne ou PCR

La PCR permet l'amplification spécifique d'un fragment de DNA cible en présence d'oligonucléotides encodant cette région d'intérêt. Le principe de la PCR consiste en la répétition d'un cycle triphasique : dénaturation du DNA à amplifier, hybridation de deux amorces de part et d'autre de la séquence cible et enfin, élongation des amorces par l'activité d'une DNA polymérase en présence de dNTP. La *Taq* DNA polymérase possède une activité terminal- transférase qui a pour l'effet l'ajout d'une désoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments amplifiés. Cette particularité permet le clonage de ces fragments dans le vecteur commercial pGEM-T Easy décrit

précédemment. En pratique, le mélange réactionnel contient 1 µg au maximum ou quelques µl de réaction de transcription invers de DNA, 50 µM de chaque dNTP, 0,5 µM de chaque amorce, du tampon de PCR 1x et 1 unité de *Taq* DNA polymérase (Qiagen).

La PCR est réalisée dans un thermocycleur Gene Amp PCR System 9700 (Perkin-Elmer). Après une première phase de dénaturation (5 minutes à 94°C), les échantillons subissent 25 à 30 cycles comprenant chacun trois étapes de variation de température, dont une étape de dénaturation (30 secondes à 94°C), une étape d'hybridation (30 secondes à 55°C), ainsi qu'une étape d'élongation (1 minute à 72°C). À la fin du dernier cycle, une incubation de 7 minute à 72°C permet d'achever les synthèses de DNA en cours.

Les produits issus de l'amplification par PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% non dénaturant.

II.12. Electrophorèse d'acides nucléiques sur gel d'agarose

II.12.1. Electrophorèse sur gel d'agarose non dénaturant

Un gel horizontal d'agarose 1% est préparé dans tampon TEA 1x (Tampon TEA 50 x : Na₂EDTA 1mM pH 8.0 et Tris-Acétate 40 mM pH 8.0) additionné de 0,2 µg/ml de bromure d'éthidium (BE). Avant d'être déposés dans les puits du gel, les échantillons sont additionnés d'1/10^{ème} de volume de solution de chargement DNA (bleu de bromophénol 2,5 g/l, xylène cyanol 2,5 g/l, filcoll 400 250 g/l) pour les échantillons de DNA ou de solution de chargement RNA (glycérol 50 % (v/v), xylène cyanol 0,05 % (v/v), bleu de bromophénol 0,05 % (v/v), Na₂EDTA 10 mM) pour les échantillons de RNA. La migration s'effectue dans tampon TEA 1x additionné de 0,2 µg/ml de BE sous une différence de potentiel de 100 volts. Les molécules d'acides nucléiques sont ensuite visualisées sous UV, grâce à la fluorescence du BE qui s'intercale entre les bases nucléotidiques.

Le marqueur moléculaire Smart Ladder d'Eurogentec est utilisé pour déterminer la concentration et la taille des bandes de DNA visualisées sur les électrophorèses.

II.12.2. Electrophorèse sur gel d'agarose dénaturant

Les gels d'agarose dénaturants sont préparés dans du tampon MOPS 1x (Tampon MOPS 1x : MOPS (acide morpholinopropanesulfonique) 20 mM pH 7.0, Na₂EDTA 1 mM pH 8.0 et NaAc 5 mM pH 5.0), additionné de 0,25 µg/ml de BE, et contiennent 7 % (v/v) de formaldéhyde.

Les échantillons contenant 20 µg de RNA total sont dénaturés par une incubation de 15 minutes à 65°C, en présence de 3,5 volumes d'une solution MFF (MOPS 1,4x, formaldéhyde 7,9% (v/v) et formamide 64,3% (v/v)) fraîchement préparée, puis refroidis sur glace. Après avoir ajouté 1/10^{ème} de volume de solution de chargement RNA, les échantillons sont déposés dans les puits du gel.

La migration s'effectue dans du tampon MPOS 1x additionné de 0,25 µg/ml de BE, sous une différence de potentiel de 100 volts. Elle est arrêtée lorsque le xylène cyanol atteint le bord inférieur du gel.

II.13. Purification d'un fragment de DNA à partir du gel d'agarose

La purification de DNA à partir d'un gel d'agarose est réalisée à l'aide du kit « NucleoSpin Extract II » (Macherey-Nagel). Le principe de cette méthode consiste à solubiliser le morceau de gel d'agarose contenant le fragment de DNA d'intérêt et à le faire passer sur une colonne contenant une matrice de silice. Ce passage se réalise dans des conditions de salinité permettant l'adsorption du DNA sur la matrice. Des lavages successifs permettent ensuite d'éliminer les impuretés. Le DNA est finalement élué en présence d'un tampon de faible force ionique.

Une fraction du produit issu est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % en parallèle avec du marqueur Smart Lader (Eurogentec) qui permettra d'estimer la taille et la quantité du fragment de DNA isolé.

II.14. Ligation

Les fragments de DNA issus d'amplification par PCR sont clonés, après purification, dans le vecteur pGEM-T Easy de Promega via leurs extrémités cohésives 3'-A ou 3'-T, respectivement. La ligation du fragment de DNA dans le site de clonage multiple du pGEM-T Easy se déroule soit pendant une heure à température ambiante, soit pendant 16 heures à 4°C, en présence d'une unité de T4 DNA ligase, dans le tampon de ligation (tout deux fournis avec le vecteur). La quantité de DNA à ajouter au mélange de ligation se calcule selon la formule suivante :

$[\text{ng de vecteur}] \times [\text{rapport de taille (kb) insert/vecteur}] \times [\text{rapport molaire vecteur/insert}]$

Le rapport molaire peut varier de 1/3 et 3.

II.15. Transformation bactérienne

II.15.1. Préparation des cellules électrocompétentes

500 ml de milieu LB liquide sont inoculés à l'aide de 5 ml d'une préculture de la souche *E. coli* DH10B. Lorsque la densité optique à 600 nm atteint une valeur comprise entre 0,7 et 0,9, la culture est arrêtée et refroidie pendant 10 minutes sur glace. Il est important de maintenir la chaîne du froid tout au long des opérations qui suivent. La culture refroidie est ensuite centrifugée pendant 10 minutes à 3000 g à 4°C. Le culot de cellules est lavé à l'aide d'un demi volume d'eau stérile à 4°C et à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Cette étape est répétée deux fois supplémentaires, en réduisant le volume de lavage de moitié lors de chaque étape. Enfin, les cellules compétentes sont suspendues dans 1 ml d'une solution stérile de glycérol 10% (v/v). Dans ces conditions, les cellules peuvent être conservées à - 70°C pendant plusieurs mois.

II.15.2. Electroporation des cellules compétentes

Afin de conserver et d'amplifier les vecteurs contenant les fragments de DNA d'intérêt, 40 µl d'une suspension de bactéries *E. coli* DH10B sont transformés avec 1-1,5

µl de mélange de ligation dans une cuvette d'électroporation refroidie sur glace. Les cuvettes sont maintenues sur glace pendant 5 minutes afin de permettre l'adsorption de DNA sur les cellules. Un choc électrique est effectué dans les conditions suivantes : 2500 volts, 40 µF, 125 ohms (électroporteur Easy JecT, Equibio). Immédiatement après la décharge électrique, les cellules sont diluées dans un millilitre de milieu SOC liquide et incubées 1 heure à 37°C. Une aliquote de la suspension bactérienne est ensuite étalée sur milieu LB solide additionné d'ampicilline et X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside 20 mg/ml, 40 µl par boîte). Cette étape permet de sélectionner les bactéries transformées par un vecteur pGEM-T Easy contenant le fragment de DNA d'intérêt, via la résistance à l'ampicilline présente dans le vecteur et le test « Blanc- bleu ».

En effet, la souche DH10B d'*E. coli* contient le fragment du gène *lacZ* codant pour la sous-unité β de la β-galactosidase, tandis que le vecteur contient le fragment codant pour la sous-unité α (gène *lacZa*). Lorsque la bactérie a été transformée par un plasmide non recombinant, les deux sous unités de la β-galactosidase sont produites et peuvent s'assembler (α-complémentation) (Ullman *et al.* 1967). L'enzyme dégrade alors le substrat chromogène X-Gal, ce qui se traduit par une coloration bleue des colonies. Lorsqu'un insert est présent dans le plasmide au niveau du site de clonage multiple, le gène *lacZa* porté par le vecteur n'est plus fonctionnel. L'X-Gal ne peut plus être métabolisé et la colonie transformée reste blanche.

Chapitre IV
RESULTATS

Chapitre IV

Résultats

I. Rôle des lipopeptides dans l'ISR

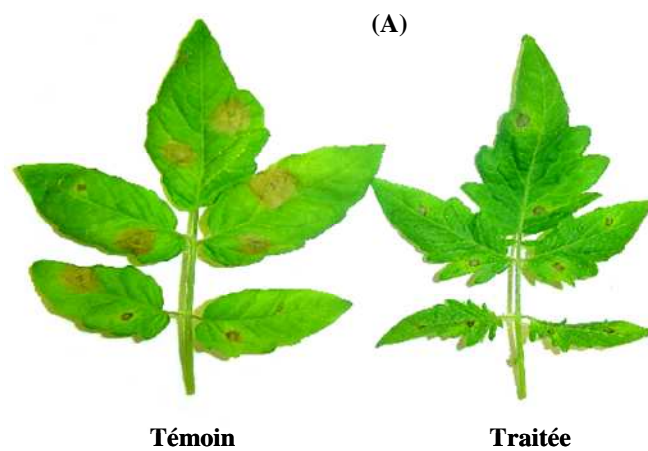
Certaines souches de *Bacillus subtilis* sont capables de produire plusieurs familles de lipopeptides telles que la fengycine, la surfactine et l'iturine (Zuber *et al.* 1993). Des travaux antérieurs ont déjà démontré des effets protecteurs de la fengycine, produit par la souche *B. subtilis* S499, dans certains pathosystèmes tels que haricot/*Pythium ultimum*, concombre/*Colletotrichum lagenarium* et tomate/*Pythium aphanidermatum* (Ongena *et al.* 2005a; Ongena *et al.* 2005b). Dans la première partie de notre travail, nous avons voulu étudier, via l'utilisation de mutants surproducteurs, le rôle de ces lipopeptides produits par différentes souches de *B. subtilis* dans l'induction de l'ISR chez la tomate.

I.1. Evaluation de l'induction de la résistance chez la tomate

Les premières manipulations de ce travail consistaient à vérifier l'effet protecteur *in vivo* des bactéries vivant sur des plants de tomate cultivés en terreau, substrat de croissance le plus communément utilisé pour ce type d'expérimentation. Certaines expériences ont été réalisées pour étudier des souches de *Bacillus subtilis* avec le pathosystème tomate/*Botrytis cinerea*. La souche *B. subtilis* BC168 (WT), trois de ses mutants surproduisant soit la surfactine (BC21), la fengycine (BC27) ou la surfactine et la fengycine (BC25) ; et la souche BBG100 mutante de *B. subtilis* ATCC6633 surproduisant la mycosubtiline (famille de l'iturine) ont été testées selon la méthode décrite dans le paragraphe II.2 du chapitre Matériel et Méthodes.

L'effet protecteur de ces souches a été évalué sur les plants de tomate âgés de cinq semaines inoculés au niveau des racines. Les expériences d'infection de tomate ont

été effectuées sur les feuilles détachées selon le protocole décrit dans la section II.2 du Matériel et Méthodes. L'incidence de la maladie a été ainsi évaluée en terme de pourcentage des lésions de *B. cinerea* qui se sont clairement développées hors zone d'inoculum pour produire les lésions brunâtres s'étendant rapidement (Figure IV.1A). Sur la base des résultats de quatre expériences indépendantes, nous avons observé une réduction de la maladie significative chez les plantes traitées avec *B. subtilis* BC21, BC25 et BC27 avec une moyenne de 36%, 43% et 26% respectivement en comparant avec les plants témoins (Figure IV.1B). Les souches BC168, ATCC6633 et BBG100 étaient incapables de protéger les plantes contre le pathogène (Figure IV.1C). Comme une étude précédente a montré que le PGPR et le pathogène restaient géographiquement séparés sur la plante (Ongena *et al.* 2002a), la suppression de la maladie dans ces expériences était assurément due à l'induction de la résistance systémique chez la plante hôte. De plus, nous avons estimé le taux de la colonisation de BC25 en utilisant un mutant résistant à la spectinomycine. La concentration des cellules vivantes de BC25 était environ de $3.0 \pm 2.1 \times 10^5$ cfu/g de terre au moment de l'infection de la tomate. Bien que ce taux de colonisation ne soit pas très élevé, il est suffisant sur base du seuil minimal repris pour induire l'ISR selon (Raaijmakers *et al.* 1995).



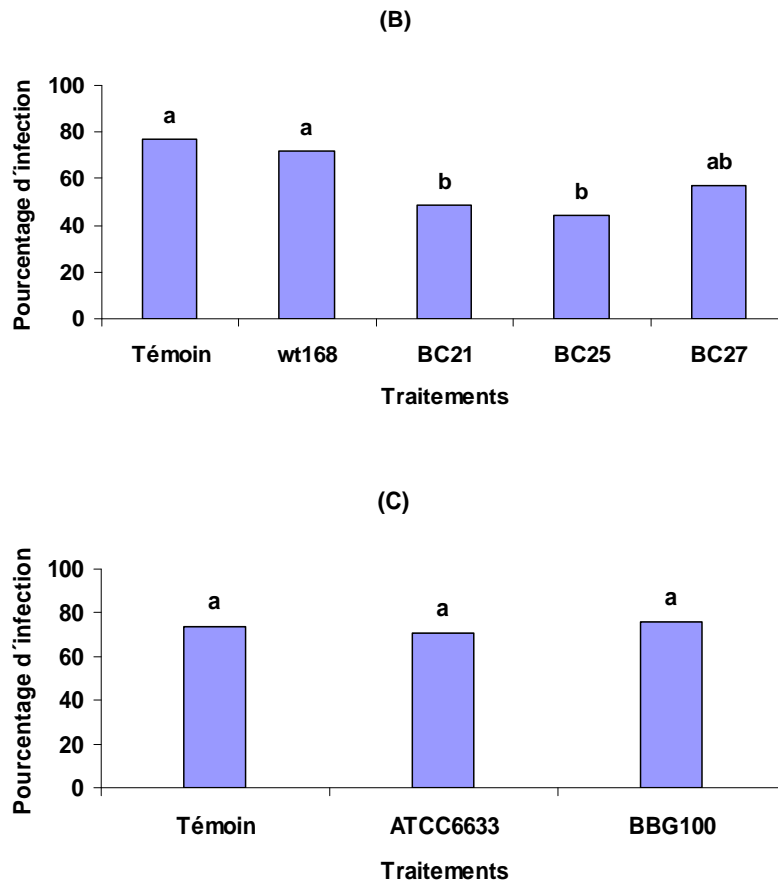


Figure IV.1. (A) : Exemple de feuille de tomate (témoin et traitée par *B. subtilis* BC25) infectées par *B. cinerea*. (B) : Evolution de la sévérité de la maladie dans les plants de tomate témoins et traités avec les souches *B. subtilis* BC168, BC21, BC25 et BC27; et (C) avec les souches ATCC6633 et BBG100 quatre jours après infection par *B. cinerea*. Les données sont représentées pour quatre expériences, chacune avec 90 feuilles par traitement. L'incidence de la maladie représente la somme des lésions de propagation qui se développent 4 jours après l'infection, sur chaque plante individuelle, dans le même traitement, rapporté au nombre total de sites d'infection. Les données pour chaque expérience indépendante ont été analysées pour l'homogénéité de variance par ANOVA et les données des expériences avec le même traitement ont été mises en commun pour l'analyse car les interactions entre l'expérience et le traitement n'étaient pas significatives à $P = 0.05$. Les moyennes des différents traitements ont été comparées par la méthode de Newman et Keuls (moindre différence significative à $\alpha = 0.05$) et les barres identifiées par 'a' ne sont pas statistiquement différentes des témoins.

Les résultats de cette étude suggèrent fortement un rôle possible pour les lipopeptides de type surfactine et fengycine en tant que métabolites actifs impliqués dans l'élicitation de la résistance systémique chez la tomate par *B. subtilis*. La forte expression

des gènes de biosynthèse de la surfactine et/ou de la fengycine dans les souches hyperproductrices est en effet associée à une augmentation significative du potentiel de ces mutants à induire la résistance chez la tomate. Par contre, il semble que la mycosubtiline n'ait aucune activité inductrice de la résistance systémique chez la tomate.

Généralement, l'ISR n'est pas associé à l'accumulation des protéines PR (Pieterse *et al.* 1996; Pieterse *et al.* 1998). En effet, leur accumulation est considérée comme un marqueur de la SAR (Sarosh *et al.* 2005). Afin de déterminer si la résistance induite chez la tomate traitée par *B. subtilis* BC25 est du type ISR ou SAR, nous avons examiné l'expression différentielle du gène *PR1a* (un marqueur de la SAR) par des hybridations sur Northern blot dans les plants traités par BC25 et témoins juste avant l'infection par *B. cinerea*, ainsi que 48 heures et 96 heures après l'infection. Deux expériences ont été effectuées séparément. Les résultats étaient identiques et ont montré que, quel que soit le traitement, aucune expression du gène *PR1a* n'a été observée avant l'inoculation du pathogène. Mais nous observons que le gène *PR1a* a été fortement stimulé 48 et 96 heures après l'infection dans les plants traités et les plants témoins (Figure IV.2). L'absence d'expression du gène *PR1a* dans les plants traités par *B. subtilis* BC25 avant l'infection par *B. cinerea* suggère que la résistance manifestée par ces plantes n'est pas de type SAR mais plutôt de type ISR.

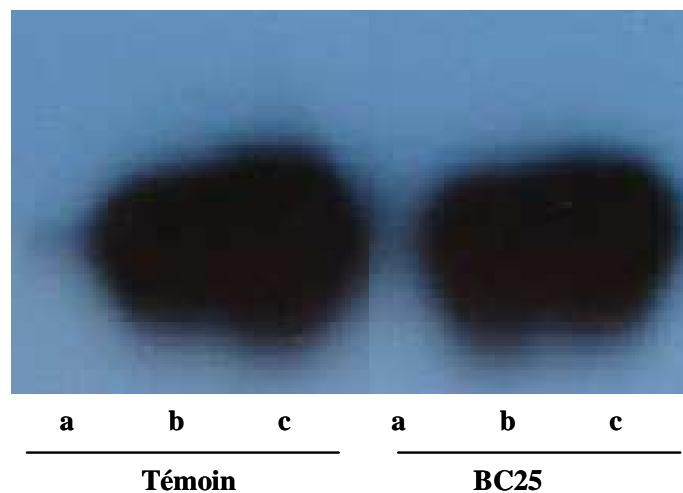


Figure IV.2. Profils d'hybridation obtenus avec la sonde *PR1a* après électrophorèse de RNA totaux et Northern Blotting. Les analyses ont été effectuées sur des RNA totaux des plants témoins et traités avec *B. subtilis* BC25. Puits (a) : juste avant l'infection *B. cinerea*, puits (b) et (c) : 48h et 96h après infection respectivement.

I.2. Activité de biocontrôle par surproduction de mycosubtiline

Après avoir confirmé que la mycosubtiline ne participe pas à l'induction de l'ISR chez la tomate, nous avons voulu savoir si elle participe à un phénomène d'antagonisme potentiel contre les pathogènes du sol.

Afin de répondre à cette question, des essais de biocontrôle ont été conduits dans le pathosystème tomate/*Pythium aphanidermatum* (pathogène qui provoque la fonte des semis), et ce pour comparer la capacité de défense de la souche *Bacillus subtilis* du type sauvage (ATCC 6633) avec celle de son mutant BBG100 modifié pour surproduire de la mycosubtiline. Plusieurs traitements ont été effectués : bactérisation avec ATCC 6633 ou avec BBG100 en plus du traitement du témoin négatif (sans bactérisation mais avec infection par *P. aphanidermatum*) et du témoin positif (sans bactérisation et sans infection) selon la méthode décrite dans la section II.1 du chapitre Matériel et Méthodes. Comme il est montré dans le tableau IV.1, nous observons des fortes différences dans l'incidence de la maladie. Le pré-traitement des graines de tomate avec les cellules végétatives d'ATCC 6633 n'a fourni aucun effet protecteur mais a semblé favoriser le développement de la maladie provoquée par le pathogène *P. aphanidermatum*. Inversement, l'inoculation avec la souche BBG100 avant le semis a mené à l'augmentation du pourcentage de germination des graines qui a été invariablement observée dans quatre expériences indépendantes. Le taux de germination des graines en l'absence du pathogène n'a pas changé de manière significative et était dans la plupart des cas compris entre 90% et 95% (Tableau IV.1). Il est 31% plus élevé chez les graines traitées avec la souche BBG100 par comparaison avec les témoins négatifs, et 48% en comparant avec les gaines traitées avec ATCC 6633.

D'autre part, l'effet protecteur de BBG100 a été également illustré par une augmentation de la taille et la vigueur des plantules en comparaison avec les témoins négatifs ou avec les plants inoculées avec la souche ATCC 6633 (Figure IV.3). La valeur moyenne pour le poids frais de plantes individuelles (partie aérienne, récoltées 18 jours après le semis) était significativement plus grand chez les plants venant de graines traitées avec la souche BBG100 (0.79 g/plant), par rapport aux plants témoins négatifs (0.31 g/plant) et aux plants inoculées avec la souche ATCC 6633 (0.23 g/plant). Ces résultats

montrent que la souche *B. subtilis* BBG100 surproductrice de la mycosubtiline possède un effet protecteur chez la tomate contre *P. aphanidermatum*. Cela peut être mis en relation avec l'effet antagoniste direct de la mycosubtiline contre *P. aphanidermatum* observé *in vitro*.

Tableau IV.1. Effet de la souche ATCC 6633 et son mutant BBG100 sur la réduction de la fonte des semis provoquée par *P. aphanidermatum* chez la tomate. Les expériences ont été effectuées avec 200 graines pour chaque expérience et le nombre de plants sains a été compté 12 jours après le semis. (Exp. : expérience)

Traitement		Germination de graines (%)			
Pathogène	Bactérie (PGPR)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp.4
-	aucune	/	96	95	/
-	ATCC 6633	/	90	92	/
-	BBG100	/	93	88	/
+	aucune	38	48	59	8
+	ATCC 6633	31	25	42	6
+	BBG100	53	59	69	34



Figure IV.3. Les plants de tomate obtenus à partir des graines traitées avec la souche *B. subtilis* ATCC 6633 (A), avec le mutant pour surproduire mycosubtiline BBG100 (B) ou avec une solution $MgSO_4$ (C) (témoins négatif) dans le sol infecté par *P. aphanidermatum* 18 jours après le semis.

I.3. Etude des mécanismes de défense induits chez la tomate traitée avec *B. subtilis* BC25

I.3.1. Etude de la stimulation de la voie de la lipoxygénase (LOX)

Des travaux antérieurs sur le haricot ont montré une accumulation d'acide linoléique et d'acide linoléique et la stimulation des deux activités enzymatiques principales de cette voie métabolique, la lipoxygénase (LOX) et la lipide hydroperoxydase (LHP), dans les tissus foliaires des plants traités par *P. putida* BTP1 (Ongena *et al.* 2004).

Afin de caractériser les mécanismes de défense chez les plantes inoculées par les PGPR, nous nous sommes focalisés pendant notre recherche sur la souche BC25 qui a montré une meilleure protection parmi les souches de *B. subtilis* testées. Nous avons étudié d'abord la stimulation de la voie de la lipoxygénase, menant aux phytooxylipines antifongiques, et surtout l'activité de la LOX et de la LHP. Pour rechercher une éventuelle stimulation de l'activité LOX, la méthode la plus simple et la plus utilisée est un dosage spectrophotométrique basé sur l'augmentation de l'absorbance à 234 nm traduisant l'apparition des hydroperoxydes produits par la LOX (Ongena *et al.* 2004; Silva *et al.* 2004). Les mesures d'activité de la LOX ont été réalisées en utilisant l'acide linoléique comme substrat. Le protocole expérimental est détaillé dans le paragraphe II.5 du Matériel et Méthodes.

Dans trois expériences, l'activité de LOX a été mesurée dans les extraits de feuilles détachées de plants témoins et d'autres traités par BC25 et récoltés à différents temps après infection par *B. cinerea*. L'activité de la LOX était très basse et semblable entre les traitements avant l'infection par *B. cinerea*. Mais après l'infection, une stimulation rapide de l'activité LOX (2 fois) a été observée chez la tomate inoculée avec BC25 par rapport aux plants témoins pendant les 48 premières heures (Figure IV.4). Alors que l'activité LOX chez les plants témoins, à partir du deuxième jour, devient presque stable, l'activité chez les plants traités par BC25 continue d'augmenter jusqu'à ce qu'elle atteigne une valeur 2,4 fois l'activité des témoins à la fin de l'expérience (96 heures après l'infection).

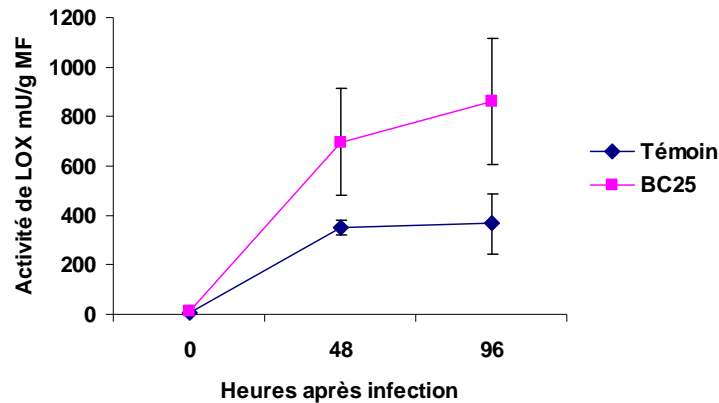


Figure IV.4. L'induction de l'activité LOX chez la tomate traitée avec *B. subtilis* BC25 en comparaison avec les témoins. Les extraits ont été préparés à partir des troisièmes feuilles rassemblées 0 h, 48 h et 96 h après l'infection par *B. cinerea*. Les données sont des moyennes de trois expériences indépendantes, et l'activité LOX (exprimée en mU par gramme de matière fraîche) a été mesurée 3 fois pendant 3 minutes par une méthode spectrophotométrique en suivant l'augmentation des hydroperoxydes à 234 nm.

D'autre part, la LOX introduit une molécule d'oxygène aux acides gras insaturés tels que l'acide linoléique et l'acide linoléique pour générer des 9 et 13-hydroperoxydes qui peuvent alternativement être métabolisés par diverses enzymes telles que l'allène oxyde synthase (AOS), la peroxygénase (POX) et l'hydroperoxyde lyase (HL). Une grande variété de métabolites secondaires biologiquement actifs peuvent ainsi être générés. Cette activité globale de toutes ces enzymes dégradant les hydroperoxydes est exprimée en tant qu'activité lipide hydroperoxydase (LHP).

Le dosage spectrophotométrique de l'activité LHP est basé sur le principe de la diminution de l'absorbance à 234 nm due à la consommation de l'acide hydroxy-octadécatriénoïque (13-HPOTE) puisque c'est la forme produite par la 13-LOX dominante dans les feuilles des plantes (Feussner et Wasternack 2002). Ce test est employé par une grande majorité des auteurs travaillant sur l'activité de consommation des hydroperoxydes. Le protocole d'extraction de l'enzyme à partir des tissus végétaux et le dosage enzymatique sont détaillés dans le point II.6 du chapitre Matériel et Méthodes. Dans deux expériences, l'activité LHP dans les tissus des plants témoins et des plants traités par BC25 a été mesurée. Les extraits ont été préparés à partir des troisièmes

feuilles rassemblées aux différents temps, juste avant l'infection par *B. cinerea*, ainsi que 48 h et 96 h après l'infection par *B. cinerea*, en utilisant les 13-HPOTE comme substrat.

Comme dans le cas de la LOX, nous observons des activités LHP similaires chez les plants témoins et les plants traités par BC25 avant l'infection par le pathogène. Cependant, on remarque clairement une augmentation rapide (1.5 fois) de la LHP jusqu'à 48 heures après l'infection chez les plants traités par BC25 par rapport aux plants témoins où l'activité de la LHP est restée approximativement stable. L'activité LHP chez les plants traités par BC25 reste stable jusqu'à 96 h après infection, alors que celle chez les plants témoins chute jusqu'à une valeur deux fois moins élevée par rapport aux plants traités par BC25 (Figure IV.5).

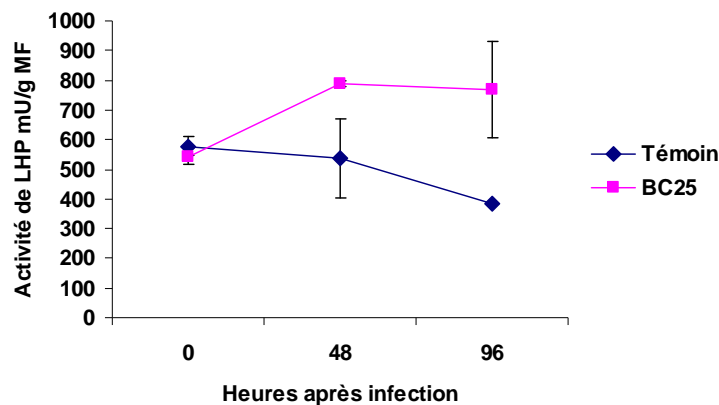


Figure IV.5. L'induction de l'activité de la lipide hydroperoxydase (LHP) chez la tomate témoin et d'autres traitées avec *B. subtilis* BC25. Les extraits ont été préparés à partir des troisièmes feuilles rassemblées 0 h, 48 h et 96 h après l'infection par *B. cinerea*. L'activité LHP (exprimée en mU par gramme de matière fraîche) représente l'activité globale de toutes les enzymes dégradant les hydroperoxydes et a été déterminée par spectrophotométrie en suivant la décomposition de 13-HPOTE à 234 nm. Les données sont des moyennes de deux expériences indépendantes avec deux mesures pour chaque traitement.

I.3.2. Expression différentielle des gènes *AOS*, *HPL* et *LOX*

Nos premières analyses ont montré que la réduction de maladie causée par *B. cinerea* chez la tomate traitée par *B. subtilis* BC25 est associée à la stimulation des deux

activités enzymatiques principales (LOX et LHP) de la voie métabolique de la lipoxygénase.

Comme il a été mentionné plus haut, la LOX est l'enzyme centrale de cette voie. C'est une enzyme soluble qui dégrade les acide gras insaturés en hydroperoxydes (Feussner et Wasternack 2002). Ces hydroperoxydes sont ensuite transformés en molécules moins réactives (phyto-oxylipines) par plusieurs voies métaboliques bien caractérisées parmi lesquelles : la voie de la peroxygénase (POX), la voie de l'allène oxyde synthase (AOS) menant à la production du jasmonate (connu pour être impliqué dans la signalisation et la régulation de l'expression des gènes de défense chez les plantes), la voie de l'hydroperoxyde lyase (HPL) formant les aldéhydes à chaînes courtes (qui peuvent être des phytoalexines volatiles) et la voie de la divinyl éther synthase (DES) (Feussner et Wasternack 2002; Shah 2005).

Afin de confirmer au niveau moléculaire les résultats de nos analyses enzymatiques et pour tenter de déterminer par quelle(s) voie(s) les hydroperoxydes produits lors de l'induction de résistance sont métabolisés, les changements de l'expression de certains gènes codants pour des enzymes impliquées dans la voie de la lipoxygénase ont été analysés dans les plants témoins et les plants traités par *B. subtilis* BC25. Plus particulièrement, notre attention s'est focalisée sur l'analyse de l'expression des gènes codant pour la lipoxygénase, l'allène oxyde synthase et l'hydroperoxyde lyase.

I.3.2.1. Clonage des cDNA

Afin de pouvoir réaliser les analyses d'expression différentielle par hybridation sur northern blot, certains cDNA correspondant aux enzymes impliquées dans la voie de la lipoxygénase ont été tout d'abord clonés.

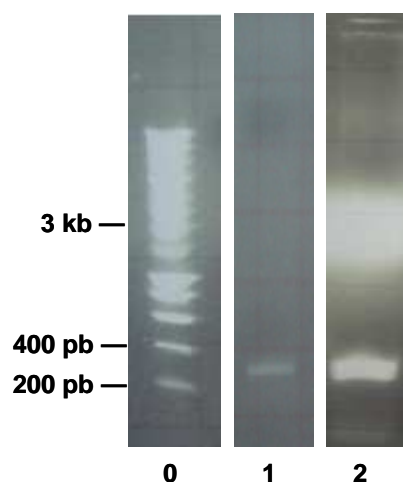
I.3.2.1.1. Clonage de fragment des gènes AOS

Il est connu que l'allène oxyde synthase (AOS) existe sous différents isoformes chez la tomate. Ces isoformes sont codées par une famille multigénique. Deux séquences sont actuellement disponibles dans Genbank avec une identité de 74% au niveau

nucléotidique. Sur la base d'alignement des deux séquences, nous avons choisi les amorces de façon à obtenir deux fragments de DNA qui s'hybrident de façon spécifique à chacun des deux isoformes, afin de pouvoir les différencier lors de l'hybridation sur northern blot.

Clonage du DNA AOS1

La synthèse de la sonde *AOS1* a été effectuée à partir de DNA génomique par PCR, en utilisant les amorces spécifiques AOS1 1F et AOS1 1R. Les séquences de ces amorces sont données dans le paragraphe II.10.1 du chapitre Matériel et Méthodes. Leur position sur le DNA permet l'amplification d'un fragment de 271 pb situé entre les bases 1430-1701 du gène *AOS1*. Après séparation des produits d'amplification par électrophorèse (Figure IV.6), la bande d'intérêt a été récupérée et insérée dans le vecteur pGEM-T Easy. Après introduction des plasmides recombinants dans *E. coli*, nous avons sélectionné un certain nombre de transformants. Les plasmides ont été purifiés et analysés par restriction et électrophorèse sur gel d'agarose. La restriction par *EcoRI* a permis d'obtenir le fragment attendu de 271 pb et correspondant à la longueur de la sonde *AOS1* (Figure IV.5).



Le séquençage (firme Génome Express, Grenoble, France) de ce plasmide a permis de confirmer présence d'une séquence de 271 pb correspondant à la sonde *AOS1* détaillée ci-

après. La séquence DNA complète du gène *AOS1* est accessible dans « GenBank » sous la référence AF230371.

```
CTACAGTGGGGAATAAACAGTGC GCCGGAAAAGATTTCGTTGTGATGGTTTCGAGATTAT  
TCGTAACGGAGTTTTTTCTCCGTTACGGTACACTCAACGTCGACGTTGGCACGTCGGCGT  
TAGGGTCTTCAATTACTATTACTTCTTTGAAAAAAGCTTAATTTTAAATCGAGGTCGAGA  
TCGAGATCGAAATTTGGTCTACACTGTCACTATCGGCCAGTGTATGTGTTGTTTGTAAATT  
ATAATTTAGTAATGTTTTACAAAATGGGTG
```

Clonage de DNA *AOS2*

Comme pour la sonde *AOS1*, la synthèse de sonde *AOS2* a été effectuée à partir de DNA génomique par PCR, en utilisant les amorces spécifiques *AOS2* 1F et *AOS2* 1R. Leur position sur le DNA permet l'amplification d'un fragment de 310 pb du gène *AOS2*. Après séparation des produits d'amplification par électrophorèse (Figure IV.7), la bande d'intérêt a été récupérée et clonée dans le vecteur pGEM-T Easy. Comme pour *AOS1*, les plasmides recombinants ont été tout d'abord vérifiés par restriction par *EcoRI* et électrophorèse sur gel d'agarose. Le fragment d'environ 310 pb correspondant à la sonde *AOS2* a été observé (Figure IV.7).

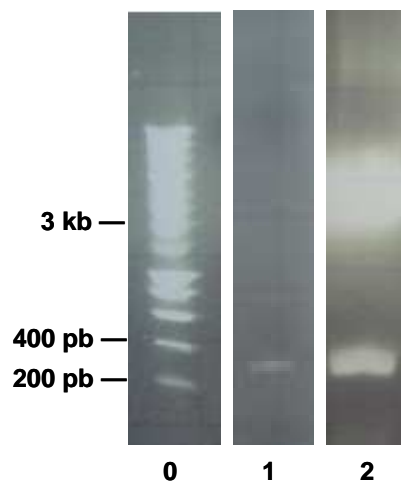


Figure IV.7. Électrophorèse sur gel d'agarose 1% non dénaturant. Puits 1 : fragment de 310 pb du gène *AOS2* de tomate obtenu par PCR. Puits 2 : produit de restriction *EcoRI* du plasmide pGEM-T Easy dans lequel a été cloné le fragment de 310 pb du gène *AOS2*. Puits 0 : Smart Ladder (marqueur de poids moléculaire).

Le séquençage de ce plasmide a permis de confirmer présence d'une séquence de 310 pb correspondant à la sonde *AOS2* détaillée ci-après. La séquence DNA complète du gène *AOS2* est accessible dans « GenBank » sous la référence AJ271093.


```
TTGAACTCAACCTTCGCTTGTG AACAAAAGTCAAGAGTTCAATTCTTGATTTTTTTCTA
ATAGAAATGGCATCAACTTCTCTTTCTCTTCCTTCTCTTAAGCTACAATTCCCCTCGCAT
ACATCATCATCTTCTCGTAAAAATTCATCGTCTTATCGTGTTAGTATTCGTCCCATTTCAG
GCTTCGGTGTCTGAGATACCACCTTACATTTTCATCACCATCACAATCACCATCATCATCG
TCATCACACCTGTTAAACAAGCGAAACTCCCAGCCCCAAAAGTC CCTGGAGATTATGCAC
TACCATTAG
```

I.3.2.1.2. Clonage d'un fragment de cDNA *HPL*

Comme pour les sondes *AOS1* et *AOS2*, la synthèse de la sonde *HPL* a tout d'abord été effectuée à partir de DNA génomique de tomate par PCR. Cette synthèse a toutefois échoué, ce qui pourrait être lié à la présence d'introns dans le gène *HPL*. Afin de remédier ce problème, la sonde *HPL* a été synthétisée par RT-PCR, à partir de RNA de plants de tomate traités avec *B. subtilis* M4. Le cDNA premier brin de la sonde a été synthétisé par transcription inverse, en utilisant l'amorce *HPL* 1F. La synthèse des cDNAs doubles brins a été ensuite effectuée par PCR en utilisant les deux amorces spécifiques *HPL* 1F et *HPL* 1R. Leur position permet l'amplification d'un fragment de 450 pb du cDNA *HPL*.

Après séparation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel agarose (Figure IV.8), nous avons obtenu la bande d'intérêt de 450 pb. Nous avons ensuite suivi les mêmes étapes que celles décrites pour le clonage des sondes *AOS*. Le produit de digestion des plasmides recombinants a donné le fragment d'environ 450 pb attendu et correspondant à l'insertion de la sonde *HPL* (Figure IV.8).

Le séquençage de ce plasmide a permis de confirmer présence d'une séquence de 450 pb correspond à la sonde *HPL*. La séquence cDNA complète est accessible dans « GenBank » sous la référence AF230372. La séquence de la sonde *HPL* est détaillée ci-après :

```
CTCCTCTATCAACTCCGGCG CCGGTTACTCTGCCCGTCCGTTTCGATTCCGGGCAGCTACG
GATTGCCGTTAGTAGGGCCAATCGCGGATCGATTAGACTACTTCTGGTTCCAAAAACCGG
AAAACCTTCTTCACCAAGAGAATGGAAAAGCACAAGAGCACGGTTTTTCAGAACGAACGTGC
CGCCGTGTTTTCCGTTTTTCGGTAGTGTGAATCCAAATGTGGTGGCGGTTTTAGATGTGA
AATCGTTTTCGCATCTGTTTGATATGGAGATTGTAGAGAAAGCTAATGTGCTTGTGGGG
ATTTTCATGCCAGTGTGTTTATACTGGAGATATGCGTGTGTTGTGCTTATCTCGATACTT
CTGAACCTAAACATGCCAGATTAAGAATTTTTTCACAGGATATTCTAAAAGAGGCTCAA
AAACATGGGTGCCTACACTACTTAAAGAGCT
```

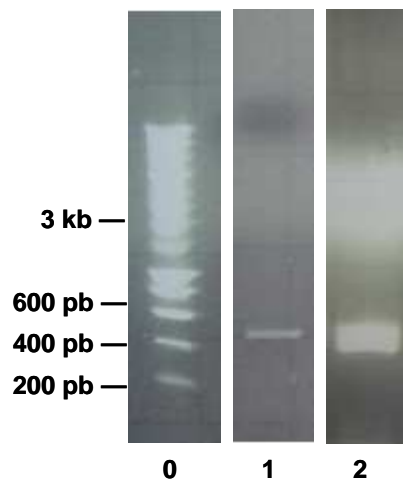


Figure IV.8. Électrophorèse sur gel d'agarose 1% non dénaturant. Puits 1 : fragment de 450 pb du gène *HPL* de tomate obtenu par PCR. Puits 2 : produit de restriction *EcoRI* du plasmide pGEM-T Easy dans lequel a été cloné le fragment de 450 pb du gène *HPL*. Puits 0 : Smart Ladder (marqueur de poids moléculaire).

I.3.2.1.3. Clonage d'un fragment de cDNA *Lox*

La *Lox* existe sous différents isoformes chez la tomate. A l'heure actuelle, cinq isoformes ont été identifiés et séquencés. Ce sont les isoformes *LoxA*, *LoxB* (Ferrie et al. 1994), *LoxC*, *LoxD* (Heitz et al. 1997) et *LoxE*. Les trois isoformes A, B et E sont relativement proches entre eux, alors que les deux isoformes C et D semblent plus éloignés. Chaque isoforme semble être régulée différemment et pourrait donc avoir des fonctions distinctes. Afin de déterminer quelle(s) isoforme(s) est (sont) responsable(s) de l'augmentation d'activité LOX suite à infection, nous avons examiné le niveau d'expression de chacun d'eux. Les trois sondes *LoxA*, *B* et *D* sont disponibles au laboratoire. Les trois séquences cDNA complètes sont accessibles dans « GenBank » sous les références U09026, U09025 et U37840 respectivement. Leurs séquences sont détaillées ci-après :

LoxA :

Cette sonde correspond aux positions 148-1048 pb de la séquence cDNA complète.

TCTAGATTTTACTGATCTTGCTGGCTCTTTGACTGATAAAAATCTTTGAAGCCCTTGGCCA
AAAGGTTTCTTTTCAATTAATTAGTTCTGTTCAAAGTGATCCTGCAAATGGCTTACAAGG
GAAACATAGTAATCCAGCCTATTTGGAGAAGCTTTCTCCTTACTCTAACACCATTAGCAGC
TGGTGAAACAGCCTTTGGTGTACATTTGATTGGAATGAGGAGTTTGGAGTTCCAGGTGC
ATTTGTCATAAAAAATATGCATATCAATGAGTTCTTTCTCAAGTCACTCACACTTGAAGA
TGTGCCTAATCATGGCAAGGTCCATTTGTTTTGCAATTCTTGGGTTTATCCTTCTTTTAG
ATACAAATCAGATAGAATTTTCTTTGCAAATCAGCCATATCTCCCAAGTGAAACACCAGA
GCTTTTGCGAAAATACAGAGAAAATGAATTGGTAAACATTAAGAGGAGATGGAACGGAAA
GCGCGAGGCGTGGGATAGGATTTATGACTATGATGTCTACAATGACTTAGGTAATCCTGA
TCAAGGTAAAGAAAATGTTAGAACTACCTTAGGAGGTTCTGCTGACTACCCGTATCCTCG
GAGAGGAAGAACTGGTAGACCACCAACACGAACAGATCCTAAAAGTGAAAGCAGGATTCC
ACTTATTCTGAGCTTAGACATCTATGTACCGAGAGACGAGCGTTTGGTCACTTGAAGAT
GTCAGACTTCCTAACATATGCATTGAAATCCATTGTTCAATTCATCCTCCCTGAATTACA
TGCCTTGTGTTGATGGTACCCCTAACGAGTTCGATAGTTTTGAGGATGTACTTAGACTATA
TGAAGGAGGGATCAAACCTCCTCAAGGACCTTTATTTAAAGCTCTTACTGATGCTATTCC
T

LoxB :

Cette sonde correspond aux positions 585-1436 pb de la séquence cDNA complète.

AAGCTTGAAGAATGGGACAGGGTTTATGATTATGCTTGCTACAATGACTTGGGTGAACCA
GATAAGGGGGAAGAGTATGCTAGGCCTATCCTTGGAGGGTCTCTGAGTACCCGTATCCT
CGTAGAGGCAGGACAGGCCGGAACCAACAAAGCAGATCCTAATTGCGAGAGCAGGAAC
CCATTGCCTATGAGCTTAGACATATATGTCCCAAGGACGAGCGATTTGGTCATGTGAAG
AAGTCAGACTTTTTTGACGTCGTCCTTAAAATCCTCTTTGCAAACGCTCCTCCCTGCGTTT
AAGGCTTTGTGCGATAACACGCCTAATGAGTTCAATAGCTTTGCGGATGTACTTAATCTC
TATGAAGGAGGAATCAAGTTGCCTGAAGGCCCTTGGTTGAAAGCCATTACTGATAACATT
TCCTCAGAGATACTAAAAGACATCCTTCAAACGGATGGTCAAGGCCTACTTAAGTACCCA
ACTCCTCAGGTTATTCAAGGCGATAAACTGCATGGAGGACGGATGAAGAATTTGGGAGA
GAAATGTTGGCAGGATCCAATCCTGTCTTAATCAGTAGACTCCAAGAATTTCTCCGAAG
AGCAAGTTGGATCCAACCATATATGGAAACCAAAACAGTACAATTACCACAGAACATGTA
CAGGATAAGTTGAATGGATTAACAGTGAATGAGGCAATCAAGAGTAACAGGTTATTCATA
TTGAACCACCATGACATCGTGATGCCACTATTGAGGAAAATTAACATGTCAGCAAACACA
AAAGCCTATGCCTCAAGAACTCTGCTCTTCTTACAAGATGATAGAACTTTGAAGCCACTA
GCAATTGAACTA

LoxD :

Cette sonde correspond aux positions 44-604 pb de la séquence cDNA complète.

```
GAATTCGGCACCCGATTTCCCTCTCTACCCAAATTCATTAGCAAGAGAAAAAGCAACGTA
AATTAAGAGAGAACATTATTATGGCACTTGCTAAAGAAATTATGGGTATTTCCCTGCTG
GAGAAATCATCATCAATGGCACTTTTGAATCCCAATAATTATCACAAAGAAAATCATCTT
TGGTTTAACCAGCAGTTTCAAGGAAGGAGGAATTTAAGTAGAAGAAAAGCGTACAGACAG
AGTACCATGGCAGCTATAAGTGAAAATTTGGTCAAAGTTGTGCCTGAAAAAGCAGTGAAA
TTCAAAGTGAGAGCTGTAGTTACAGTAAGGAACAAGAACAAGGAAGATCTAAAGGAGACA
ATTGTGAAGCATCTTGATGCTTTACCCGACAAAATCGGGAGGAATGTCGCGCTAGAACTC
ATCAGCACCGACATCGATCCAGATACAAAAGGACCGAAGAAAAGCAACCAAGCAGTGTTA
AAAGACTGGTCTAAGAAATCGAACTTGAAAACAGAGCGAGTAAATTACACAGCAGAATTC
ATTGTGGACTCGAATTTTCGGG
```

Nous avons donc entrepris de cloner une séquence *LoxC*. Les amorces spécifiques de cet isoforme sont choisies sur base d'alignements pour obtenir une sonde qui soit spécifique à *LoxC*.

Clonage d'un fragment de cDNA *LoxC*

Comme dans le cas de la synthèse de la sonde *HPL*, la synthèse de la sonde *LoxC* à partir du DNA génomique a échoué. Afin d'éviter le problème des introns, nous avons utilisé des RNA de tomate exposée au méthyl-jasmonate (MeJA) pour synthétiser cette sonde par RT-PCR. Généralement, le traitement des plants de tomate avec le MeJA induit la transcription du gène *LoxC* (Heitz *et al.* 1997). Deux amorces spécifiques pour la sonde *LoxC* (*LoxC* 1F et *LoxC* 1R) ont été utilisées. Mais cette synthèse à partir de RNA de tomate exposée au méthyl-jasmonate nous a conduit à obtenir une séquence présentant une identité de 82% avec la séquence correspondante de *LoxC*. Cette séquence sera détaillée plus loin. Nous avons répété la synthèse de la sonde *LoxC* mais en utilisant des RNA de plants de tomate traités avec *Bacillus subtilis* M4. Le cDNA premier brin de la sonde a été synthétisé par transcription inverse en utilisant l'amorce *LoxC* 1F. La synthèse des cDNAs doubles brins a été ensuite effectuée par PCR en utilisant les deux amorces spécifiques *LoxC* 1F et *LoxC* 1R. Leur position permet l'amplification d'un fragment de 506 pb du cDNA *LoxC*.

Après séparation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel agarose, nous avons obtenu la bande d'intérêt de 506 pb (Figure IV.9).

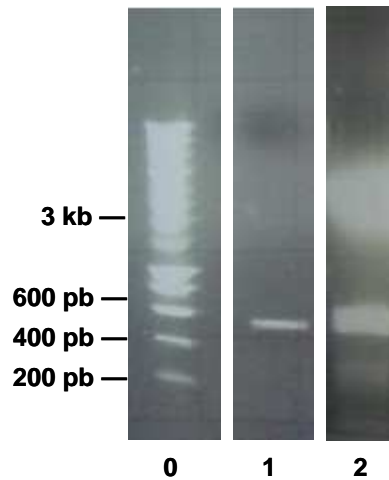


Figure IV.9. Électrophorèse sur gel d'agarose 1% non dénaturant. Puits 1 : fragment de 506 pb du gène *LoxC* de tomate obtenu par PCR. Puits 2 : produit de restriction *EcoRI* du plasmide pGEM-T Easy dans lequel a été cloné le fragment de 506 pb du gène *LoxC*. Puits 0 : Smart Ladder (marqueur de poids moléculaire).

Après clonage et vérification du plasmide recombinant par restriction, le plasmide contenant la sonde insérée a été séquencé et une séquence de 506 pb correspond à la sonde *LoxC* a été obtenue. La séquence cDNA complète est accessible dans le « GenBank » sous la référence U37839. La séquence de la sonde *LoxC* est détaillée ci-après :

```

ATCCTAGAAGGTGTAGAACCGGTCGACAAAGAAGTAAAAAAGATCCATTATATGAAACAA
GGAGTACCTTTGTGTATGTACCAAGAGATGAAGCATTTTCAGCAGTGAAGAGTTTAACAT
TCTCCGGCAACACCGTTTACTCCGCCCTACACGCGTGGTGCCGGCATTGGAATCAGTCG
TATCCGATCCCGACCTAGGGTTTCCACATTTTCCGGCCATTGACTCGCTTTTCAATGTGG
GTGTCGATCTTTCAGGACTTAGTGATAAAAAAAGTAGCCTTTTTAACATCGTACCAAGGC
TTATTAAGTCTATTTCTGAAACCGGAAAAGATGTCTTGCTCTTTGAATCCCCTCAATTGG
TCCAAAGGGACAAATTTTCTTGGTTTAGAGATGTGGAATTTGCTAGACAAACCTTAGCTG
GTTTGAATCCATAAGTATCCGATTGGTTACGGAATGGCCATTGAGGAGCAATCTAGACCC
TAAGGTGTCCTGGACCTCCAGAATCA
    
```

Clonage d'un fragment du cDNA *LoxF*

Comme il a été mentionné plus haut, en tentant de cloner un fragment du cDNA de *LoxC* à partir de RNA de tomates exposées 24 heures au méthyl-jasmonate (MeJA), nous avons, par hasard, obtenu une nouvelle séquence présentant une identité de 82% avec *LoxC*. Cette séquence a été appelée *LoxF*.

Le cDNA premier brin de la sonde *LoxF* a été synthétisé par transcription inverse en utilisant l'amorce LoxC 1F. La synthèse des cDNAs doubles brins ont été ensuite effectuée par PCR en utilisant les deux amorces spécifiques LoxC 1F et LoxC1R. Après séparation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose, nous avons obtenu la bande d'intérêt de 500 pb (Figure IV.10).

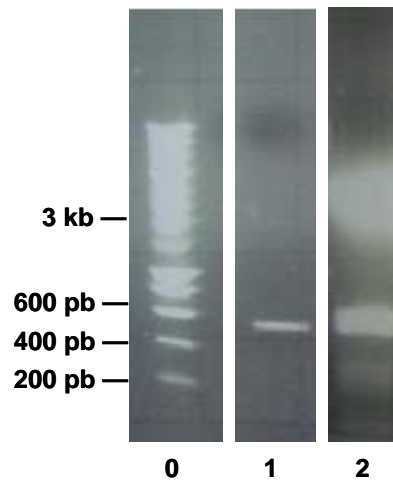


Figure IV.10. Électrophorèse sur gel d'agarose 1% non dénaturant. Puits 1 : fragment de 500 pb du gène *LoxF* de tomate obtenu par PCR. Puits 2 : produit de restriction *EcoRI* du plasmide pGEM-T Easy dans lequel a été cloné le fragment de 500 pb du gène *LoxF*. Puits 0 : Smart Ladder (marqueur de poids moléculaire).

Après clonage et vérification du plasmide recombinant par restriction, celui-ci a été séquencé et une séquence de 500 pb correspondant à la sonde *LoxF* a été obtenue. Cette séquence est détaillée ci-après :

```
TGATTCTGGAGGTCCAGACACCTCAGGGTCTAGCTTGCTCTTCAATGGCCATTCCCTAAC
CAATCGTATACTATATGGATTCAAACCAGCTAAGGTTTGACGAGCAAATTCCACATCTCT
AAACCATGCAAATTTGTCCTTTTCAAGAAATTCAGGAGTTTCAAAAAGCAAGACATCTTT
TCTTGTTTCAGAAATAGCCCTAATGAGCCTTCGTATAATCGAAAAAAGGCTATTTGTTTG
AAGTGCCGGAAGTTCTACTTCGACGTTGTAAAGTGAGTCGATGGCCGAAAATGGGGAAA
TCCGAGATCGCGGTCTGTGATGATCGATTGCAACCCTGGCACTACCGCGTGTAGGACCGC
GTAAATGGTGTTCCTGAGAATGATAAGTCCTTCACTTCTGAAAATGCTTCATCTCTTTGG
TACATAAGTAAAGTCACCCTTTGATTTCGGATAATGGATCTTTTTTCACTTCTTGCTC
GGTTCTACACCTTCTAGGAT
```

I.3.2.1.4. Détermination de la taille du mRNA *LoxF*

Grâce à l'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire pour RNA (Promega), nous avons pu estimer la taille du mRNA correspondant à la sonde *LoxF* découverte. En pratique, la sonde *LoxF* s'hybride sur un mRNA présentant une taille de 2,9 kb approximativement. La synthèse du cDNA complet par RACE-PCR est en cours de réalisation au laboratoire de Biologie Moléculaire et Biotechnologie Végétale.

I.3.2.2. Hybridation sur Northern Blot

Les RNAs totaux issus des troisièmes feuilles de tomates témoins et d'autres traitées avec *B. subtilis* BC25 ont été analysés. Les feuilles détachées de tomate ont été prélevées avant l'infection par *B. cinerea*, ainsi que 48 et 96 heures après l'infection. Les RNA totaux ont été extraits et séparés par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant. L'expression des gènes *Lox A, B, C, D* et *F* a été examinée par hybridation sur Northern blot, en utilisant les sondes cDNA que nous avons construites ainsi que celles disponibles au laboratoire de Biologie Moléculaire et Biotechnologie Végétale.

I.3.2.3. Hybridation des sondes *LoxA* et *LoxB*

Dans deux expériences indépendantes, les deux sondes *LoxA* et *LoxB* ont été hybridées sur northern blot. Les RNA de fruits de tomates mûres ont été utilisés comme des témoins positifs. En effet, il a été montré que ces deux formes sont surexprimées dans les fruit mûrs (Ferrie *et al.* 1994). Les résultats de ces deux expériences étaient identiques. La figure IV.11 (A et B) illustre les profils d'hybridation obtenus avec ces sondes dans une expérience. Aucune hybridation n'est observée, ni pour les échantillons témoins ni pour les traités. Nous observons également que le témoin positif montre une très faible expression du gène *LoxA*. Ce résultat indique donc que les deux gènes *LoxA* et *LoxB* ne sont pas exprimés dans les feuilles de tomate en réponse au traitement avec BC25. Ces gènes ne semblent donc pas impliqués dans l'ISR observée chez la tomate traitée avec BC25.

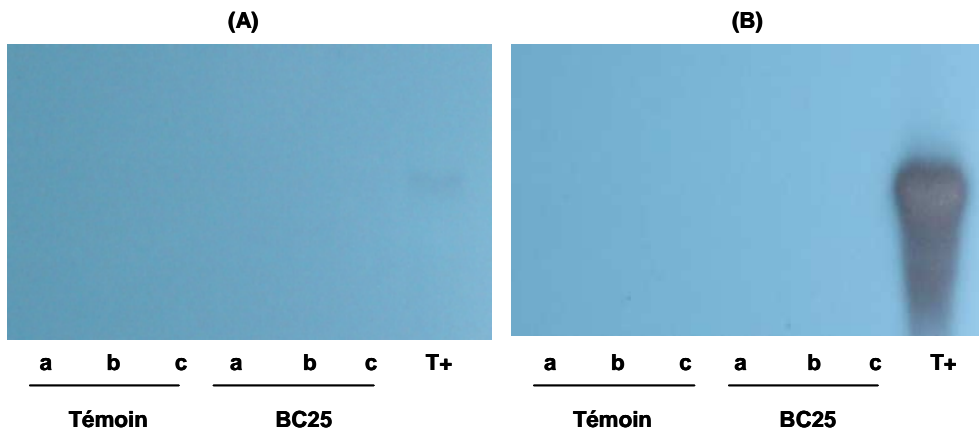


Figure IV.11. Profils d'hybridation obtenus avec les sondes *LoxA* (A) et *LoxB* (B) après électrophorèse et Northern blot. Les analyses ont été effectuées sur des RNA totaux des plants témoins et traités avec BC25. Puits (a) : juste avant l'infection par *B. cinerea*, puits (b) et (c) : 48h et 96h après infection respectivement et puits (T+) : témoin positif (fruits de tomates mûrs).

I.3.2.4. Hybridation de la sonde *LoxC*

Afin d'examiner si le gène *LoxC* joue un rôle important dans l'ISR chez la tomate, deux expériences indépendantes ont été effectuées. Les RNAs ont été extraits à partir de feuilles provenant des plants témoins et des plants traités avec BC25, avant infection, ainsi que 48 et 96 heures après l'infection par *B. cinerea*. Des RNA de fruits de tomate mûrs ont été utilisés comme témoin positif car l'expression de *LoxC* est maximale au cours du mûrissement des fruits de tomate (Heitz *et al.* 1997; Chen *et al.* 2004). Les résultats de ces deux expériences montrent un très faible niveau de transcription de *LoxC* dans tous les échantillons, témoins et traités par BC25, que ce soit avant ou après l'infection (Figure IV.12). Par contre un niveau élevé d'expression est observé dans les fruits mûrs. Le gène *LoxC* n'est donc pas exprimé chez la tomate ni en réponse au traitement par BC25, ni en réponse à l'attaque par le pathogène.

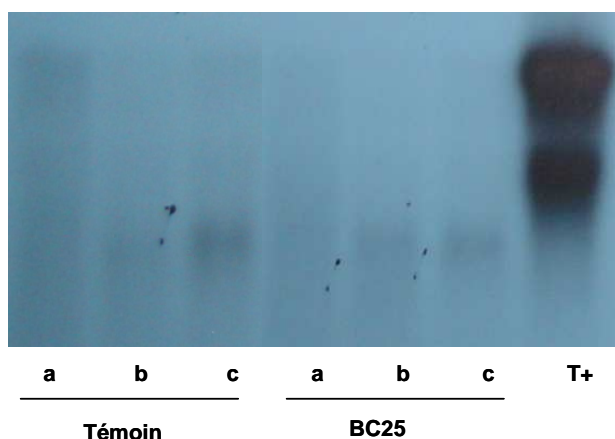
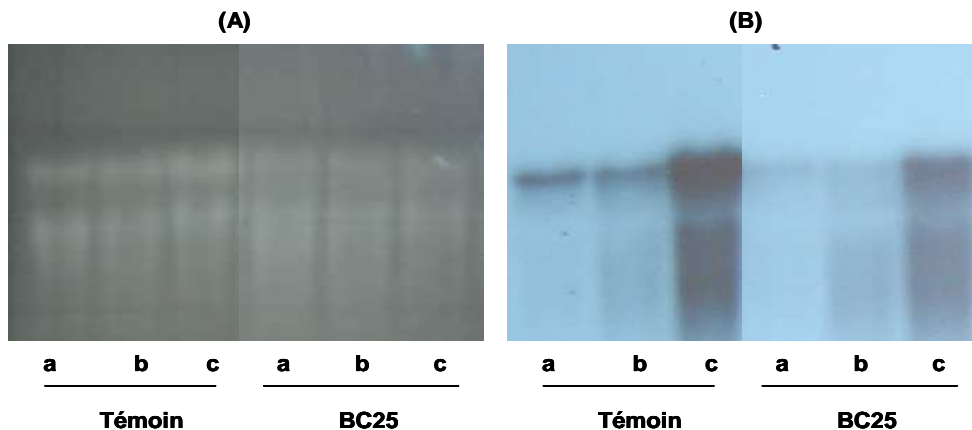


Figure IV.12. Profils d'hybridation obtenus avec la sonde *LoxC* après électrophorèse et Northern blot. Les analyses ont été effectuées sur des RNA totaux des plants témoins et traités avec BC25. Puits (a) : juste avant l'infection par *B. cinerea*, puits (b) et (c) : 48h et 96h après infection respectivement et puits (T+) : témoin positif (fruits de tomate mûrs).

I.3.2.5. Hybridation de la sonde *LoxD*

Le gène *LoxD* montre un faible niveau de transcription dans les fruits mûrs, mais s'exprime dans les feuilles de tomate en réponse à la blessure (Heitz *et al.* 1997; Chen *et al.* 2004). Ce gène mène vers la voie de défense des octadécanoïdes. Nous avons donc voulu de voir si ce gène pourrait jouer un rôle important dans l'ISR chez la tomate.

Une expérience a été effectuée. Les RNAs extraits à partir des feuilles de tomates témoins et traités avec BC25 ont été hybridés avec la sonde *LoxD*. Nous observons que l'expression du gène *LoxD* est plus forte dans les feuilles de tomates témoins que dans les traitées, que ce soit avant ou après l'infection par *B. cinerea*. La visualisation sous U.V. du gel d'agarose a révélé que la quantité de RNA chargé pour les échantillons traités par BC25 était nettement inférieure à celle chargé pour les échantillons témoins. Mais quel que soit le traitement, on remarque que l'expression est induite en réponse à l'infection surtout 96 heures après celle-ci. (Figure IV.13). Quoiqu'il en soit, ce résultat suggère que l'isoforme *LoxD* ne semble pas être impliquée dans l'ISR observée chez la tomate traitée par BC25.



I.3.2.6. Hybridation de la sonde *LoxF*

L'expression du gène correspondant au nouvel isoforme *LoxF* a été analysée dans deux expériences indépendantes. Les feuilles détachées de tomate ont été récoltées: juste avant l'infection par *Botrytis cinerea*, et ensuite 48 et 96 heures après l'infection. Les RNA extraits à partir de ces feuilles provenant des plants témoins et traités par BC25 et ainsi que des RNA de tomates exposées au méthyl-jasmonate (témoin positif) ont été hybridés par la sonde *LoxF*.

Un fort signal d'hybridation est observé sur les RNA provenant de plantes traitées au méthyl-jasmonate. Nous observons que, avant l'infection par *B. cinerea*, l'expression du gène *LoxF* est au même niveau chez tous les plants, traités ou non par *B. subtilis* BC25. Mais après l'infection, nous remarquons que l'expression de ce gène est fortement stimulée chez les plants traités avec BC25 par rapport à ce que l'on observe chez les témoins (Figure IV.14B). Ces résultats suggèrent que le produit du gène *LoxF* pourrait être impliqué dans la résistance systémique induite chez les plants de tomate traités avec BC25.

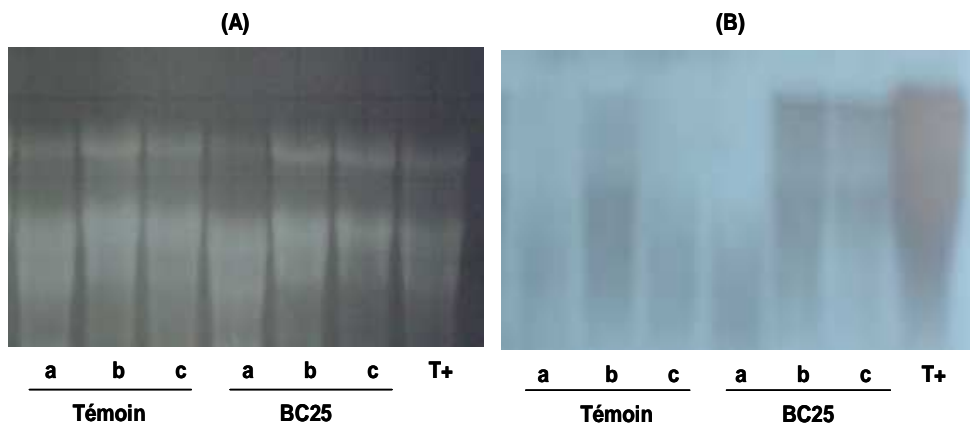


Figure IV.14. (A) : Vérification de la qualité des RNAs chargés (20 µg) par une électrophorèse sur gel d'agarose 1% dénaturant par fluorescence le bromure d'éthidium et visualisation sous U.V. Les RNAs totaux ont été extraits à partir des troisième feuilles des plants de tomate témoins et traités par *B. subtilis* BC25 rassemblées juste avant l'inoculation du pathogène (puits a), ainsi que 48h et 96h après l'infection par *B. cinerea* (puits b et c) respectivement (B) : Profils d'hybridation obtenus avec la sonde *LoxF* après électrophorèse et Northern blot. Puits (T+) : témoin positif (tomate exposée 24 heures au méthyl-jasmonate).

II. Etude de l'induction de résistance systémique chez les plantes par *Pseudomonas putida* BTP1

Dans la deuxième partie de ce travail, les mécanismes de défense induits par une souche de *Pseudomonas* ont été étudiés dans deux pathosystèmes. En effet, des travaux antérieurs ont déjà démontré la capacité de la souche *P. putida* BTP1 à induire une résistance systémique chez le haricot et le concombre infectés par *B. cinerea* (Ongena *et al.* 2002a; Ongena *et al.* 2004) et *Pythium aphanidermatum* (Ongena *et al.* 1999; Ongena *et al.* 2000) respectivement. Nous avons voulu étudier cet effet protecteur de la souche BTP1 dans deux autres pathosystèmes : tomate/*B. cinerea* et concombre/*Colletotrichum lagenarium* et évaluer dans quelle mesure certains mécanismes de défense pouvaient y être associés.

II.1. L'ISR chez la tomate

II.1.1. Evaluation de la protection

Le même protocole appliqué pour évaluer la protection conférée à la tomate traitée par *B. subtilis* BC25 a été utilisé pour évaluer l'effet protecteur de *P. putida* BTP1. Quatre expériences ont été effectuées avec les bactéries inoculées au niveau des racines. Les infections par *B. cinerea* ont été effectuées sur les 3^{èmes} feuilles détachées de plants âgés de cinq semaines. L'incidence de la maladie a été évaluée en termes de pourcentage des lésions de *B. cinerea* qui se sont clairement développées hors zone d'inoculum (Figure IV.1A). Les résultats du taux d'infection global et de la réduction de la maladie étaient semblables et significatifs entre ces quatre expériences. En moyenne, nous avons observé une réduction de la maladie chez les plantes traitées avec *P. putida* BTP1 48 et 96 heures après l'infection de 47% et 32% respectivement en comparant avec les plants témoins. La Figure IV.15 illustre l'évolution de la maladie dans les plants témoins et d'autres traités avec BTP1 dans une expérience représentative.

Des études précédentes ont démontré que la souche *P. putida* BTP1 est une colonisatrice efficace de la rhizosphère du haricot et du concombre après son application sur les racines mais elle ne migre pas dans la plante (Ongena *et al.* 1999; Ongena *et al.* 2002a). Dans ce travail, la population bactérienne sur des racines de tomate a été estimée en utilisant un isolat mutant résistant spontanément à la rifampicine (R75.3) comme décrit dans une étude précédente (Ongena *et al.* 2002a). L'estimation des cellules de R75.3 lors de l'infection par *B. cinerea* a montré une concentration de $3.0 \pm 2.1 \times 10^6$ cfu/g de racines. Il est ainsi évident que cette souche s'est rapidement établie et maintenue sur des racines de tomate. En outre, dans le cas de la tomate, les bactéries ne migrent vraisemblablement pas non plus vers les tissus foliaires puisque aucune colonie n'a été détectée après analyse des broyats de feuilles (seuil de détection de 1000 CFU). L'agent inducteur et le phytopathogène sont ainsi restés localisés sur différents organes prouvant ici aussi que la suppression de la maladie est due à l'induction de la résistance systémique dans la plante hôte.

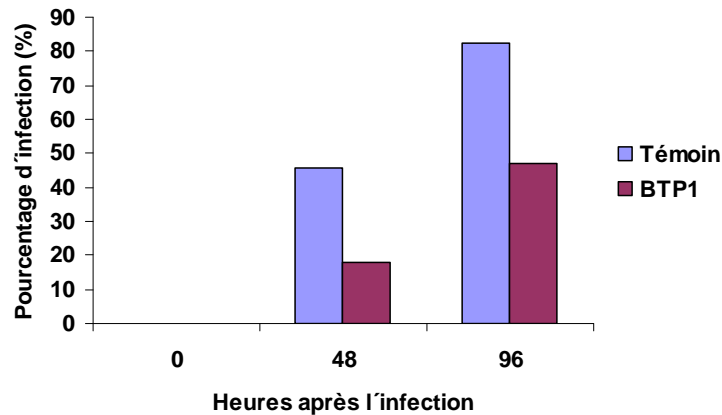


Figure IV.15. L'évolution de la sévérité de la maladie dans les plants de tomate témoins et d'autres traités avec *P. putida* BTP1 avant après infection par *B. cinerea*. Les bactéries ont été appliquées aux graines et au sol. Les plantes témoins ont été traitées avec une solution physiologique ($MgSO_4$ 0.01M). Les données représentées sont d'une expérience avec 90 feuilles par traitement. L'incidence de la maladie représente la somme de lésions de propagation qui se développant 48 et 96 heures après l'infection sur chaque plante individuelle dans le même traitement rapporté à tout le nombre d'emplacements d'infection.

Afin de déterminer si la résistance induite chez la tomate traitée par *P. putida* BTP1 est du type ISR ou SAR, nous avons examiné l'expression du gène *PR1a* (un marqueur de la SAR) par hybridation sur northern blot dans les plants traités par BTP1 vis-à-vis des témoins à différent temps : juste avant le détachement des feuilles, 24 heures après le détachement au moment de l'infection, 48 et 96 heures après l'infection par *B. cinerea*. La figure IV.16 montre clairement qu'aucune expression du gène *PR1a* n'est observée avant coupure que ce soit dans les plants témoins ou ceux traités avec BTP1. Par contre, il est clair que le gène *PR1a* a été stimulé tout d'abord par la coupure et ensuite de façon encore plus marquée par l'agression par le pathogène (Figure IV.16). L'expression du gène *PR1a* est donc semblable dans les plantes témoins et celles traitées par *P. putida* BTP1. Ce résultat suggère que la résistance systémique induite dans les plants traités par *P. putida* BTP1 n'est pas de type SAR, mais plutôt de type ISR.

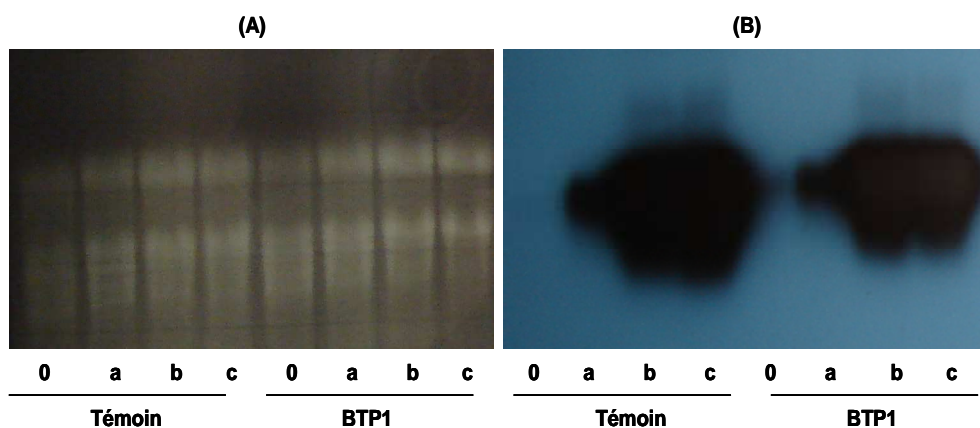


Figure IV.16. Expression du gène *PR1a* dans les plants de tomates témoins et dans les plants traités par *P. putida* BTP1. Les RNAs totaux ont été extraits à partir des troisième feuilles des plants de tomate rassemblées 24 h et 0 h avant l'inoculation du pathogène (puits 0 et a respectivement), ainsi que 48 h et 96 h après l'infection par *B. cinerea* (puits b et c) respectivement. (A) Vérification de la qualité des RNAs chargés (20 µg) par une électrophorèse sur gel d'agarose 1% dénaturant par fluorescence le bromure d'éthidium et visualisation sous U.V. (B) : Profils d'hybridation obtenus avec la sonde *PR1a* après électrophorèse et Northern blot.

II.1.2. Etude des mécanismes de la résistance induite chez la tomate par *P. putida* BTP1

II.1.2.1. Accumulation de composés fongitoxiques

L'accumulation de composés fongitoxiques, dénommés phytoalexines, dans les tissus végétaux est un mécanisme maintes fois associé au phénomène de la SAR, mais certains exemples d'accumulation de phytoalexines ou des enzymes hydrolytiques ont été rapportés dans le cas de l'ISR chez différentes plantes (Ongena *et al.* 2000; Nandakumar *et al.* 2001; Jeun *et al.* 2004; Saravanakumar *et al.* 2007).

Tout d'abord, nous avons voulu estimer l'éventuelle stimulation de la synthèse des phytoalexines chez la tomate en réponse à l'inoculation par la souche *P. putida* BTP1. Pour ce faire, des extraits méthanoliques de feuilles ont été préparés selon une méthode décrite dans la section II.3.1 du Matériel et Méthodes. Ces extraits ont d'abord subi une extraction liquide-liquide à l'hexane pour éliminer les molécules très hydrophobes. La phase aqueuse restante a subi une extraction à l'éther diéthylique pour extraire les

composés de polarité intermédiaire parmi lesquels des molécules antifongiques pourraient se retrouver. Une hydrolyse acide (par HCl 4N) sur la phase aqueuse permet de libérer les molécules qui se seraient accumulées sous des formes conjuguées. Ensuite, une nouvelle extraction avec l'éther diéthylique est réalisée comme la précédente. La méthode globale est décrite dans la partie II.3.2 du chapitre Matériel et Méthodes. Les trois extraits, provenant des plants témoins et des plants traités par BTP1 aux différents temps c'est à dire juste avant l'infection par *B. cinerea*, et ensuite 48h et 96h après l'infection, ont été testés par des biotests sur des plaques de TLC pour leur toxicité contre *Cladosporium cucumerinum* comme décrit dans le paragraphe II.3.4 du Matériel et Méthodes.

Quatre expériences ont été effectuées. Dans les deux premières expériences, les résultats des biotests comparatifs ont montré des zones de toxicité avant l'infection par *B. cinerea* dans les extraits hexane et éther diéthylique des plants pré-inoculés par BTP1 en comparaison avec les plants témoins. La figure IV.17 illustre cette accumulation différentielle des composés fongitoxiques qui a été observée avant l'infection, les zones de toxicité étant représentées par les taches blanches où la croissance du champignon est inhibée. Aucune différence significative entre les plants traités par BTP1 et les autres témoins n'a été notée pendant les quatre jours après l'infection. Les zones antifongiques dans l'extrait hexane et l'extrait éther diéthylique ont montré différentes valeurs de migration (Rf) et donc correspondent probablement à différentes molécules fongitoxiques. De plus, l'activité antifongique des extraits éther diéthylique après hydrolyse est beaucoup moins élevée que celle des extraits correspondants non hydrolysés, suggérant que dans ces deux expériences, la plupart des composés fongitoxiques synthétisés par les plants en réponse à l'élicitation sont directement produits sous une forme libre et active.

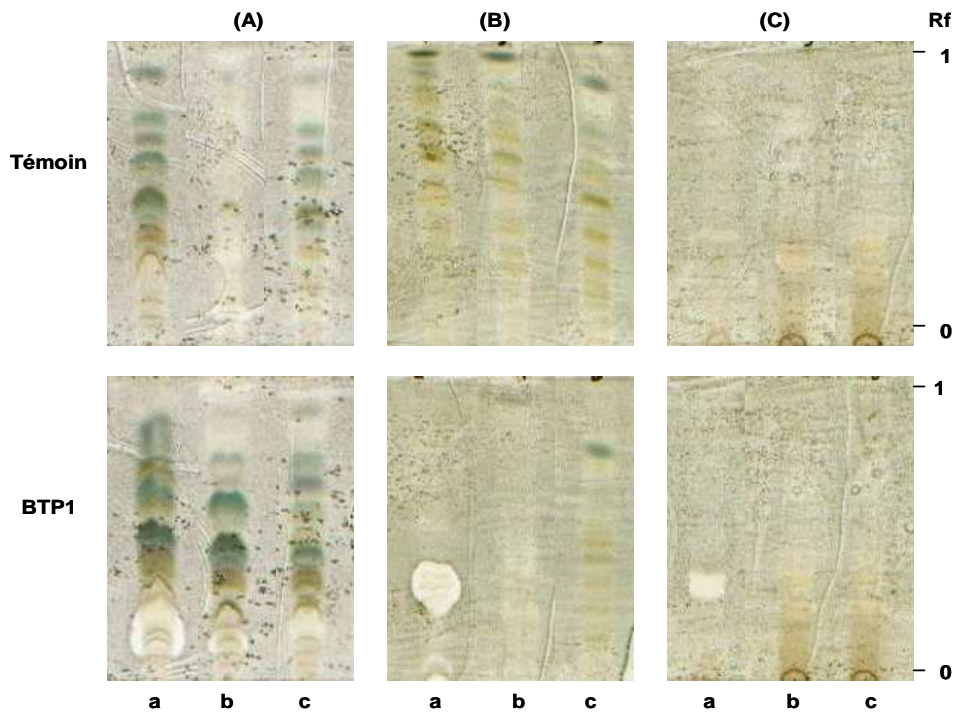


Figure IV.17. Séparation sur TLC des composés végétaux fongitoxique récupérés par extraction à l'hexane (A), à l'éther diéthylique (B) et à l'éther diéthylique après hydrolyse (C). Les échantillons analysés proviennent de plants de tomates témoins et traités par BTP1 récoltés juste avant l'infection (a), et ensuite 48h (b) et 96h (c) après l'infection par *B. cinerea*. 50 microlitres (correspondant à 50 mg de matériel végétal frais) ont été appliqués et la plaque de TLC a été développée avec un mélange de dichlorométhane : hexane : méthanol (6:4:1, v/v/v). Une suspension de spores de *C. cucumerinum* a été alors pulvérisée sur la plaque sèche. Les zones fongitoxiques (taches blanches) ont été visualisées après incubation pendant 48 heures.

Par contre, dans les expériences suivantes et contrairement aux deux premières expériences, nous avons observé des zones de toxicité sur la plaque de TLC dans les extraits éther diéthylique après hydrolyse correspondants aux plants traités avec *P. putida* BTP1 48 et 96 heures après l'infection par *B. cinerea* en comparant avec les témoins alors qu'il n'y a aucune différence entre les témoins et les traités avant l'infection (Figure IV.18). Pour ces dernières expériences, aucune toxicité sur TLC n'a été observée dans les extraits hexane et éther diéthylique avant hydrolyse ni chez les plants témoins, ni chez les plants traités par BTP1 (Figure IV.18). Ces résultats suggèrent que les composés fongitoxiques s'accumuleraient sous forme de conjugués dans les tissus des plants traités avec *P. putida* BTP1 après l'infection par *B. cinerea*.

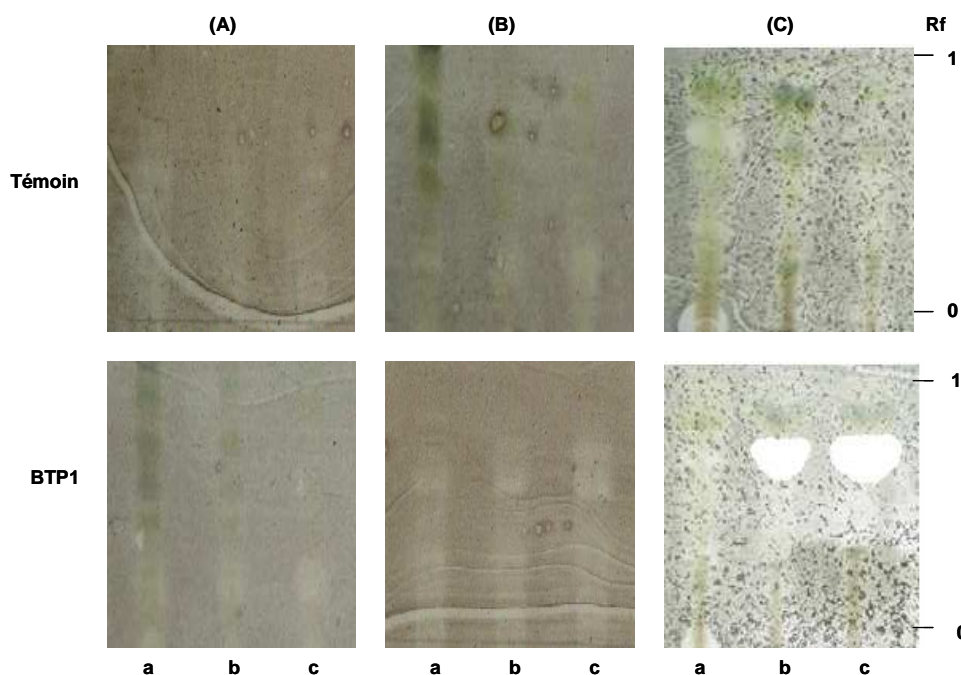


Figure IV.18. Séparation sur TLC des composés végétaux fongitoxique récupérés par extraction à l'hexane (A), à l'ether diéthylique (B) et à l'ether diéthylique après hydrolyse (C). Les échantillons analysés proviennent de plants de tomates témoins et d'autres traités par BTP1 récoltés juste avant l'infection (a), et ensuite 48h (b) et 96h (c) après l'infection par *B. cinerea*. 50 microlitres (correspondant à 50 mg de matériel végétal frais) ont été appliqués et la plaque de TLC a été développée avec un mélange de dichlorométhane : hexane : méthanol (6:4:1, v/v/v). Une suspension de spores de *Cladosporium cucumerinum* a été alors pulvérisée sur la plaque sèche. Les zones fongitoxiques (taches blanches) ont été visualisées après incubation pendant 48 heures.

Selon la valeur du Rf, la (les) molécule(s) antifongique(s) extraite(s) à l'ether diéthylique après hydrolyse a (ont) migré plus haut sur la TLC que celles observées dans l'extrait hexane et l'extrait ether diéthylique dans les deux premières expériences. La (les) composé(s) présent(s) dans les zones fongitoxiques de la figure IV.18 a (ont) été récupéré(s) avec du méthanol pur, et l'analyse par HPLC avec un appareillage équipé d'un détecteur à barrettes de diodes (voir paragraphe II.3.3 de matériel et méthodes) a mené à la détection d'une (de) molécule(s) correspondant au pic à 47 minutes. Le profil chromatographique représenté dans la figure IV.19A a été enregistré à 214 nm, longueur d'onde à laquelle le pic est le plus visible.

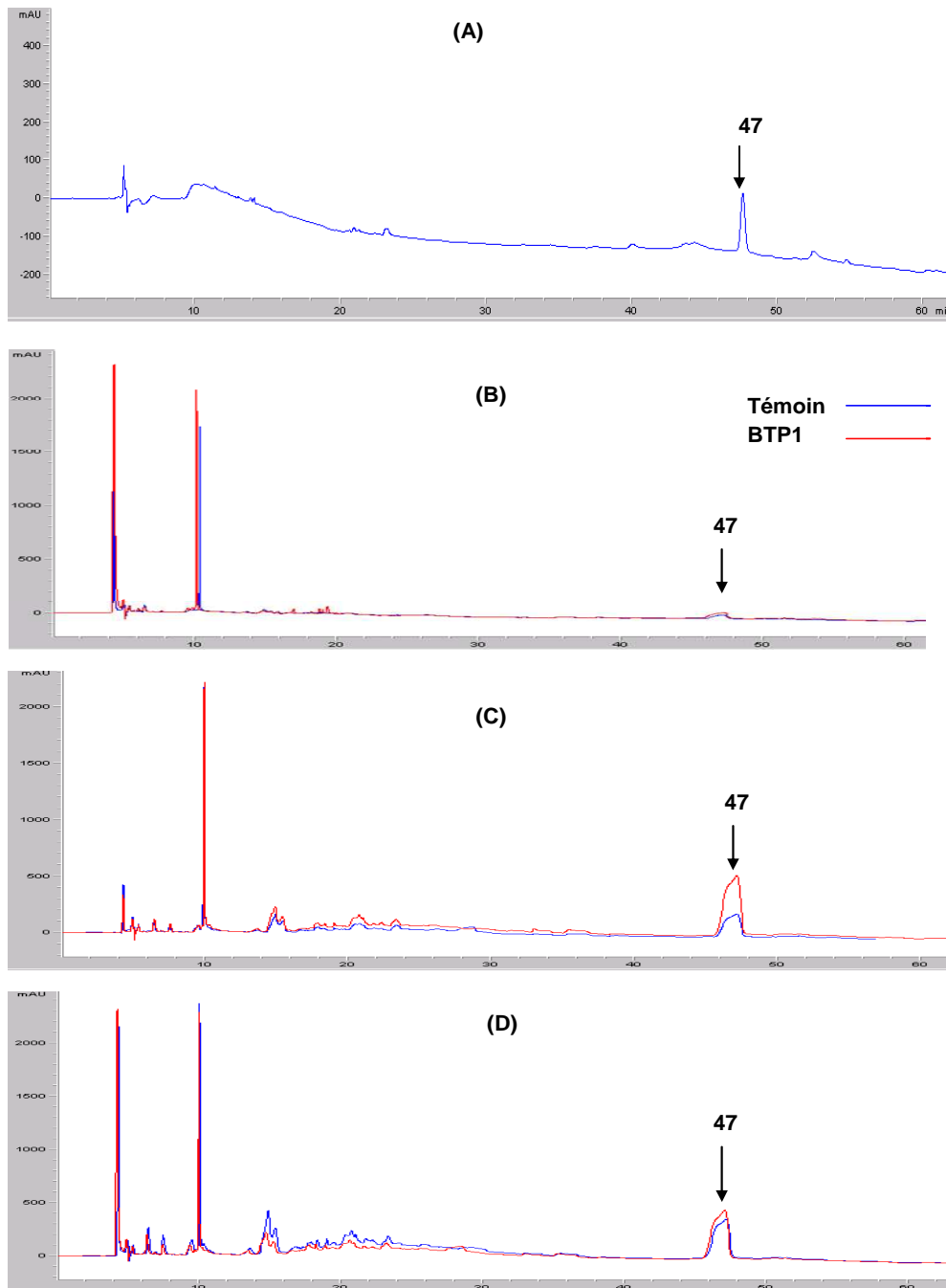


Figure IV.19. Profils HPLC obtenus pour l'extrait méthanol de la zone fongitoxique grattée de la TLC (correspondant à l'échantillon b plantes traitées par BTP1, Fig. 17) (A), des extraits après hydrolyse de matériel végétal récolté 0h, 48 et 96 heures après l'infection par *B. cinerea* (B, C et D) respectivement. 20 μ l d'échantillons (correspondant à 20 mg de poids frais de feuilles) provenant de plants témoins (en bleu) et de plants traités par BTP1 (en rouge) ont été injectés. L'absorbance a été mesurée à 214 nm.

D'autre part, tous les extraits bruts (hexane, éther diéthylique et éther diéthylique après hydrolyse) ont également été analysés par HPLC selon la même méthode. Nous avons seulement observé des quantités plus élevées de ce(s) composé(s) élué à 47 minutes dans l'extrait éther diéthylique après hydrolyse, aucune accumulation différentielle n'était visible dans tous les autres extraits. Les figures suivantes comparent les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des échantillons témoins et traités juste avant l'infection et 48 h et 96 h après l'infection (Figure IV.19 B, C et D).

Ces chromatogrammes montrent clairement l'augmentation de la taille du pic élué à 47 minutes plus rapide pour les plantes traitées par BTP1. Le graphique de la figure IV.20 illustre l'évolution de l'aire de ce pic et montre que ce composé s'accumule dans tous les plants dès l'infection. Cependant, alors que les aires des extraits témoins sont similaires avec celles des extraits traités avant l'infection, nous remarquons clairement une accumulation plus importante et plus rapide dans les plants traités par BTP1 par rapport aux plants témoins entre la 16^{ème} et la 48^{ème} heures. La figure IV.21 montre le spectre UV/visible du composé fongitoxique accumulé dans les tissus végétaux.

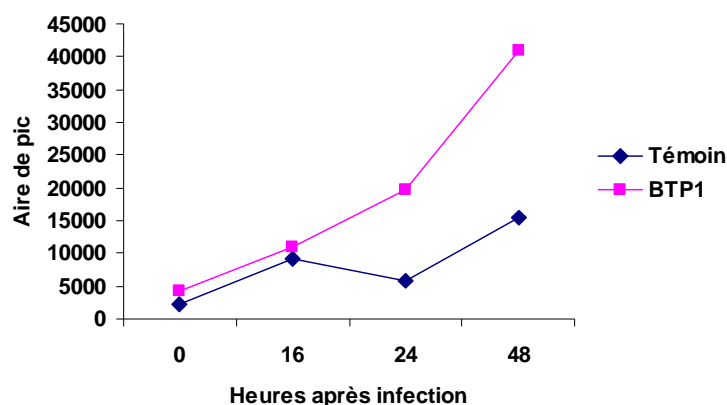


Figure IV.20. Évolution de la quantité du composé élué à 47 minutes lors de l'analyse HPLC des extraits éther diéthylique après hydrolyse de plants témoins et d'autres traités par BTP1 à partir du moment de l'infection par *B. cinerea*.

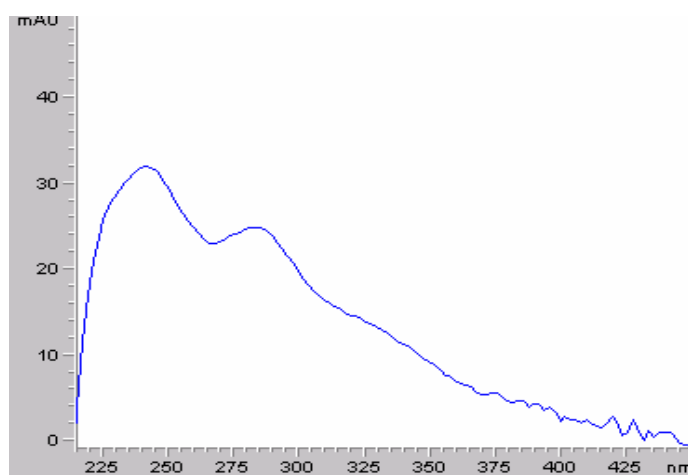


Figure IV.21. Spectre UV/visible du composé élué à 47 minutes lors de l'analyse HPLC des extraits hydrolysés.

Par la suite, des fractions ont été récoltées toutes les minutes lors de l'analyse de l'extrait éther diéthylique correspondant aux plants traités par BTP1 et récoltés 48 heures après infection par *B. cinerea*. Les fractions ont été concentrées et leurs activités fongitoxiques ont été testées contre *C. cucumerinum* sur TLC. Comme le montre la figure IV.22, seule la fraction contenant les molécules éluées entre 47 et 48 minutes est fongitoxique suggérant fortement qu'un seul composé à activité antifongique s'accumule de manière différentielle dans les plants traités par BTP1.

Afin de faire une première caractérisation de la molécule fongitoxique accumulée chez les plants traités avec BTP1, celle-ci a été purifiée par injections répétées en HPLC et a été tout d'abord analysée par MALDI-TOF pour la mesure de sa masse exacte selon la méthode décrite dans le paragraphe II.3.5 de matériel et méthodes. Cette analyse de haute précision a donné des masses de 288,253279 Da et de 310,235194 Da pour les formes monochargées $[M+H^+]$ et $[M+Na^+]$ respectivement. Cela signifie une masse exacte de 287,253278 Da pour la molécule, ce qui correspondrait de manière la plus probable, selon le logiciel associé au spectromètre de masse, à la formule brute $C_{16}H_{33}N_1O_3$. D'autre part, le profil spectral obtenu après fragmentation du composé (Figure IV.23) montre deux pics principaux à m/z 272,2 et 244,1 qui pourraient correspondre respectivement à la perte de groupement OH ou CH_2-CH_2 . Cependant, la molécule semble relativement récalcitrante à la fragmentation et aucun autre ion n'a été détecté de manière fiable dans le spectre.

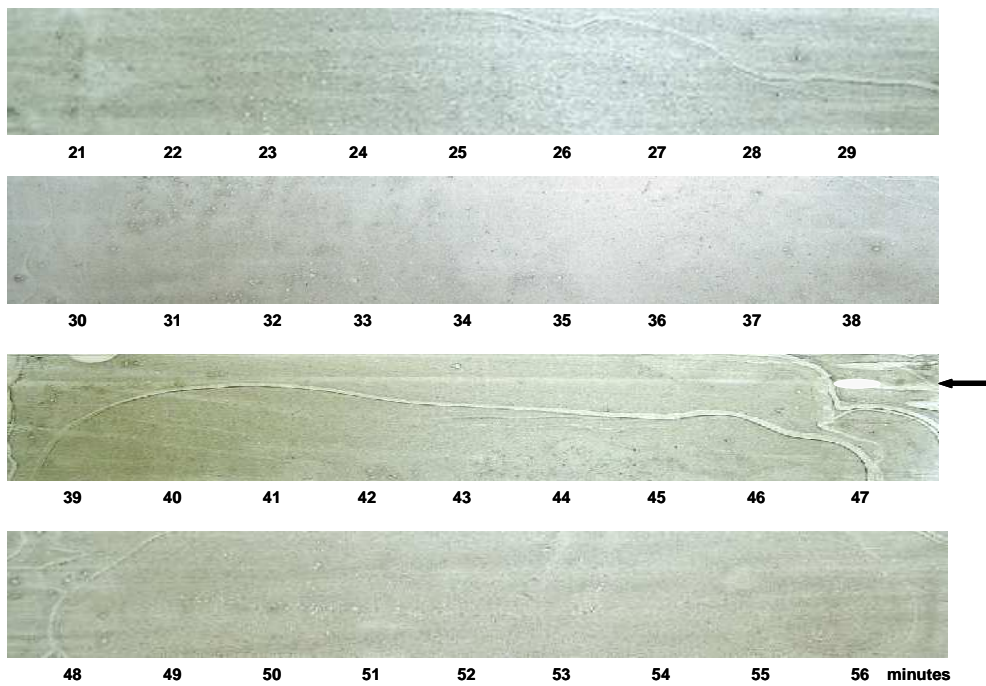


Figure IV.22. Tests de toxicité sur TLC pour les fractions récupérées toutes les minutes à la sortie de l'HPLC. L'échantillon analysé par HPLC est l'extrait d'éther diéthylique après hydrolyse et provient de plants de tomates traités par BTP1 récolté 48h après l'infection par *B. cinerea*. 20 microlitres (correspondant à 20 mg de matériel végétal frais) ont été appliqués et la plaque TLC a été développée avec un mélange de dichlorométhane : hexane : méthanol (6:4:1, v/v/v). Une suspension de spores de *C. cucumerinum* a été alors pulvérisée sur la plaque sèche. Les zones fongitoxiques (taches blanches) ont été visualisées après incubation pendant 48h.

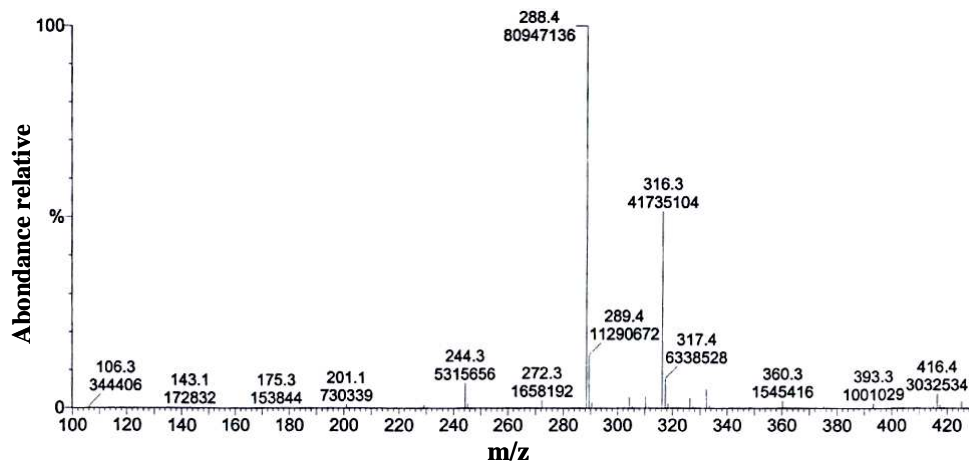


Figure IV.23. Détermination du poids moléculaire pour la molécule fongitoxique accumulée dans les feuilles de tomate traitées par *P. putida* BTP1 par analyse MALDI-ToF.

II.1.2.2. Etude de la stimulation de la voie de la LOX

Une étude précédente a montré que *P. putida* BTP1 est capable de stimuler la voie de la LOX lors de l'ISR chez le haricot (Ongena *et al.* 2004).

Nous avons voulu étudier la possible induction de la voie de la LOX par cette souche dans le pathosystème tomate/*B. cinerea*. Pour ce faire, les deux activités enzymatiques principales de cette voie, LOX et LHP, ont été mesurées. Des échantillons des plants témoins et des plants traités par BTP1 ont été analysés aux différents temps juste avant l'infection par *B. cinerea*, 48 et 96 heures après l'infection. Les mêmes méthodes mentionnées dans le point I.3.1 de ce chapitre ont été utilisées pour mesurer les deux activités de la LOX et de la LHP.

Les résultats de trois expériences ont montré que l'activité de la LOX était très basse et qu'il n'y a pas de différence entre les plants témoins et les plants traités avant l'infection par *B. cinerea*. Mais après l'infection, une stimulation très rapide de l'activité de la LOX a été observée dans tous les échantillons témoins autant que dans les traités mais nous observons que cette augmentation est plus forte chez les plants inoculés par BTP1 en comparaison avec les plants témoins pendant les 48 premières heures (2.4 fois) (Figure IV.24). Ensuite, cette activité a continué à augmenter faiblement jusqu'à la fin de l'expérience (96 heures après l'infection) alors qu'elle avait tendance à se stabiliser dans les plants témoins.

De même, l'activité LHP a été mesurée aux différents temps dans les extraits préparés à partir de la troisième feuille provenant des plants témoins et traités par BTP1. Dans trois expériences indépendantes, comme dans le cas de la LOX, nous observons que l'activité LHP est similaire avant l'infection par le pathogène chez les plants témoins aussi bien que chez les plants traités par BTP1 (Figure IV.25). Cependant, on remarque clairement une augmentation de l'activité consommatrice des hydroperoxydes au cours du temps après l'infection chez les plants traités par BTP1 par rapport aux témoins où l'activité LHP a chuté à partir de 48 heures après l'infection pour atteindre un niveau 1.7 fois moins élevé le quatrième jour après l'infection en comparaison avec les plants traités par BTP1.

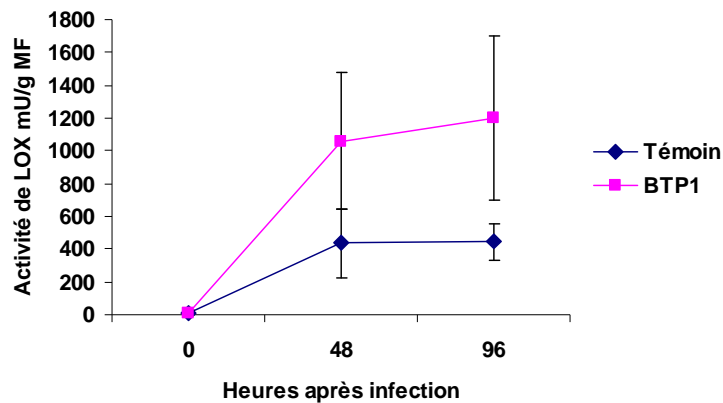


Figure IV.24. L'induction de l'activité de LOX chez la tomate traitée avec *P. putida* BTP1 en comparaison avec les témoins. Les extraits ont été préparés à partir des troisièmes feuilles récoltées 0h, 48h et 96h après l'infection par *B. cinerea*. Les données sont des moyennes de trois expériences indépendantes, et l'activité LOX (exprimée en mU par gramme de matière fraîche) a été mesurée 3 fois pendant 3 minutes par une méthode spectrophotométrique en suivant l'augmentation des hydroperoxydes à 234 nm.

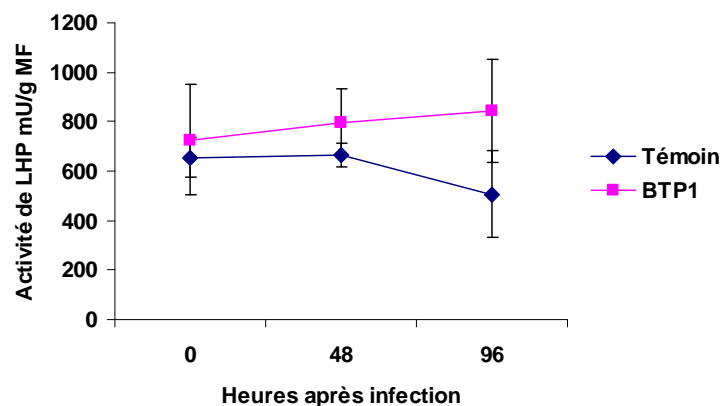


Figure IV.25. L'évolution de l'activité LHP chez la tomate témoin et traitée avec *P. putida* BTP1. Les extraits ont été préparés à partir des troisièmes feuilles récoltées 0h, 48h et 96h après l'infection. L'activité LHP (exprimée en mU par gramme de matière fraîche) a été déterminée par spectrophotométrie en suivant la décomposition des hydroperoxydes à 234 nm. Les données sont des moyennes des deux expériences indépendantes avec deux mesures pour chaque traitement.

II.1.2.3. Dosage des composés volatils dans les feuilles

Des études ont montré un rôle important de l'activité de l'hydroperoxyde lyase qui amène à la production d'aldéhydes volatils (C6) tels que (E)-2-hexenal et (Z)-3-hexenal dans les plantes. Ces composés et leur forme alcool correspondante recèlent une certaine activité antifongique mais peuvent également stimuler l'activation de certains gènes de défense (Engelberth *et al.* 2004; Ongena *et al.* 2004; Kishimoto *et al.* 2006a; 2006b). Nous avons donc voulu estimer les quantités de composés volatils présents dans les feuilles des tomates témoins et traités avec *P. putida* BTP1 suite à une infection par le pathogène.

Les analyses de molécules volatiles dans les tissus foliaires ont été réalisées par CPG-head-space conformément à la méthode décrite dans la section (II.4) du chapitre Matériel et Méthodes. Des analyses de standards d'aldéhydes et d'alcools formés spécifiquement par l'hydroperoxyde lyase ont été effectuées et les chromatogrammes ainsi obtenus ont permis de déterminer leur temps de rétention :

Volatils	Temps de rétention (min)
Trans-2-hexenal	15,853
Cis-3-hexenal	15,862
hexenol	20,420
Trans-3-hexenol	20,803
Cis-3-hexenol	21,457
Trans-2-hexenol	22,115

La figure IV.26 illustre le spectre obtenu après injection du mélange des 6 standards cités ci-dessus. Nous observons que le trans-2-hexenal et le cis-3-hexenal sont élués en même temps.

Nous avons ensuite injecté les extraits végétaux prélevés des tomates témoins et traités par BTP1 juste avant infection et 16, 24, 48 et 96 heures après l'infection. Parmi nos standards, ces analyses n'ont révélé la présence que du pic élué à 15,85 minutes et qui correspondrait donc au trans-2-hexenal et/ou au cis-3-hexenal dans les feuilles des plants témoins aussi bien que dans les traités avec BTP1. Nous n'avons pas observé de

différences significatives entre les témoins et plants traités en ce qui concerne la quantité de cet aldéhyde et même des autres composés inconnus que ce soit avant ou après l'infection par le pathogène (Figure IV.27).

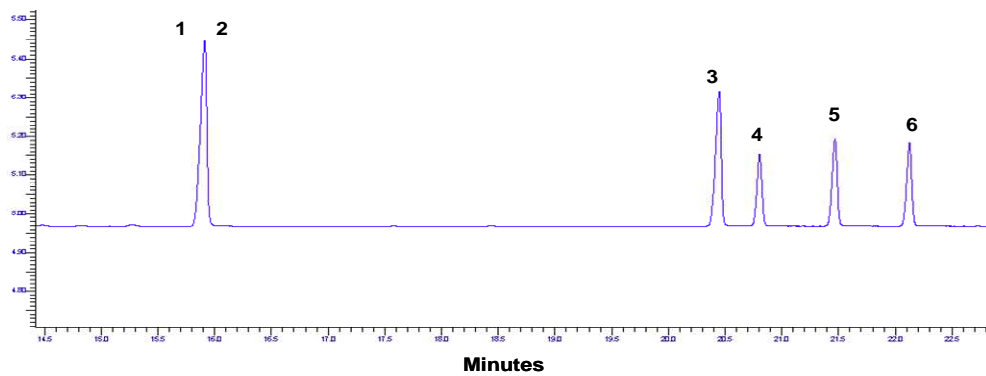


Figure IV.26. Chromatogramme obtenu lors de l'analyse en CPG de type Headspace de 6 standards de volatiles : 1, trans-2-hexenal ; 2, cis-3-hexenal ; 3, hexenol ; 4, trans-3-hexenol ; 5, cis-3-hexenol ; 6, trans-2-hexenol.

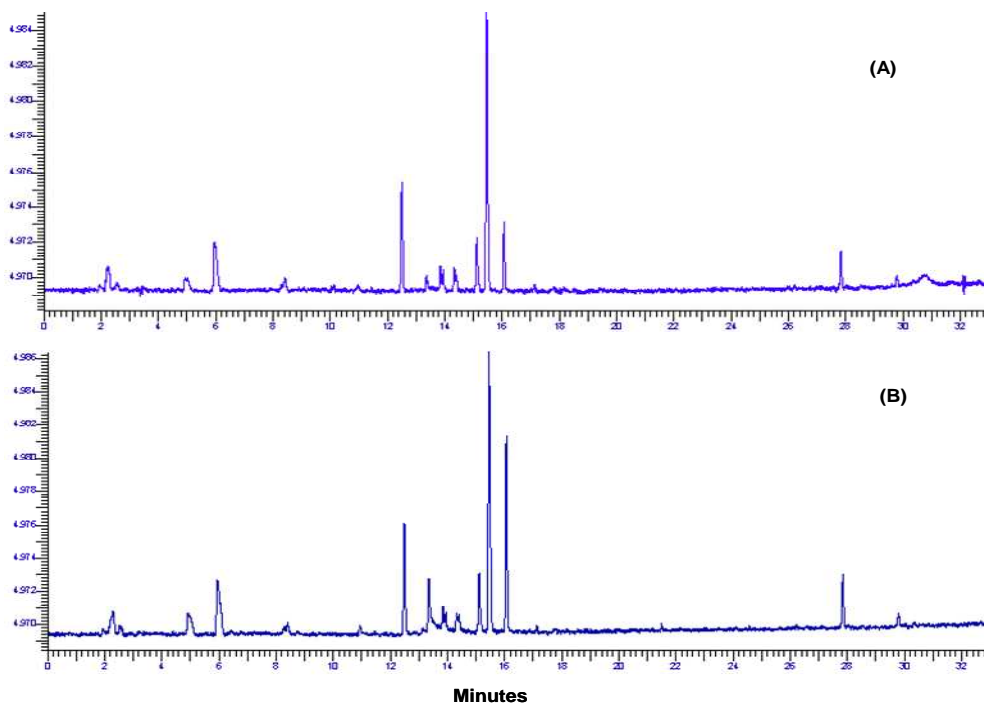


Figure IV.27. Chromatogramme obtenu lors de l'analyse en CPG de type headspace du matériel végétal récolté 48 heures après l'infection de plants traités par BTP1 (B) en comparaison avec les plants témoins (A).

II.1.2.4. Expression différentielle des gènes *AOS*, *HPL* et *LOX*

Nos résultats montrent que dans le cadre de l'activation de la résistance chez la tomate par *P. putida* BTP1, il y a une augmentation de l'activité LOX suite à l'infection par un agent pathogène, ainsi qu'une stimulation de l'activité LHP, consommatrice des hydroperoxydes produits.

Afin d'essayer de savoir quelles sont les branches de la voie de la LOX qui sont activées, des analyses transcriptionnelles de gènes codants pour les enzymes de ces branches ont été effectuées, chez les plants traités comparativement aux plants témoins. Plus particulièrement, nous avons analysé l'expression différentielle des gènes codants pour l'AOS, l'enzyme qui mène à l'acide jasmonique et du gène codant pour l'HPL, l'enzyme qui mène à la synthèse des aldéhydes volatils.

Par ailleurs, comme nous avons mentionné précédemment, six isoformes de LOX sont identifiées chez la tomate. Pour déterminer le ou lesquels est (sont) impliqué(s) dans la stimulation de l'activité enzymatique dans le cadre de l'ISR, nous avons également analysé le niveau de transcription des isoformes LoxA, B, C, D et F, par hybridation sur Northern blots. Les RNAs totaux extraits à partir des troisièmes feuilles de plants témoins et traitées avec *P. putida* BTP1 ont été analysés aux différents temps : juste avant l'infection par *B. cinerea*, et ensuite 48 et 96 heures après l'infection.

II.1.2.4.1. Analyse transcriptionnelle des gènes *AOS1*, *AOS2* et *HPL*

Des précédentes études sur la tomate ont montré que le gène *AOS* s'exprime dans toutes les parties de tomate, et que le gène *HPL* s'exprime dans les feuilles et les fleurs (Howe *et al.* 2000). Les RNA totaux ont été extraits à partir des feuilles de tomates traitées avec *P. putida* BTP1 issues de deux expériences et ont été hybridés avec les sondes *AOS1*, *AOS2* et *HPL*. Les résultats d'analyse avec ces trois sondes ne montrent malheureusement aucune hybridation sur les blots, ni chez les plants témoins, ni chez les traités. Cela suggère qu'aucune activation de ces gènes n'a eu lieu, mais par manque de témoin positif dans ces analyses, aucune affirmation quant à l'implication des gènes

AOS1, *AOS2* et *HPL* dans la résistance observée chez les plants de tomate traités avec BTP1 ne peut être avancée.

II.1.2.4.2. Analyse transcriptionnelle des gènes *LoxA* et *LoxB*

Dans deux expériences indépendantes, nous avons examiné l'expression des deux gènes *LoxA* et *LoxB*. Un témoin positif était constitué de RNA extraits de fruits mûrs. Les profils d'hybridation que nous avons observé sont similaires à ceux dans le cas des plants traités avec BC25. Les résultats de ces deux expériences étaient identiques. Ces deux gènes ne sont exprimés ni dans les feuilles de tomates témoins, ni dans les feuilles de tomates traitées, que ce soit avant ou après l'infection par le pathogène (Figure IV.28 A et B). Il faut noter que le gène *LoxA* est très faiblement exprimé dans l'échantillon témoin positif. C'est probablement dû à l'utilisation de mRNA de fruits de tomate mûre alors que ce gène est plutôt exprimé pendant le mûrissement (Ferrie *et al.* 1994). Dans tous les cas, il semble donc que les gènes *LoxA* et *LoxB* ne soient pas impliqués dans l'augmentation de résistance observée chez les plants traités avec *P. putida* BTP1.

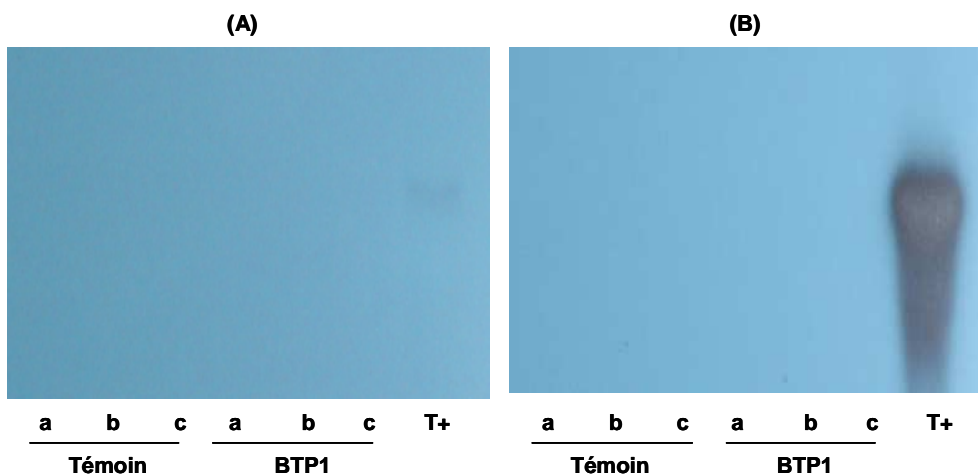


Figure IV.28. Profils d'hybridation obtenus avec les sondes *LoxA* (A) et *LoxB* (B) après électrophorèse et Northern blotting. Les analyses ont été effectuées sur des RNA totaux de plants témoins et traités par BTP1. Puits (a) : juste avant l'infection, puits (b) et (c) : 48h et 96h après infection par *B. cinerea* respectivement et puits (T+) : témoin positif (fruits de tomate mûrs).

II.1.2.4.3. Analyse transcriptionnelle du gène *LoxC*

La sonde *LoxC* a été hybridée sur les RNA extraits à partir des feuilles de plants témoins et traités avec BTP1 issues de deux expériences indépendantes effectuées sur la tomate. Un témoin positif était constitué de RNA extraits de fruits mûrs. Les résultats de ces deux expériences étaient identiques. Nous avons observé un niveau d'expression très faible du gène *LoxC*, aussi bien chez les plants traités que chez les témoins. Il n'y a pas non plus de grandes différences entre les échantillons avant l'infection par *B. cinerea* et après (Figure IV.29). Ces résultats indiquent que le gène *LoxC* n'est pas exprimé, dans les feuilles de tomate en réponse ni à l'attaque par le pathogène, ni suite au traitement avec BTP1. Par conséquent, le *LoxC* ne semble pas impliqué dans l'ISR observée chez la tomate traitée par cette bactérie.

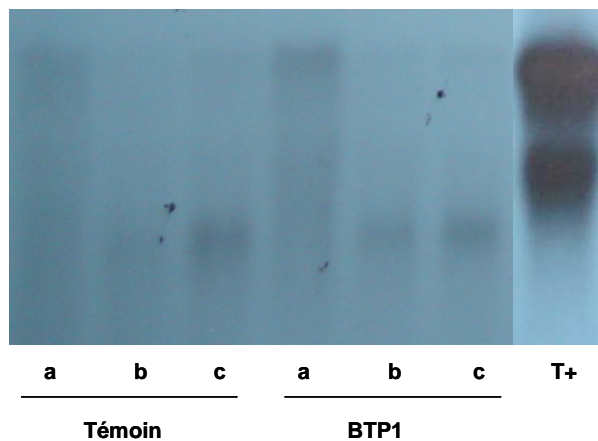


Figure IV.29. Profils d'hybridation obtenus avec la sonde *LoxC* après électrophorèse et Northern blot. Les analyses ont été effectuées sur des RNA totaux de plants témoins et traités par BTP1. Puits (a) : juste avant l'infection, puits (b) et (c) : 48h et 96h après infection par *B. cinerea* respectivement et puits (T+) : témoin positif (fruits de tomate mûrs).

II.1.2.4.4. Analyse transcriptionnelle du gène *LoxD*

Pour deux expériences indépendantes effectuées sur la tomate, la sonde *LoxD* a été hybridée sur les RNA extraits à partir de feuilles de plants témoins et traités par *P. putida* BTP1. Les résultats de ces deux expériences étaient identiques. Nous pouvons observer que le gène *LoxD* s'exprime dans les feuilles infectées et non infectées, qu'elles

proviennent de tomates témoins ou de tomates traitées par BTP1. Mais quel que soit le traitement, on remarque que l'expression est induite en réponse à l'infection, surtout chez les témoins à 96 heures après l'infection par *B. cinerea*. (Figure IV.30). Quoiqu'il en soit, l'absence de différence marquée de niveau d'expression entre les plants témoins et traités suggère que l'isoforme *LoxD* n'est pas impliquée dans le phénomène d'ISR observé chez la tomate traitée avec BTP1. Son niveau d'expression semble étroitement lié au niveau d'infection des feuilles.

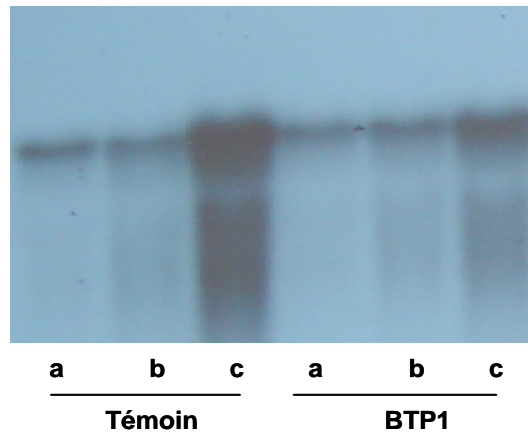


Figure IV.30. Profils d'hybridation obtenus avec la sonde *LoxD* après électrophorèse et Northern blotting. Les analyses ont été effectuées sur des RNA totaux de plants témoins et traités par BTP1. Puits (a) : juste avant l'infection, puits (b) et (c) : 48h et 96h après infection par *B. cinerea* respectivement.

II.1.2.4.5. Analyse transcriptionnelle du gène *LoxF*

Afin de déterminer si le gène *LoxF* joue un rôle dans l'ISR chez tomate, les RNAs extraits à partir de feuilles de plants témoins et traités avec BTP1 (Figure IV.30A) ont été hybridés au moyen de la sonde *LoxF*. Un témoin positif était constitué de RNA extraits de plantes traitées au méthyl-jasmonate durant 24 heures. Trois expériences indépendantes ont été effectuées, les troisièmes feuilles détachées ont été récoltées à différents temps mais il est important de noter que la période varie dans les trois essais entre la coupure de la feuille pour la conditionner selon le protocole expérimental défini et sa récolte avant infection. Dans la première expérience, l'expression du gène *LoxF* est assez

faible mais visible chez les plants traités par BTP1 20 heures après coupure mais avant l'infection *B. cinerea*. Elle est plus importante que celle observée chez les témoins même si là aussi le gène paraît exprimé. Après l'infection par *B. cinerea*, cette expression est nettement stimulée chez les plants traités avec BTP1 par comparaison avec les plants témoins (Figure IV.31 IB). Dans la deuxième expérience, il y a une forte expression du gène *LoxF* avant l'infection mais qui correspond à une période plus courte de 16 heures après la coupure chez les plants traités par BTP1 et aussi chez les plants témoins. Cette forte expression est nettement atténuée 48 heures plus tard et donc 48 h après l'infection et ce quelque soit le traitement. Son niveau reste néanmoins clairement plus élevé chez les plants traités par BTP1 en comparaison avec les témoins (Figure IV.31 IIB). Sur base de ces résultats, nous avons, dans la troisième expérience, récolté les feuilles juste après le détachement, avant infection par *B. cinerea* 24 heures plus tard puis 48 et 96 heures après l'infection. Le résultat d'hybridation de la sonde *LoxF* sur Northern blot montre qu'il y a une forte expression dans les tissus prélevés juste avant l'infection et donc une vingtaine d'heures après coupure. Cette expression est par contre très faible dans les feuilles analysées juste après la coupure confirmant un effet important de la coupure sur le niveau de transcription de *LoxF*. Cet effet semble perdurer pendant au moins 24 heures. Après l'infection, les résultats de cette 3^{ème} expérience renforcent ceux des deux premières avec une accumulation différentielle claire des transcrits *LoxF* dans les plantes traitées avec BTP1 par rapport aux témoins, essentiellement après deux jours.

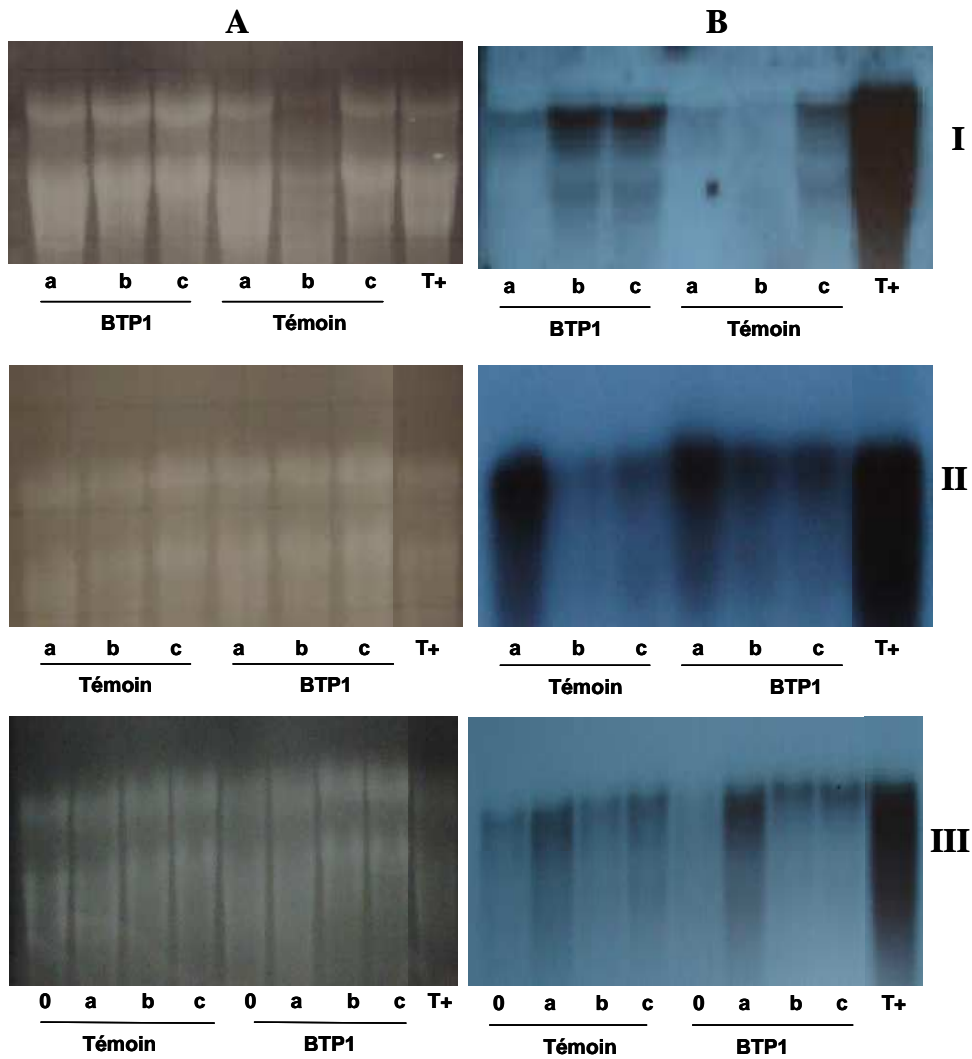


Figure IV.31. Expression du gène *LoxF* dans les plants de tomates témoins et dans les plants traités par *P. putida* BTP1. Les RNAs totaux ont été extraits à partir des troisièmes feuilles des plants de tomate témoins et traités par *P. putida* BTP1 récoltés juste après la coupure (24 H avant l'infection puits 0 pour la 3^{ème} expérience), juste avant l'infection (puits a), ainsi que 48 h et 96 h après l'infection par *B. cinerea* (puits b et c) respectivement (A) : Vérification de la qualité des RNAs chargés (20 µg) par une électrophorèse sur gel d'agarose 1% dénaturant par fluorescence le bromure d'éthidium et visualisation sous U.V. dans trois expériences I, II et III. (B) : Profils d'hybridation obtenus avec la sonde *LoxF* après électrophorèse et Northern blot. Puits (T+) : témoin positif (tomate exposée 24 heures au méthyl-jasmonate).

II.2. L'ISR chez le concombre

Pour rappel, une autre partie de notre travail consistait à étudier les réactions de défense induites par les PGPR sur un autre pathosystème concombre/*Colletotrichum lagenarium*. Pour ce faire, nous avons étudié, comme chez la tomate, une possible accumulation de composés fongitoxiques et une éventuelle stimulation de la voie de la LOX dans les plants induits.

II.2.1. Evaluation de la protection

L'effet protecteur de *P. putida* BTP1 chez le concombre a été évalué sur les plants âgés de deux semaines. Les plants sont traités par les bactéries au niveau des racines. Les plants entiers de concombre sont infectés par le pathogène *C. lagenarium* au niveau des cotylédons selon la méthode décrite dans le point II.2 du Matériel et Méthodes. L'effet protecteur de BTP1 a été évalué en terme de pourcentage des lésions qui se sont clairement développées hors de la zone de dépôt de la suspension de spores du pathogène. Nous observons au travers des 4 expériences indépendantes une réduction de la maladie statistiquement significative en moyenne de 37% chez les plants traités par *P. putida* BTP1 par rapport aux plants témoins (Figure IV.32 A et B). Comme *P. putida* BTP1 et l'agent pathogène restent localisés sur des organes différents, ceci suggère que la suppression de la maladie était assurément due à l'induction de la résistance systémique dans la plante hôte.

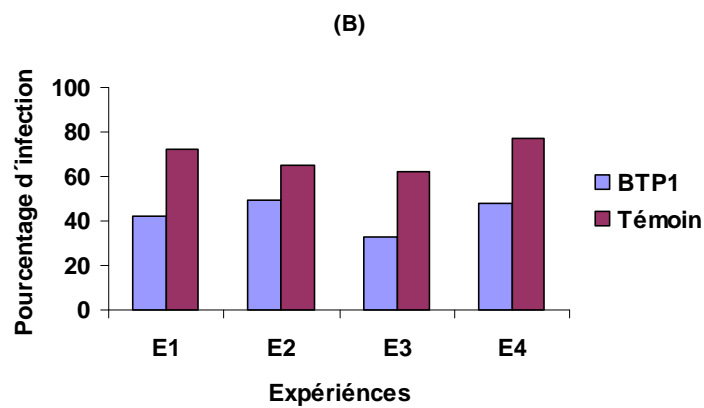
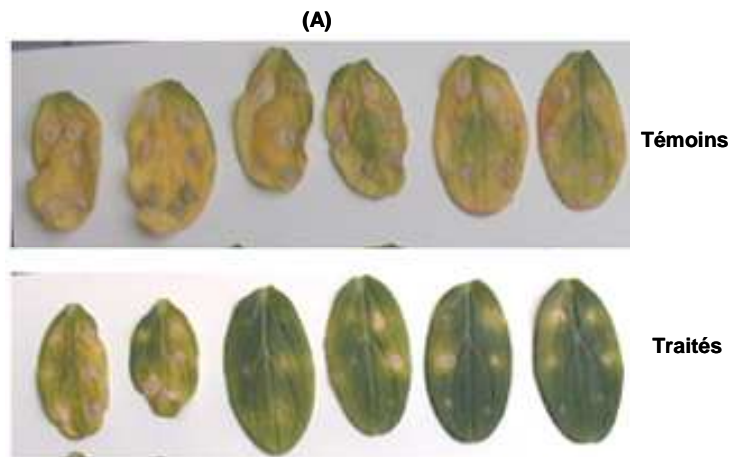


Figure IV.32. (A) : Exemples de cotylédons de concombre (témoin et traités avec *P. putida* BTP1) infectés par *C. lagenarium* et observés 9 jours après l'infection. (B) : Evolution de la sévérité de la maladie chez les plants de concombre témoins et traités après l'infection par *C. lagenarium* dans quatre expériences (E1, E2, E3 et E4). L'infection a été évaluée 9 jours après l'inoculation du pathogène. 20 plants ont été testés par traitement et par expérience.

II.2.2. Etude des mécanismes de la résistance induite chez le concombre par *P. putida* BTP1

II.2.2.1. Accumulation de composés fongitoxiques

Des précédentes études sur le pathosystème concombre/*Pythium aphanidermatum* ont montré que des composés antifongiques s'accumulent dans les racines et dans les feuilles des plants traités avec *P. putida* BTP1 par comparaison avec les plants témoins (Ongena *et al.* 2000).

Nous avons voulu estimer l'éventuelle stimulation de la synthèse des phytoalexines dans un autre pathosystème concombre/*C. lagenarium*. Pour ce faire, dans trois des quatre expériences précédentes, les cotylédons de plants témoins et traités avec BTP1 ont été récoltés juste avant l'infection par *C. lagenarium* et 7 jours après l'infection. Ensuite, tout comme chez la tomate, les composés fongitoxiques ont été extraits successivement (selon la méthode décrite dans les points II.3.1 et II.3.2 du Matériel et Méthodes) dans l'hexane, de l'éther diéthylique suivi ou non d'une hydrolyse acide. Ces composés ont été testés pour la toxicité contre *C. cucumerinum* sur plaque TLC (Figure IV.33 A, B et C). Les résultats comparatifs de biotests n'ont globalement pas montré de différences importantes dans la distribution des zones de toxicité même si certains spots semblent plus intenses dans les extraits éther diéthylique non hydrolysés correspondant aux plants traités avec *P. putida* BTP1 7 jours après l'infection par *C. lagenarium* en comparant avec les témoins. Il n'y a aucune différence entre les témoins et les traités avant l'infection (Figure IV.33). De même, nous n'observons aucune différence significative au niveau de la toxicité entre les plants traités par *P. putida* et les plants témoins ni dans l'extrait hexane ni dans l'extrait éther diéthylique après hydrolyse. Ces résultats suggèrent que si il y a une légère accumulation de composés fongitoxiques, ces derniers s'accumuleraient sous forme libre dans les tissus des plants de concombre traités avec *P. putida* BTP1 après l'infection par *C. lagenarium*.

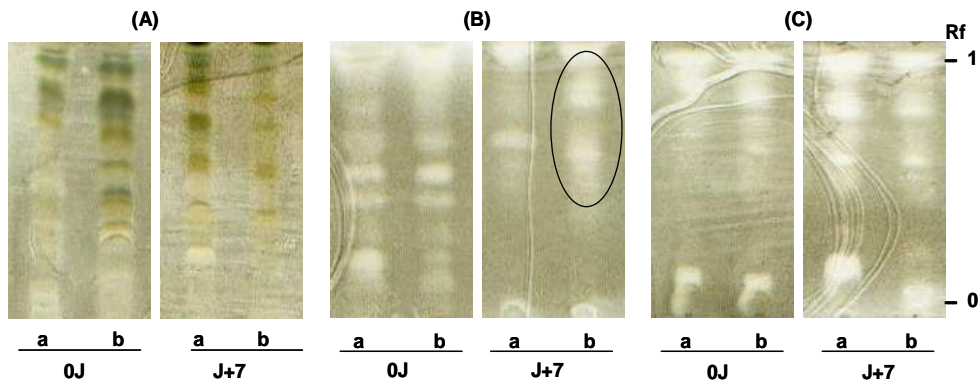


Figure IV.33. Séparation sur TLC des composés végétaux fongitoxiques récupérés par extraction à l'hexane (A), à l'éther diéthylique (B) et à l'éther diéthylique après hydrolyse (C). Les échantillons analysés proviennent des cotylédons des plants de concombres témoins (a) et des plants traités par BTP1 (b) récoltés juste avant l'infection (0J) et 7 jours (J+7) après l'infection par *C. lagenarium*. 35 μ l (correspondant à 35 mg de matériel végétal frais) ont été déposés et la plaque TLC a été développée avec un mélange de dichlorométhane : hexane : méthanol (6:4:1, v/v/v). Une suspension de spores de *C. cucumerinum* a été alors pulvérisée sur la plaque sèche. Les zones fongitoxiques (taches blanches) ont été visualisées après incubation pendant 48 h.

II.2.2.2. Etude de la stimulation de la voie de la LOX

Afin d'évaluer si la voie de la LOX peut être stimulée chez le concombre traité avec *P. putida* BTP1, l'évolution des activités LOX et LHP a été évaluée avant et après l'infection par *C. lagenarium*, dans des tissus des plants témoins et des plants traités. L'extraction de la LOX et la mesure de son activité ont été effectuées à partir de cotylédons de concombre récoltés dans trois expériences indépendantes et selon le protocole expérimental détaillé dans la partie II.5 du chapitre Matériel et Méthodes.

Une légère augmentation de l'activité 3 jours après l'infection a été observée chez les plants traités par BTP1 en comparaison avec les plants témoins mais la différence n'est pas significative (Figure IV.34).

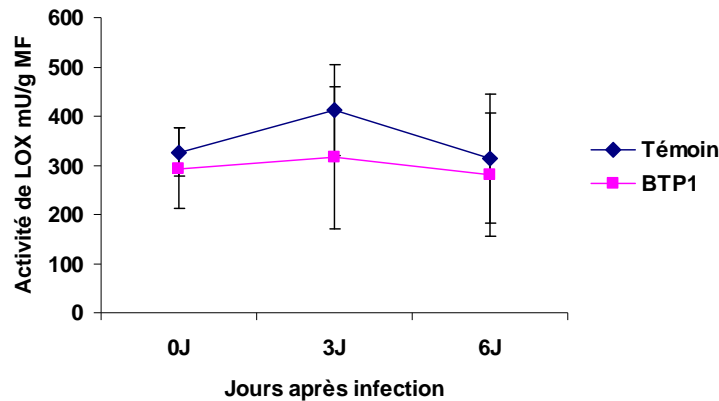


Figure IV.34. Activité LOX dans les cotylédons de concombre traité avec *P. putida* BTP1 en comparaison avec les plants témoins. Les extraits ont été préparés à partir des cotylédons récoltés 0, 3 et 6 jours après l'infection par *C. lagenarium*. Les données sont des moyennes de trois expériences indépendantes, et l'activité LOX (exprimée en mU par gramme de matière fraîche) a été mesurée 3 fois pendant 3 minutes par une méthode spectrophotométrique en suivant l'augmentation des hydroperoxydes à 234 nm.

D'autre part, les activités enzymatiques LHP ont été mesurées dans les extraits préparés à partir des cotylédons et des feuilles de plants témoins ou d'autres traités par BTP1 juste avant l'infection par *C. lagenarium*, et ensuite 3, 4 et 6 jours après l'infection en utilisant les 13-HPOTE comme substrat. Nous observons qu'avant l'infection, le taux d'activité est quasiment similaire pour les plants issus des deux traitements. Par contre, après introduction du pathogène, nous observons que les taux d'activité dans les cotylédons des plants traités par BTP1 sont significativement plus élevés par rapport à ceux mesurés dans les plants témoins 3 jours après l'infection. Cette stimulation n'est que transitoire et l'activité LHP diminue au cours du temps dans les plants traités pour arriver à une valeur similaire à celle mesurée dans les plants témoins 6 jours après l'infection (Figure IV.35A). De plus, dans deux des expériences, l'activité LHP a également été mesurée dans les feuilles des plants de concombre. Une évolution de l'activité LHP globalement similaire à celle dans les cotylédons a été observée avec un écartement des valeurs mesurées aux jours 3 et 4 autant dû à une diminution de l'activité chez les plants témoins qu'à une légère augmentation dans les plants traités. Etant donné l'erreur parfois

importante sur la mesure au 3^{ème} jour, l'activité LHP ne semble significativement pas plus élevée qu'au 4^{ème} jour dans les feuilles dans les plants traités par BTP1 (Figure IV.34B).

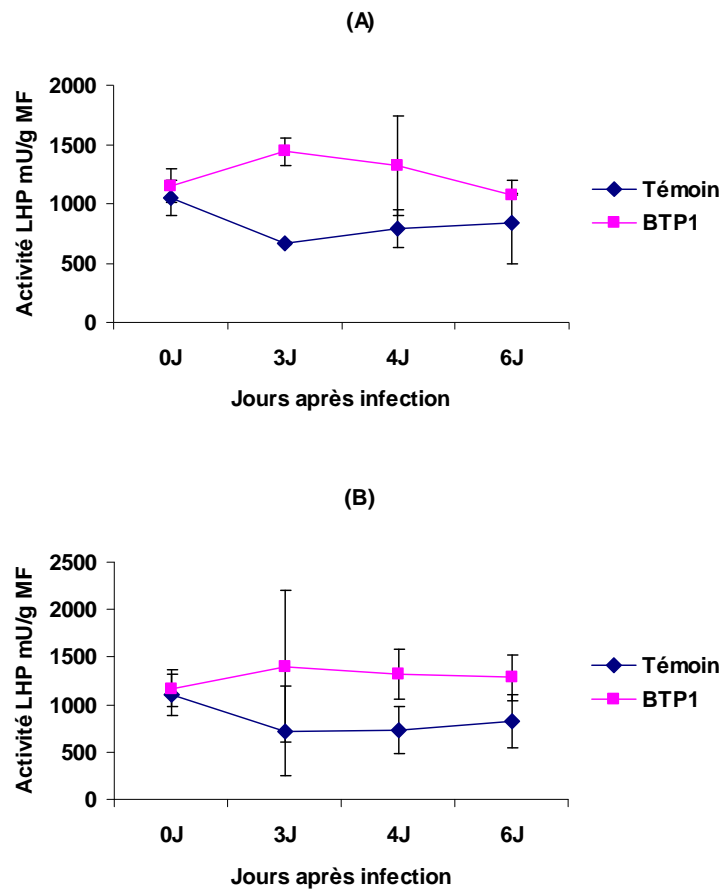


Figure IV.35. L'activité LHP dans les cotylédons (A) et les feuilles (B) de concombre traité avec *P. putida* BTP1 en comparaison avec les plants témoins. Les extraits ont été préparés à partir des cotylédons et des feuilles récoltés juste avant, ainsi que 3 et 6 jours après l'infection par *C. lagenarium*. Les données sont des moyennes de trois expériences indépendantes pour les cotylédons et deux expériences indépendantes pour les feuilles. L'activité LHP a été mesurée 3 fois pendant 3 minutes par une méthode spectrophotométrique en évaluant la décomposition des hydroperoxydes à 234 nm.

Chapitre V
DISCUSSION

Chapitre V

Discussion

Par analogie avec la résistance systémique acquise (SAR) induite par un agent pathogène, certaines rhizobactéries non pathogènes (PGPR) sont capables de stimuler une résistance systémique induite (ISR) accompagnée avec des réactions de défense chez l'hôte végétal lorsque celui-ci est agressé. Cependant les mécanismes de défense induits lors de l'ISR demeurent assez méconnus. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail visant à approfondir nos connaissances sur les voies métaboliques stimulées par les souches *Pseudomonas putida* BTP1 et *Bacillus subtilis* et permettant d'expliquer l'effet protecteur conféré par ces souches sur la tomate et le concombre contre plusieurs maladies.

I. Effet protecteur des PGPR

D'une manière générale, nos résultats démontrent que le traitement du sol et des graines des plants de concombre et de tomate avec des souches de PGPR (*Pseudomonas putida* BTP1 ou *Bacillus subtilis*) a conféré une diminution de la susceptibilité vis-à-vis de certaines maladies soit via une interaction directe avec le pathogène par antagonisme soit de manière indirecte par l'induction de la résistance systémique (ISR).

Plus spécifiquement, nos résultats ont montré que la surproduction de mycosubtiline (un type d'iturine) par *B. subtilis* BBG100 permet d'augmenter considérablement l'effet protecteur de la souche vis-à-vis de la maladie causée par *P. aphanidermatum*. Ces résultats montrent l'implication de ce type d'iturine dans l'antagonisme développé contre des agents pathogènes (Leclère *et al.* 2005; Rahman *et al.* 2007). La production précoce et plus élevée des lipopeptides augmente probablement l'effet biologique de la souche en réduisant immédiatement la croissance du pathogène de la plante. Un tel effet protecteur direct des lipopeptides de type fengycine et iturine

produites par *B. subtilis* a déjà rapporté (Peypoux *et al.* 1999; Bonmatin *et al.* 2003; Kloeppe *et al.* 2004; Bent 2005; Haas et Defago 2005).

D'autre part, certaines souches de *B. subtilis* ont été rapportées pour réduire indirectement l'incidence de la maladie en déclanchant l'ISR dans les plants (Kloeppe *et al.* 2004; Bent 2005; Ongena *et al.* 2005a). Nous avons comparé, dans ce travail, l'effet protecteur des isolats BC21, BC27 et BC25 dérivés de la souche *B. subtilis* 168 et respectivement surproducteurs de surfactine, de fengycine et des deux lipopeptides. Les trois mutants sont capables d'induire l'ISR chez la tomate alors que la souche sauvage est inefficace. Cela suggère un rôle important de ces lipopeptides dans l'élicitation de l'ISR qui a été confirmé par ailleurs par le traitement avec des surfactines et des fengycines pures. Chez le haricot, l'effet protecteur vis-à-vis de *B. cinerea* est semblable à celui fourni par les souches productrices de lipopeptides (Ongena *et al.* 2007a). A notre connaissance, ces deux types de lipopeptides de *Bacillus* constituent une nouvelle classe de composés capables d'être reconnus par les cellules végétales comme signaux pour activer les mécanismes de défense. Tout récemment, un tel rôle d'éliciteur de l'ISR pour les composés bactériens de nature lipopeptidique a été étayé avec le cas de la massetolide A, un cyclo-lipopeptide produit par *Pseudomonas fluorescens* et inducteur de l'ISR chez la tomate pour protéger contre *Phytophthora infestans* (Tran *et al.* 2007). Par contre, nos résultats ont montré que la surproduction de mycosubtiline par *B. subtilis* BBG100 ne permet pas de stimuler l'ISR dans le pathosystème tomate/*B. cinerea*. Cela confirme les résultats d'autres études sur la pomme de terre et les cellules de tabac indiquant que l'iturine n'a aucun effet stimulant l'ISR chez les plants (Ongena *et al.* 2005b ; Jourdan E., résultats non publiés).

Dans ce travail, nous avons montré que l'effet protecteur de la souche *P. putida* BTP1 sur deux pathosystèmes concombre/*Colletotrichum lagenarium* et tomate/*Botrytis cinerea* est assurément dû à l'ISR. Ces résultats viennent en appui de ceux obtenus auparavant sur la stimulation l'ISR chez le concombre et le haricot contre *P. aphanidermatum* et *B. cinerea* respectivement . Les recherches sur cette souche ont mené à la purification d'un dérivé de la benzylamine (le NABD pour N,N-diméthyl-N-tétradécyl-N-benzylammonium) responsable de l'élicitation de l'ISR chez le haricot (Ongena *et al.* 2005c).

La voie de la transmission du signal responsable de la systémicité de l'état induit typiquement impliqué dans l'ISR exige généralement une réponse à l'acide jasmonique et à l'éthylène (Kishimoto *et al.* 2006b). Cependant, dans certains cas, l'induction de la résistance déclenchée par les rhizobactéries chez les plantes est plutôt similaire à une réponse de type SAR avec l'accumulation d'acide salicylique (SA) et/ou l'expression des protéines PR. Dans une première étape de caractérisation des changements métaboliques spécifiques liés à l'effet protecteur chez l'hôte végétale, les analyses de Northern blot et d'hybridation ont prouvé que la résistance induite par *P. putida* BTP1 et par *B. subtilis* BC25 chez la tomate n'est pas accompagnée de l'expression du gène *PR1* considéré en tant que bon marqueur de la SAR. La résistance induite par des PGPR observée ici chez la tomate n'est pas donc liée à la SAR mais est plutôt du type ISR. Cette observation pourrait d'ailleurs être généralisée à d'autres espèces de plantes. En effet, l'ISR déclenchée par BTP1 chez le haricot est indépendante de l'acide salicylique (Ongena *et al.* 2004) et d'autre part, les plants de concombre traités avec cette bactérie n'ont montré aucune induction d'expression du gène *PR-8* (Bovie *et al.* 2004).

II. Caractérisation des mécanismes de défense induits chez les plants

II.1. Accumulation de composés fongitoxiques

Dans le but de caractériser les mécanismes de défense, nous avons d'abord étudié l'accumulation possible de molécules fongitoxiques dans les tissus végétaux. L'accumulation de composés fongitoxiques, dénommés phytoalexines, est un mécanisme maintes fois associé au phénomène de la SAR, mais certains exemples d'accumulations de phytoalexines ou des enzymes hydrolytiques ont également été rapportés dans le cas de l'ISR et dans différentes plantes (Van Peer *et al.* 1991; Ongena *et al.* 2000; Nandakumar *et al.* 2001).

Nos résultats montrent que la souche *P. putida* BTP1 peut stimuler de manière systémique l'accumulation de composés antifongiques dans les feuilles de tomate. Ces

composés s'accumulent uniquement après l'inoculation du pathogène *Botrytis cinerea* et sont probablement synthétisés dans les cellules de plants en tant que composés conjugués puisque leurs activités ne peuvent être visualisées sur TLC que seulement après hydrolyse acide des extraits de tissus foliaires. Cependant, ces composés s'accumulent en même temps que l'on observe une réduction des symptômes de la maladie chez les plantes traitées, suggérant une participation active de ces molécules dans l'inhibition directe du pathogène. Généralement, la relation entre une accumulation de composés conjugués et la résistance induite chez certaines plantes a déjà été bien établie dans d'autres pathosystèmes et est évoquée pour être une composante nécessaire à la réponse défensive de l'hôte (Ongena *et al.* 1999; Ongena *et al.* 2000). Il est postulé que des aglycones fongitoxiques puissent être libérées de conjugués inactifs par des enzymes hydrolytiques libérées par l'agent pathogène lui-même pendant son entrée dans les tissus des plantes. Toujours selon ce modèle, des études précédentes sur le pathosystème concombre/*Pythium aphanidermatum* ont mis en évidence une accumulation locale et systémique de composés phénoliques antifongiques dans les plantes traités par BTP1. Ces composés s'accumulent dans les racines et dans les feuilles de concombre en tant que dérivés conjugués inactifs. Cet engagement simultané de multiples molécules de défense peut être nécessaire pour conférer un niveau de résistance suffisant au concombre contre l'invasion d'un agent pathogène particulier. Par contre, aucun produit phénolique antifongique ne s'accumule dans les plants de haricot systématiquement protégés avec BTP1 contre l'infection par *B. cinerea* (Ongena *et al.* 2004). Globalement, nos résultats sur le pathosystème concombre/*Colletotrichum lagenarium*, n'ont pas non plus montré de changements importants dans l'accumulation des composés antifongiques dans les cotylédons de concombres traités avec *P. putida* BTP1 par rapport aux témoins. Ces résultats suggèrent que *P. putida* BTP1 a la capacité de déclencher une résistance systémique induite chez le concombre contre deux agents pathogènes différents mais avec des réponses de défense spécifiques et que les phytoalexines ne sont pas une caractéristique spécifique liée à l'ISR par BTP1.

En dépit de l'information fournie par spectrométrie de masse MALDI-TOF, la molécule antifongique s'accumulant chez la tomate n'a pas pu être identifiée dans ce travail. Sur base du poids moléculaire, des propriétés spectrales et du temps de rétention

en HPLC, ce composé ne correspond à aucun dérivé phénolique de la voie des phénylpropanoïdes comme indiqué par l'analyse de divers standards commerciaux des composés représentatifs dans les mêmes conditions (données non montrées). Cette voie métabolique n'est d'ailleurs certainement pas stimulée fortement chez les plants traités par BTP1 comme le suggère l'absence d'expression différentielle du gène de la PAL, l'enzyme initiant cette voie (Marriuto M., mémoire de fin d'études, Université de Liège, septembre 2007). Pour les mêmes raisons, il ne correspond pas aux phytoalexines connues chez la tomate telles que la rishitine, la lubimine et la solavetivone (Stothers 1981; Harborne 1999; Morrissey et Osbourn 1999; Le Floch *et al.* 2005).

Il faut noter que dans un essai parmi les cinq expériences indépendantes analysées, nous avons obtenu un résultat différent, à savoir une accumulation de composés antifongiques libres (extraits sans hydrolyse préalable) et seulement avant l'infection par *Botrytis* (voir figure IV.17). Ces molécules ont un degré de migration sur TLC (Rf) beaucoup plus faible que le composé décrit plus haut et leur accumulation n'est pas associée à une stimulation des activités enzymatiques LOX et LHP (voir ci-dessous). Il est donc probable que deux types de molécules antifongiques différentes puissent s'accumuler et que deux voies métaboliques distinctes puissent être stimulées. Les conditions expérimentales ayant été strictement conservées dans tous les essais d'ISR, nous avons difficile d'émettre des hypothèses permettant d'expliquer cette variabilité dans les phénomènes observés.

II.2. Stimulation de la voie de la lipoxygénase

Parallèlement à la réduction des symptômes de la maladie causée par *Botrytis* chez les plants de tomate traités par BTP1, nous avons mesuré une augmentation significative des activités lipoxygénase (LOX) et lipide hydroperoxydase (LHP), cette dernière représentant l'activité globale de toutes les enzymes dégradant les hydroperoxydes (Figure I.5). Il semble ainsi que la voie métabolique entière menant aux oxylipines ait été induite chez les plants résistants. Nos résultats suggèrent que l'infection par le pathogène soit essentielle pour activer la LOX chez la tomate mais que l'amplitude

du phénomène est augmentée de manière significative par un pré-traitement des plants avec BTP1.

Ces données biochimiques de stimulation de la voie de la LOX sont soutenues par l'analyse au niveau transcriptionnel de l'expression des gènes. En effet, les résultats présentés dans la section II.1.2.4.5 du chapitre Résultats montrent clairement une expression différentielle d'un gène *Lox* chez les plants de tomate traités avec BTP1. Il s'agit en fait d'un nouvel isoforme qui a été dénommé *LoxF* et qui a été détecté en utilisant une sonde montrant une homologie importante avec celle utilisée pour l'hybridation de l'isoforme connu *LoxC* (voir partie I.3.2.1.3 du chapitre Résultats). A l'image de ce qui a été observé pour les activités enzymatiques, il semble que les transcrits de ce gène ne soient pas exprimés avant infection. La présence de la bactérie au niveau racinaire ne semble donc pas induire l'expression de *LoxF* de manière significative. Par contre, une accumulation plus importante des mRNA du gène *LoxF* est clairement observée dans les jours qui suivent l'inoculation du pathogène chez les plants bactérisés par rapport aux témoins. Tout comme l'activité enzymatique, cette expression différentielle de gène est donc associée à la réduction de la maladie. Il semble donc que *LoxF* s'exprimerait dans les feuilles de tomate en réponse à l'inoculation des bactéries mais aussi en réponse à l'infection causée par *Botrytis*. Cette dernière hypothèse reste cependant à confirmer à cause de l'effet important de la coupure du pétiole lors des manipulations que ce travail a également permis de mettre en évidence. En effet, des résultats obtenus très récemment à la suite de ce travail en réalisant l'infection sur plantes entières confirment l'accumulation différentielle de transcrits *LoxF* dans les quatre jours qui suivent l'inoculation du pathogène mais, contrairement à nos observations, ils montrent aussi une augmentation du niveau d'expression de ce gène avant infection (Mariutto M., mémoire de fin d'étude, Université de Liège, septembre 2007). Bien qu'il soit pratique d'un point de vue expérimental et qu'il puisse assurer une bonne reproductibilité dans les niveaux d'infection obtenus d'une expérience à l'autre, le modèle de feuilles détachées présente en effet l'inconvénient d'introduire un stress dû à la coupure du pétiole. Nos résultats montrent que cette blessure artificielle induit une réponse au niveau de la *Lox* qui semble perdurer pendant 20 h au moins. Dans ces conditions de travail sur feuilles détachées, une période de 24 h est donc nécessaire avant

d'effectuer une première analyse de l'expression basale du gène *LoxF* avant infection. Des essais d'ISR additionnels avec analyse de l'expression de *LoxF* sur des périodes plus courtes et en parallèle dans des feuilles détachées et dans des feuilles sur pieds devraient permettre de mieux comprendre de quelle manière ce gène est induit avant l'infection par le pathogène.

Nos résultats ont également révélé que l'induction de la résistance systémique chez les plants de tomate traités par *P. putida* BTP1 n'est pas associée aux changements de l'expression des gènes codants pour quatre autres isoformes connus du gène *Lox*. En effet, nous n'avons pas observé d'expression significative des trois isoformes *LoxA*, *LoxB* et *LoxC*. Contrairement à *LoxF*, le gène *LoxD* est déjà exprimé à un niveau basal avant infection chez les plants témoins et traités et ce niveau d'expression augmente dans les 96 h suivant l'inoculation de *Botrytis*. Les quantités de mRNA accumulés sont alors nettement plus élevées chez les plants témoins que chez ceux bactérisés et sont donc proportionnels au niveau d'infection des feuilles. Cette observation n'est pas étonnante puisque l'isoforme *LoxD* est connu pour être induit dans les feuilles de tomate en réponse au stress en général et à celui causé par les pathogènes en particulier (Heitz *et al.* 1997; Chen *et al.* 2004). Il est important de noter que dans une expérience réalisée sur plants entiers de tomates traitées par BTP1, un niveau de transcription supérieur du gène *LoxD* a été observé deux jours après infection par rapport aux plants témoins (Mariutto M., mémoire de fin d'études, Université de Liège, septembre 2007). Selon ces résultats, le produit du gène *LoxD* participerait donc également à l'élévation de l'activité lipoxygénase chez les tomates bactérisées. Des expériences supplémentaires sont cependant nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Une relation entre induction de la LOX et ISR a été occasionnellement rapportée, mais à notre connaissance, une stimulation de la voie complète de la voie métabolique corrélée avec la réduction de la maladie a seulement été rapportée dans une étude antérieure sur la réaction systémique induite chez le haricot par BTP1 contre *B. cinerea*. Cette étude a montré que les deux activités enzymatiques LOX et hydroperoxyde lyase (HPL) ont été stimulées significativement durant les 4 premiers jours après l'infection chez les plantes traitées par BTP1 en comparaison avec les plants témoins. Ceci a été observé parallèlement à la consommation plus rapide des substrats respectifs de ces

enzymes et avec des concentrations sensiblement plus élevées d'un produit final fongitoxique, le Z-3-hexénal, dans les feuilles des haricots traitées par BTP1 (Ongena *et al.* 2004). Il a été postulé que cet aldéhyde pourrait jouer un rôle en tant que phytoalexine volatile. Dans notre travail, les analyses des tissus frais de feuille de tomate par chromatographie en phase gazeuse de type head-space n'ont montré aucune accumulation de ces produits aldéhydes volatiles dans les plantes inoculés avec BTP1.

D'un point de vue transcriptionnel, il faut souligner le fait qu'aucune accumulation de mRNA correspondant aux gènes de l'allène oxyde synthase ou de l'hydroperoxyde lyase n'a pu être observée dans ce travail. Ces analyses doivent être répétées sur du matériel issu d'autres expériences indépendantes mais il semble que ces deux voies intervenant en aval de la LOX ne soient pas stimulées. La branche menant à la synthèse des jasmonates impliqués dans la signalisation de l'ISR ne serait donc pas induite ni celle se dirigeant vers la production des composés volatiles. Ce dernier point est en accord avec le fait qu'aucune accumulation de ces aldéhydes et alcools dérivés de l'activité lyase n'ait pu être détectée par chromatographie dans les tissus frais de tomates traitées avec BTP1.

Par contre, le composé fongitoxique récupéré dans les extraits méthanoliques du matériel foliaire est relativement hydrophobe sur base de son comportement chromatographique et présente une cinétique d'accumulation dans les tissus qui correspond à celle de la stimulation de la LOX. Sur base de ces deux critères, il pourrait dériver de la voie des oxylipines. Une analyse structurale plus approfondie par résonance magnétique nucléaire et par spectrométrie de masse à deux dimensions représente donc une perspective directe à ce travail pour identifier la molécule et donc la voie métabolique impliquée.

Aucune activité antifongique n'avait pu être détectée dans les extraits méthanoliques équivalents obtenus à partir des tissus de feuilles de haricot (Ongena *et al.* 2004). Ceci suggère qu'une rhizobactérie donnée puisse induire la voie de LOX chez diverses espèces végétales mais avec des produits finaux de type phyto-oxylipines différents qui s'accumuleront dans les tissus infectés et limiteront le pouvoir infectieux de l'agent pathogène. Il y aurait donc une certaine spécificité dans la réaction de la plante au niveau du carrefour principal de la voie métabolique dirigeant la dégradation des hydroperoxydes vers différents produits finaux en fonction des activités relatives de la peroxydase, de la

divinyl éther synthase, de l'allène oxyde synthase, de l'hydroperoxyde lyase et de la lipoxygénase.

De la même manière, nous avons également montré que la réduction de la maladie chez la tomate traitée avec *B. subtilis* BC25 a été clairement associée à la stimulation des activités de deux enzymes principales impliquées dans la voie de LOX d'une façon semblable à celle observée par *P. putida* BTP1. Ces résultats suggèrent donc que différentes bactéries PGPR sont probablement capables de stimuler la même réponse de défense dans un même pathosystème. Peut-être cela est-il dû à la nature des éliciteurs produits par les deux souches. Les lipopeptides de type surfactine et fengycine sont probablement les principaux signaux produits par *Bacillus* et dans le cas de *Pseudomonas putida*, la molécule inductrice est un ammonium quaternaire dérivé tri-alkylé de la benzylamine (Ongena *et al.* 2005c). Ces deux types de molécules partagent une même nature amphiphile avec une tête polaire et une longue chaîne aliphatique hydrophobe. Elles peuvent donc potentiellement toutes deux interagir en tant que détergents avec la membrane des cellules végétales et provoquer une déstabilisation (stress) qui mènerait *in fine* à un même type de réaction de défense.

II.3. Mise en alerte des plantes (priming)

Globalement, nos observations soutiennent donc le concept qu'un signal produit par un agent pathogène est essentiel pour déclencher la synthèse et l'accumulation des produits des gènes de défense. En effet, que ce soit sur base de l'activité enzymatique ou sur base de la cinétique d'accumulation des transcrits *Lox*, nos résultats suggèrent fortement que les plants de tomate réagissent à la colonisation par BTP1 bien que cela soit peu perceptible d'un point de vue moléculaire. Les plantes sont ainsi mises en alerte suite à la reconnaissance de la bactérie pour réagir de manière systémique et plus rapidement vis-à-vis de l'expression des gènes de défense et de l'accumulation de produits inhibiteurs pour le pathogène après la perception d'un agent pathogène. Il apparaît de plus en plus clairement que ce phénomène de «priming» fasse partie intégrante des deux types de réactions de défense systémiques, SAR et ISR (van Wees *et al.* 1999; Conrath *et al.* 2002; Verhagen *et al.* 2004; Conrath *et al.* 2006; Kishimoto *et al.*

2006a; Ton *et al.* 2007). Cela avait déjà été rapporté chez plusieurs espèces végétales suite à la perception d'éliciteurs biotiques ou abiotiques (Conrath *et al.* 2006; Beckers et Conrath 2007; Bruce *et al.* 2007). Nos résultats renforcent ce concept dans le contexte spécifique de l'ISR. En effet, l'ISR n'est généralement pas associée à des changements majeurs dans l'expression des gènes chez l'hôte végétale tant que le pathogène n'est pas introduit (Pieterse *et al.* 2002; Hase *et al.* 2003; Verhagen *et al.* 2004), probablement parce que le contraire impliquerait des investissements lourds au niveau des ressources métaboliques et énergétiques de l'hôte végétal (au détriment du maintien de processus fondamentaux tels que la photosynthèse) alors qu'aucune infection ne doit encore être combattue (van Hulst *et al.* 2006).

Dans certains cas cependant, une expression génétique spécifiquement induite suite à la perception du PGPR a été rapportée. Par exemple, des études réalisées sur *P. putida* BTP1 et *B. subtilis* S499 ont montré que l'ISR induite chez la tomate et le concombre était tout de même associée avec des changements au niveau de la transcription de certains gènes avant l'infection et donc avant le déclenchement des mécanismes de défense dans les plants contre *Pythium aphanidermatum* et *Colletotrichum lagenarium* respectivement (Duby, résultats non publiés ; Ongena *et al.* 2005a). Ces exemples pourraient être utiles pour mieux établir le mécanisme moléculaire par lequel les plantes stockent les informations suite à la reconnaissance des rhizobactéries.

III. Conclusion

Bien que des nombreux exemples d'ISR induite par les PGPR soient disponibles, peu d'études biochimiques ont associé l'effet protecteur à des changements métaboliques spécifiques chez l'hôte. Par la démonstration de la stimulation de la voie de la LOX chez la tomate et par l'isolement d'un nouveau gène *LoxF* dont la séquence complète reste à déterminer, notre travail contribue à identifier les gènes de défense qui sont spécifiquement régulés et fournit de nouvelles perspectives dans la diversité des

mécanismes de défense qui sont inductibles par des rhizobactéries non pathogènes dans le contexte de l'ISR.

L'induction de la voie de la LOX se produit chez la tomate et le haricot mais pas chez le concombre indiquant que la stimulation de la voie des oxylipines n'est pas strictement associée à l'ISR induite par *P. putida* BTP1. D'une manière générale, notre étude renforce donc le fait que les événements moléculaires associés à ce phénomène semblent donc dépendre non seulement du micro-organisme inducteur, de la plante, mais aussi de l'agent pathogène.

Chapitre VI
REFERENCES

Chapitre VI

Références

- Ahn, I.P., Park, K. and Kim, C.H.** (2002). Rhizobacteria-induced resistance perturbs viral disease progress and triggers defense-related gene expression. *Mol. Cells*. **13**(2):302-308.
- Alfano, J.R. and Collmer, A.** (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**:358-414.
- Alstroem, S.** (1991). Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**(6):495-501.
- Andreu, A., Guevara, M., Wolski, E., Daleol, G. and Caldiz, D.** (2006). Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. *Pest Management Science*. **2**(9):162-170.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornélis, P. and Höfte, M.** (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**(11):1147-1156.
- Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C.** (2007). Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. **97**(2):239-243.
- Bakker, P.A.H.M., Ran, L.X., Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C.** (2003). Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can. J. Plant Pathol.* **25**(1):5-9.
- Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwood, J.E. and Jacobsen, B.J.** (2002). Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycooides*, biological control agent. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **61**(5):289-298.
- Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwood, J.W. and Jacobsen, B.J.** (2004). Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biol. Control*. **30**(2):342-350.
- Baysal, T. and Demirdoven, A.** (2007). Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme Microb. Technol.* **40**(4):491-496.
- Beckers, G.J.M. and Conrath, U.** (2007). Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**(4):425-431.
- Benhamou, N. and Bélanger, R.** (1998). Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *The plant journal*. **14**(1):13-21.

- Benhamou, N., Kloepper, J.W., Quadt-Hallman, A. and Tuzun, S.** (1996). Induction of Defense-Related Ultrastructural Modifications in Pea Root Tissues Inoculated with Endophytic Bacteria. *Plant Physiol.* **112**(3):919-929.
- Benhamou, N. and Nicole, M.** (1999). Cell biology of plant immunization against microbial infection: The potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiol. Biochem.* **37**(10):703-719.
- Bent, E.** (2005). Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In *Multigenic and induced systemic Resistance in Plants*, edited by S. Tuzun and E. Bent: Springer, NY.
- Berggren, I., van Vuurde, J.W.L. and Martensson, A.M.** (2001). Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* pv. *viceae*. *Appl. Soil Ecol.* **17**(2):97-106.
- Bergsma-Vlami, M., Prins, M. E. and Raaijmakers, J.M.** (2005). Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**(1):59-69.
- Bigirimana, J. and Höfte, M.** (2002). Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. *Phytoparasitica.* **30**(2):159-168.
- Blée, E.** (2002). Impact of phyto-oxylinins in plant defense. *Trends Plant Sci.* **7**(7):315-321.
- Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J.** (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**(4):343-350.
- Bogdanove, A.J. and Martin, G.B.** (2000). AvrPto-dependant Pto-independant proteins and AvrPto-interacting proteins in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**:8836-8840.
- Bonmatin, J.M., Laprevote, O. and Peypoux, F.** (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **6**(6):541-556.
- Bovie, C., Ongena, M., Thonart, P. and Dommès, J.** (2004). Cloning and expression analysis of cDNAs corresponding to genes activated in cucumber showing systemic acquired resistance after BTH treatment. *BMC Plant Biol.* **4**(15).
- Brans, A., Filée, P., Chevigné, A., Claessens, A. and Joris, B.** (2004). New integrative method to generate *Bacillus subtilis* recombinant strains free of selection markers. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(12):7241-7250.
- Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Napier, J.A. and Pickett, J.A.** (2007). Stressful "memories" of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Sci.* **173**(6):603-608.
- Budzikiewicz, H.** (2004). Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **87**:81-237.

- Burd, G.I., Dixon, D.G. and Glick, B.R.** (1998). A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(10):3663-3668.
- Cakmakci, R., Donmez, F., Aydin, A. and Sahin, F.** (2006). Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol. Biochem.* **38**(6):1482-1487.
- Cameron, R.K., Paiva, N.L., Lamb, C.J. and Dixon, R.A.**(1999). Accumulation of salicylic acid and PR-1 gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in *Arabidopsis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**:121-130.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S. and Dong, X.** (1997). The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell.* **88**(1):57-63.
- Cao, H., Li, X. and Dong, X.** (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(11):6531-6536.
- Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodriguez, M.I., Chulze, S. and Etcheverry, M.** (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Res. Microbiol.* **156**(5-6):748-754.
- Chandrashekar, A. and Satyanarayana, K.V.** (2006). Disease and pest resistance in grains of sorghum and millets. *J. Cereal Sci.* **44**(3):287-304.
- Chang, J.H., Goel, A.K., Grant, S.R. and Dangl, J.L.** (2004). Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**(1):11-18.
- Chen, C.** (1999). Induced systemic resistance against *Pythium aphanidermatum* by plant Growth Rhizobacteria (PGPR) on Cucumber (*Cucumis sativus* L.), PhD thesis, McGill University, Montreal, Canada.
- Chen, C., Bélanger, R., Benhamou, N. and Paulitz, T.** (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **56**(1):13-23.
- Chen, G.P., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z.F. and Grierson, D.** (2004). Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiol.* **136**(1):2641-2651.
- Collins, D.P. and Jacobsen, B.J.** (2003). Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet Cercospora leaf spot. *Biol. Control.* **26**(2):153-161.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., Mauch-Mani, B. and Grp, P.A.P.** (2006). Priming: Getting ready for battle. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**(10):1062-1071.

- Conrath, U., Pieterse, C.M.J. and Mauch-Mani, B.** (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* **7**(5):210-216.
- Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S. and Kohler, A.** (2001). Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**(1):113-119.
- Cools, H.J. and Ishii, H.** (2002). Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (*PAL1*) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **61**(5):273-80.
- Daayf, F., Ongena, M., Boulanger, R., El Hadrami, I. and Belanger, R.R.** (2000). Induction of phenolic compounds in two cultivars of cucumber by treatment of healthy and powdery mildew-infected plants with extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *J. Chem. Ecol.* **26**(7):1579-1593.
- Daayf, F., Schmitt, A. and Bélanger R.R.** (1997). Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Pathol.* **113**(3):719-27.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* **411**(6839):826-833.
- De Meyer, G., Audenaert, K. and Höfte, M.** (1999a). *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**(5):513-517.
- De Meyer, G., Capieau, K., Audenaert, K., Buchala, A., Métraux, J. P. and Höfte, M.** (1999b). Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**(5):450-458.
- De Meyer, G. and Höfte, M.** (1997). Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology.* **87**(6):588-593.
- De Vleeschauwer, D., Cornelis, P. and Höfte, M.** (2006). Redox-active pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 triggers systemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**(12):1406-1419.
- Deleu, M., Bouffieux, O., Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C. and Thonart, P.** (2003). Interaction of surfactin with membranes : a computational approach. *Langmuir.* **19**(8):3377-3385.
- Desender, S., Andrivon, D. and Val, F.** (2007). Activation of defence reactions in *Solanaceae*: where is the specificity? *Cell. Microbiol.* **9**(1):21-30.
- Diaz, M., Achkor, H., Titarenko, E. and Martinez, M.C.** (2003). The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase in responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Lett.* **543**(1-3):136-139.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y.** (2003). Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **22**(2):107-149.

- Dong, X.** (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**(4):316-323.
- Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M.A., Saindrenan, P., Fritig, B. and Kauffmann, S.** (1997). Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**:646-655.
- Duffy, B. K. and Défago, G.** (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(6):2429-2438.
- Duijff, B. J., Gianinazzi-Pearson, V. and Lemanceau, P.** (1997). Involvement of the outer-membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* WCS417r. *New Phytol.* **135**(2):325-334.
- Dumas, M.T., Strunz, G.M., Hubbes, M. and Jeng, R.S.** (1983). Isolation and identification of six mansonones from *Ulmus americana* infected with *Ceratocystis ulmi*. *Experientia.* **39**(10):1089.
- Durner, J., Wendehenne, D. and Klessig, D.F.** (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADPribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(17):10328-10333.
- Durrant, W. and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopahtol.* **42**:185-209.
- Ebel, J. and Mithofer, A.** (1998). Early events in the elicitation of plant defence. *Planta.* **206**(3):335-348.
- Enebak, S.A. and Carey, W.A.** (2000). Evidence for induced systemic protection to fusiform rust in loblolly pine by plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Dis.* **84**(3):306-308.
- Engelberth, J., Alborn, H.T., Schmelz, E.A. and Tumlinson, J.H.** (2004). Airbornesignals prime plants against insect herbivore attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:1781-1785.
- Epple, P. and Bohlmann, A.K.** (1995). An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* **109**(3):813-820.
- Esitken, A., Karlidag, H., Ercisli, S. and Sahin, F.** (2002). Effects of foliar application of *Bacillus subtilis* Osu 142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (*Coryneum* blight) of apricot. *Gartenbauwissenschaft.* **67**(4):139-142.
- Ferrie, B.J., Beaudoin, N., Burkhart, W., Bowsher, C.G. and Rothstein, S.J.** (1994). The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiol.* **106**(1):109-18.
- Feussner, I. and Wasternack, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Ann. Rev.Plant Biol.* **53**:275-297.

- Fliegmann, J., Schuler, G., Boland, W., Ebel, J. and Mithofer, A.** (2003). The role of octadecanoids and functional mimics in soybean defense responses. *Biol. Chem.* **384**(3):437-446.
- Flor, H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**:275-296.
- Fofana, B., McNally, D.J., Labbé, C., Boulanger, R., Benhamou, N., Séguin, A. and Bélanger, R.R.** (2002). Milsana-induced resistance in powdery mildewinfected cucumber plants correlates with the induction of chalcone synthase and chalcone isomerase. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **61**:121-132.
- Fravel, D. R.** (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**:337-359.
- Fravel, D.R., Rhodes, D.J. and Larkin, R.P.** (1999). Production and commercialization of biocontrol products. In *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*, edited by R. Albajes, M. L. Gullino, J. C. van Lenteren and Y. e. Elad: Dordrecht: Kluwer.
- Friedrich, L., Lawton, K.A., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Gut Rella, M., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Ukness, S., Metraux, J.P., Kessman, H. and Ryals, J.** (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *plant J.* **10**(1):61-70.
- Gerber, I.B. and Dubery, I.A.** (2004). Protein phosphorylation in *Nicotiana tabacum* cells in response to perception of lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Phytochemistry.* **65**(22):2957-2966.
- Gerber, I.B., Laukens, K., Witters, E. and Dubery, I.A.** (2006). Lipopolysaccharide-responsive phosphoproteins in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Physiol. Biochem.* **44**(5-6):369-379.
- Giesemann, A., Biehl, B. and Lieberii, R.** (1986). Identification of scopoletin as a phytoalexin of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *J. Phytopathol.* **117**(4):373-376.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense 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.* **6**(6):251-256.
- Gomi, K., Yamasaki, Y., Yamamoto, H. and Akimitsu, K.** (2003). Characterization of a hydroperoxide lyase gene and effect of C6-volatiles on expression of genes of the oxylipin metabolism in Citrus. *J. Plant Physiol.* **160**(10):1219-1231.
- Grant, M. and Lamb, C.** (2006). Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**(4):414-420.
- Griffiths, A., Barry, C., Alpuche-Soli, A.G. and Grierson, D.** (1999). Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. *J. Exp. Bot.* **50**(335):793-798.
- Grover, J.P.** (2004). Predation, competition, and nutrient recycling: a stoichiometric approach with multiple nutrients. *J. Theor. Biol.* **229**(1):31-43.

- Gupta, S.S.** (2003). Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**(3):219-227.
- Guzzo, S.D. and Martins, E.M.F.** (1996). Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. *J. Phytopathol.* **144**:449-454.
- Haas, D. and Defago, G.** (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**(4):307-319.
- Haas, D. and Keel, C.** (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**:117-153.
- Hammerschmidt, R.** (1999). Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**:285-306.
- Hammerschmidt, R. and Kuc, J.** (1995). Induced Systemic Resistance to Disease in Plants. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Acad. Publ.
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G.** (1997). Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**:575-607.
- Han, D.Y., Coplin, D.L., Bauer, W.D. and Hoitink, H.A.J.** (2000). A rapid bioassay for screening rhizosphere microorganisms for their ability to induce systemic resistance. *Phytopathology.* **90**(4):327-332.
- Harborne, J.B.** (1999). The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochem. Syst. Ecol.* **27**(4):335-367.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M.** (2004). *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:43-56.
- Hase, S., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J.** (2003). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas fluorescens* primes the plant to produce higher levels of ethylene upon pathogen infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **62**(4):219-226.
- Hasky-Günther, K., Hoffmann-Hertagen, S. and Sikora, R.A.** (1998). Resistance against the potato cyst nematode *Globodera pallida* systemically induced by the rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* (G12) and *Bacillus sphaericus* (B43). *Fundam. Appl. Nematol.* **21**(5):511-517.
- Heath, M. C.** (2000). Hypersensitive response-related cell death. *Plant Mol. Biol.* **44**(3):321-334.
- Heerklotz, H. and Seelig, J.** (2007). Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur. Biophys. J.* **36**(4-5):305-314.
- Heitz, T., Bergey, D.R. and Ryan, C.A.** (1997). A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* **114**(3):1085-93.

- Higgins, V., Hollands, J. and Bates, D.** (1995). Phytoalexins in forage legumes: studies on detoxification by pathogens and the role of glycosidic precursors in roots. In *Handbook of phytoalexin Metabolism and Action.*, edited by P. R. Daniel M, eds.; New York, USA: Marcel Dekker.
- Hjeljord, L.G., Stensvand, A. and Tronsmo, A.** (2000). Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. *Biol. Control.* **19**(2):149-160.
- Hoffland, E., Hakulinen, J. and vanPelt, J.A.** (1996). Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathology.* **86**(7):757-762.
- Howe, G.A., Lee, G.I., Itoh, A., Li, L. and DeRocher, A.E.** (2000). Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol.* **123**(2):711-24.
- Huang, X., Kiefer, E., von Rad, U., Ernst, D., Foissner, I. and Durner, J.** (2002). Nitric oxide burst and nitric oxide-dependent gene induction in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **40**(6-8):625-631
- Huckelhoven, R., Fodor, J., Preis, C. and Kogel, K.H.** (1999). Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* **119**(4):1251-1260.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A. and Métraux, J.P.** (2003). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**(10):851-858.
- Imler, J.-L. and Hoffmann, J. A.** (2001). Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* **11**(7):304-311.
- Jeun, Y. C., Park, K. and Kim, C. H.** (2001). Different mechanisms of induced systemic resistance and systemic acquired resistance against *Colletotrichum orbiculare* on the leaves of cucumber plants. *Microbiology.* **29**:19-26.
- Jeun, Y.C., Park, K.S., Kim, C.H., Fowler, W.D. and Kloepper, J.W.** (2004). Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biol. Control.* **29**(1):34-42.
- Ji, P., Campbell, H.L., Kloepper, J.W., Jones, J.B., Suslow, T.V. and Wilson, M.** (2006). Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control.* **36**(3):358-367.
- Jofre, E., Lagares, A. and Mori, G.** (2004). Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**(2):267-275.

- Kempster, V.N., Davies, K.A. and Scott, E.S.** (2001). Chemical and biological induction of resistance to the clover cyst nematode (*Heterodera trifolii*) in white clover (*Trifolium repens*). *Nematology*. **3**(1):35-43.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S. and Ryals, J.** (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol. Z.* **32**:439-459.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R. and Takabayashi, J.** (2006a). ETR1-, JAR1- and PAD2-dependent signaling pathways are involved in C6-aldehyde-induced defense responses of *Arabidopsis*. *Plant Sci.* **171**(3):415-423.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R. and Takabayashi, J.** (2006b). Components of C6-aldehyde-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against a necrotrophic fungal pathogen, *Botrytis cinerea*. *Plant Sci.* **170**(4):715-723.
- Klarzynski, O., Descamps, V., Plesse, B., Yvin, J.C., Kloareg, B. and Fritig, B.** (2003). Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**(2):115-122.
- Klarzynski, O. and Fritig, B.** (2001). Stimulation des défenses naturelles des plantes = Stimulation of plant defense responses. *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. III.* **324**(10):953-963.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M. and Zhang, S.A.** (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. **94**(11):1259-1266.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K.K. and Arnaud, M.** (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**(8):4678-4683.
- Kohler, A., Schwindling, S. and Conrath, U.** (2002). Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **128**:1046-1056.
- Kohlmann, M., Bachmann, A., Weichert, H., Kolbe, A., Balkenhohl, T., Wasternack, C. and Feussner, I.** (1999). Formation of lipoxygenase-pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment. *Eur. J. Biochem.* **260**(3):885-895.
- Kouassi, M.** (2001). La lutte biologique: une alternative viable à l'utilisation des pesticides? *VertigO*. **2**(2).
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G. and Sheen, J.** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**(6):2940-2945.
- Krause, M.S., DeCeuster, T.J.J., Tiquia, S.M., Michel, F.C.J., Madden, L.V. and Hoitink, H.A.J.** (2003). Isolation and characterization of rhizobacteria from composts that suppress the severity of bacterial leaf spot of radish. *Phytopathology*. **93**(10):1292-1300.

- Krishnamurthy, K. and Gnanamanickam, S.S.** (1998). Induction of systemic resistance and salicylic acid accumulation in *Oryza sativa*, L. in the biological suppression of rice blast caused by treatment with *Pseudomonas* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**(6):935-937.
- Kuc, J.** (1995a). Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**:275-297.
- Kuc, J.** (2001). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**(1):7-12.
- Kumar, D., Gustafsson, C. and Klessig, D.F.** (2006). Validation of RNAi silencing specificity using synthetic genes: salicylic acid-binding protein 2 is required for innate immunity in plants. *Plant J.* **45**(5):863-868.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G. and Azevedo, V.** (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* **390**(6657):249-256.
- La Camera, S., Gouzerh, G., Dondt, S., Hoffmann, L. and Fritig, B., Legrand, M. and Heitz, T.** (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol. Rev.* **198**(1):267-284.
- Lam, E.** (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:305-315.
- Lam, E., Kato, N. and Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature.* **411**(848-853).
- Larkin, R.P. and Fravel, D.R.** (2002). Effects of varying environmental conditions on biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology.* **92**(11):1160-1166.
- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hut, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessman, H., Staub, T. and Ryals, J.** (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* **10**(1):71-82.
- Lawton, K.A., Potter, S.L., Uknes, S. and Ryals, J.** (1994). Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell.* **6**(5):581-588.
- Le Floch, G., Benhamou, N., Mamaca, E., Salerno, M.I., Tirilly, Y. and Rey, P.** (2005). Characterisation of the early events in atypical tomato root colonisation by a biocontrol agent, *Pythium oligandrum*. *Plant Physiol. Biochem.* **43**(1):1-11.
- Leclère, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M. and Jacques, P.** (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(8):4577-4584.

- Lee, J.P., Lee, S.W., Kim, C.S., Son, J.H., Song, J.H., Lee, K.Y., Kim, H.J., Jung, S.J. and Moon, B.J.** (2006). Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol. Control*. **37**(3):329-337.
- Lee, Y.H., Lee, W.H., Lee, D.K. and Shim, H.K.** (2001). Factors relating to induced systemic resistance in watermelon by plant growth-promoting *Pseudomonas* sp. *Plant Pathol. J.* **17**:174-179.
- Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P. and Phongpaichit, S.** (2006). Purification, characterization and synergistic activity of [beta]-1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb. Technol.* **38**(7):990-997.
- Leeman, M., den Ouden, F.M., van Pelt, J.A., Dirks, F.P.M., Steijl, H., Bakker, P.H.A.M. and Schippers, B.** (1996). Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*. **86**(2):149-155.
- Leeman, M., van Pelt, J.A., den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B.** (1995a). Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*. **85**:1021-1027.
- Leeman, M., Van Pelt, J. A., Den Ouden, F. M., Heinsbroek, M., Bakker, P. A. H. M. and Schippers, B.** (1995b). Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to *Fusarium* wilt, using a novel bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**(6):655-664.
- Li, G. and Ouyang, G.C.** (1990). Plant induced disease resistance. *Plant Physiol. Commun.* **6**:1-4
- Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y. and Dong, X.** (1999). Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell*. **98**(3):329-339.
- Lin, T.P., Chen, C.L., Fu, H.C., Wu, C.Y., Lin, G.H., Huang, S.H., Chang, L.K. and Liu, S.T.** (2005). Functional analysis of fengycin synthetase FenD. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. **1730**(2):159-164.
- Liu, L., Kloepper, J.W. and Tuzun, S.** (1995a). Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. **85**(6):695-698.
- Liu, L., Kloepper, J.W. and Tuzun, S.** (1995b). Induction of systemic resistance in cucumber against angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. **85**(8):843-847.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J. and Solano, R.** (2003). Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*. **15**(1):165-178.
- Lourenco Junior, V., Maffia, L.A., Romeiro, R.d.S. and Mizubuti, E.S.G.** (2006). Biocontrol of tomato late blight with the combination of epiphytic antagonists and rhizobacteria. *Biol. Control*. **38**(3):331-340.

- Madamanchi, N. R. and Kuc, J.** (1991). Induced systemic resistance in plants. In *The Fungal Spore and disease Initiation in Plant and animals*, edited by G. T. Cole and H. C. Hoch. New York: Plenum.
- Mansfield, J.W.** (2000). Antimicrobial compounds and resistance: the role of phytoalexins and phytoanticipins. In *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*, edited by A. J. Slusarenko, R. S. S. Fraser and L. C. Van Loon. Dordrecht: Kluwer.
- Martinez, C., Baccou, J.C., Bresson, E., Baissac, Y., Daniel, J.F. and Jalloul, A.** (2000). Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiol.* **122**(757-766).
- Mateo, A., Muhlenbock, P., Rusterucci, C., Chang, C.C., Miszalski, Z., Karpinska, B., Parker, J.E., Mullineaux, P.M. and Karpinski, S.** (2004). Lesion simulating disease 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol.* **136**:2818-2830.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Gaille, C., Kull, B., Haas, D. and Reimmann, C.** (2001). Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. *Plant J.* **25**(1):62-77.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Métraux, J. P. and Défago, G.** (1994). Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology.* **84**(2):139-146.
- Maurhofer, M., Reimmann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D. and Défago, G.** (1998). Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology.* **88**(7):678-684.
- McGowan, S.J., Barnard, A.M.L., Bosgelmez, G., Sebaihia, M., Simpson, N.J.L., Thomson, N.R., Todd, D.E., Welch, M., Whitehead, N.A. and Salmond, G.P.C.** (2005). Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol. Microbiol.* **55**(2):526-545.
- McNally, D.J., Wurms, K.V., Labbe, C. and Belanger, R.R.** (2003b). Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **63**(6):293-303.
- Mendoza Garcia, R.A., Martijn ten Hoopen, G., Kass, D.C.J., SanchezGarita, V.A. and Krauss, U.** (2003). Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. *Biol. Control.* **27**(2):210-227.
- Meziane, H., van der Sluis, I., van Loon, L.C., Höfte, M. and Bakker, P.A.H.M.** (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.* **6**(2):177-185.

- Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. and Gullino, M.L.** (2006). Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protect.* **25**(5):468-475.
- Momol, M.T., Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S. and Saygili, H.** (1999). Evaluation of biological control agents, systemic acquired resistance inducers and bactericides for the control of fire blight on apple blossom. *Acta Hortic.* **489**:553-557.
- Montillet, J.L., Agnel, J.P., Ponchet, M., Vaillau, F., Roby, D. and Triantaphylides, C.** (2002). Lipoxygenase-mediated production of fatty acid hydroperoxides is a specific signature of the hypersensitive reaction in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **40**(6-8):633-639.
- Morandi, D.** (1996). Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant Soil.* **185**(2):241-51.
- Morrissey, J.P. and Osbourn, A.E.** (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**(3):708-+.
- Mosher, R.A., Durrant, W.E., Wang, D., Song, J. and Dong, X.** (2006). A comprehensive structure-function analysis of Arabidopsis SNI1 defines essential regions and transcriptional repressor Activity. *Plant Cell.* **18**(7):1750-1765.
- Mur, L.A., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. and Wasternack, C.** (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.
- Murphy, J.F., Reddy, M.S., Ryu, C.M., Kloepper, J.W. and Li, R.H.** (2003). Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against Cucumber mosaic virus. *Phytopathology.* **93**(10):1301-1307.
- Murphy, J.F., Zehnder, G.W., Schuster, D.J., Sikora, E.J., Polston, J.E. and Kloepper, J.W.** (2000). Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against tomato mottle virus. *Plant Dis.* **84**(7):779-784.
- Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Raguchander, T. and Samiyappan, R.** (2001). Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.* **33**(4-5):603-612.
- Nandi, A., Welti, R. and Shah, J.** (2004). The Arabidopsis thaliana dihydroxyacetone phosphate reductase gene Suppressor of fatty acid desaturase deficiency1 is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *Plant Cell.* **16**:465-477.
- Newman, M.A., Daniels, M.J. and Dow, J.M.** (1995). Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* induces defense-related gene expression in *Brassica campestris*. *Mol. Plant Microb. Interact.* **8**(5):778-780.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S. and Palva, E.T.** (2000). Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant Microb. Interact.* **13**(4):430-438.

- Nürnbergger, T. and Scheel, D.** (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* **6**(8):372-379.
- Ongena, M., Daayf, F., Jacques, P., Thonart, P., Benhamou, N., Paulitz, T. C. and Bélanger, R. R.** (2000). Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent *Pseudomonads*. *Plant Pathol.* **49**(4):523-530.
- Ongena, M., Daayf, F., Jacques, P., Thonart, P., Benhamou, N., Paulitz, T.C., Cornelis, P., Koedam, N. and Bélanger, R.R.** (1999). Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent *Pseudomonads*: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathol.* **48**(1):66-76.
- Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., Dommes, J. and Thonart, P.** (2005a). *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**(5):692-698.
- Ongena, M., Duby, F., Rossignol, F., Fauconnier, M.L., Dommes, J. and Thonart, P.** (2004). Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic *Pseudomonas* strain. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**(9):1009-1018.
- Ongena, M., Giger, A., Jacques, P., Dommes, J. and Thonart, P.** (2002a). Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**(3):187-196.
- Ongena, M., Jacques, P., Delfosse, P. and Thonart, P.** (2002b). Unusual traits of the pyoverdinin-mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* strain BTP1. *Biometals.* **15**(1):1-13.
- Ongena, M., Jacques, P., Toure, Y., Destain, J., Jabrane, A. and Thonart, P.** (2005b). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**(1):29-38.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L. and Thonart, P.** (2007a). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* **9**(4):1084-1090.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Schäfer, M., Budzikiewicz, H. and Thonart, P.** (2007b). Amino Acids, Iron, and Growth Rate as Key Factors Influencing Production of the *Pseudomonas Putida* BTP1 Benzylamine Derivative Involved in Systemic Resistance Induction in Different Plants. *Microb Ecol.* In press.
- Ongena, M., Jourdan, E., Schäfer, M., Kech, C., Budzikiewicz, H., Luxen, A. and Thonart, P.** (2005c). Isolation of an n-alkylated benzylamine derivative from *Pseudomonas putida* BTP1 as elicitor of induced systemic resistance in bean. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**(6):562-569.
- Ongena, M. and Thonart, P.** (2006). Resistance Induced in Plants by Non-pathogenic Microorganisms: Elicitation and Defense Responses. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues*, edited by A. Jaime and T. d. Silva. Japan: Global Science Books.

- Oostendorp, M., Kuz, W. and Staub, T.** (2001). Induced resistance in plants by chemicals. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**(1):19-28.
- Oostendorp, M. and Sikora, R.A.** (1990). *In vitro* interrelationship between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. *Rev. Nematol.* **13**(3):269-274.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M. and Sahin, F.** (2006). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci. Hortic.* **111**(1):38-43.
- Park, K. S. and Kloepper, J.W.** (2000). Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Biol. Control.* **18**(1):2-9.
- Parker, J.E.** (2003). Plant recognition of microbial patterns. *Trends Plant Sci.* **8**(6):245-247.
- Paulitz, T.C. and Bélanger, R.R.** (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**:103-133.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J.P., Manners, J.M. and Broekaert, W.F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell.* **8**(12):2309-2323.
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. and Robaglia, C.** (2003). Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* **26**(2):189-199.
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M. and Wallach, J.** (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Environ Microbiol.* **51**(5):553-563.
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q. and Gullino, M.L.** (1997). Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biol. Technol.* **11**(3):131-140.
- Pieterse, C.M.J, Ton, J. and Van Loon, L.C.** (2001). Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *AgBiotechNet.* 3:ABN 068.
- Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C.** (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* **4**(2):52-58.
- Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C.** (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**(4):456-464.
- Pieterse, C.M.J., van Pelt, J.A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P. and van Loon, L. C.** (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **57**(3):123-134.

- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., Hoffland, E., van Pelt, J.A. and van Loon, L.C.** (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*. **8**(8):1225-1237.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., Ton, J., van Pelt, J.A. and van Loon, L.C.** (2002). Signaling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol*. **4**(5):535-544.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeeck, P.J. and van Loon, L.C.** (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **10**:1571-1580.
- Ping, L. and Boland, W.** (2004). Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*. **9**(6):263-266.
- Politycka, B.** (1998). Phenolics and the activities of phenylalanine ammonia lyase, phenol-b glucosyltransferase and b-glucosidase in cucumber root as affected by phenolic allelochemicals. *Acta Physiol. Plant*. **20**:405-410.
- Press, C.M., Loper, J.E. and Kloepper, J.W.** (2001). Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology*. **91**(6):593-598.
- Press, C.M., Wilson, M., Tuzun, S. and Kloepper, J.W.** (1997). Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact*. **10**(6):761-768.
- Profotová, B., Burketová, L., Novotná, Z., Martinec, J. and Valentová, O.** (2006). Involvement of phospholipases C and D in early response to SAR and ISR inducers in *Brassica napus* plants. *Plant Physiol. Biochem*. **44**(2-3):143-151.
- Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., van der Sluis, I., Schippers, B. and Bakker, P.A.H.M.** (1995). Dose-response relationships in biological control of *Fusarium wilt* of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. **85**(10):1075-1081.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M. and de Souza, J.T.** (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**(1-4):537-547.
- Rahman, M.S., Ano, T. and Shoda, M.** (2007). Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol*. **127**(3):503-507.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. and Samiyappan, R.** (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protect*. **20**(1):1-11.
- Ran, L.X., Li, Z.N., Wu, G.J., van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M.** (2005a). Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Eur. J. Plant Pathol*. **113**(1):59-70.

- Ran, L.X., van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M.** (2005b). No role for bacterially produced salicylic acid in rhizobacteria induction of systemic resistance in *Arabidopsis*. *Phytopathology*. **95**(11):1349-1355.
- Raupach, G.S. and Kloepper, J.W.** (2000). Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Dis.* **84**(10):1073-1075.
- Raupach, G.S., Liu, L., Murphy, J.F., Tuzun, S. and Kloepper, J.W.** (1996). Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Dis.* **80**(8):891-894.
- Reitz, M., Oger, P., Meyer, A., Niehaus, K., Farrand, S. K., Hallmann, J. and Sikora, R.A.** (2002). Importance of the O-antigen, core-region and lipid A of rhizobial lipopolysaccharides for the induction of systemic resistance in potato to *Globodera pallida*. *Nematology*. **4**(1):73-79.
- Ren, D., Yang, H. and Zhang, S.** (2002). Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxidase production in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**(1):559-565.
- Reuveni, R. and Reuveni, M.** (1998). Foliar-fertilizer therapy - a concept in integrated pest management. *Crop Prot.* **17**(2):111-118.
- Reyes, M.E.Q., Rohrbach, K.G. and Paull, R.E.** (2004). Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **33**(2):193-203.
- Ross, A. F.** (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*. **14**:340-358.
- Rusterucci, C., Montillet, J.L., Agnel, J.P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J.J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J.P. and Triantaphylidès, C.** (1999). Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* **274**(51):36446-36455.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P. and Uknes, S.** (1997). The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I κ B. *Plant Cell*. **9**(3):425-439.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W. and Pare, P.W.** (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **134**(3):1017-26.
- Ryu, C.M., Hu, C.H., Reddy, M.S. and Kloepper, J.W.** (2003). Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytol.* **160**(2):413-420.
- Sanabria, N.M. and Dubery, I.A.** (2006). Differential display profiling of the Nicotiana response to LPS reveals elements of plant basal resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**(3):1001-1007.

- Santhi, A. and Sivakumar, V.** (1995). Biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* (Migula) against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949 on tomato. *J. Biol. Control.* **9**(113-115).
- Saravanakumar, D., Vijayakumar, C., Kumar, N. and Samiyappan, R.** (2007). PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protect.* **26**(4):556-565.
- Sarosh, B., Sivaramakrishnan, S. and Shetty, H.** (2005). Elicitation of defense related enzymes and resistance by L-methionine in pearl millet against downy mildew diseases caused by *Sclerospora graminicola*. *Plant Pathol. Biochem.* **43**(8)808-815.
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W. and Jackson, M.A.** (2004). Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology.* **94**(11):1267-1271.
- Shah, J.** (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**(4):365-371.
- Shah, J.** (2005). Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**:229-260.
- Shapiro, A.D. and Zhang, C.** (2001). The role of NDRI in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**:1087-1101.
- Shishkoff, N. and McGrath, M.T.** (2002). AQ10 biofungicide combined with chemical fungicides or AddQ spray adjuvant for control of cucurbit powdery mildew in detached leaf culture. *Plant Dis.* **86**:915-918.
- Siddiqui, I.A. and Shaikat, S.S.** (2002). Rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance (ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica*. *J. Phytopathol.* **150**(8-9):469-473.
- Siddiqui, I.A. and Shaikat, S.S.** (2003). Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biol. Biochem.* **35**(12):1615-1623.
- Sikora, R.A.** (1992). Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**(245-270).
- Silva, H.S.A., Romeiro, R.d.S., Macagnan, D., Halfeld-Vieira, B.d.A., Pereira, M.C.B. and Munteer, A.** (2004). Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biol. Control.* **29**(2):288-295.
- Song, F. and Goodman, R.M.** (2002). Molecular cloning and characterization of a rice phosphoinositide-specific phospholipase C gene, OsPI-PLC1, that is activated in systemic acquired resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **61**(1):31-40.
- Soylu, S.** (2006). Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* **170**(5):942-952.

- Soylu, S., Bennett, M.H. and Mansfield, J.W.** (2002). Induction of Phytoalexin Accumulation in Broad Bean (*Vicia faba* L.) Cotyledons Following Treatments with Biotic and Abiotic Elicitors. *Turk J. Agric. For.* **26**:343-348.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X. and Pieterse, C.M.J.** (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *Plant Cell.* **15**(3):760-770.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G. and Jones, J.D.G.** (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science.* **268**(5211):661-667.
- Steijl, H., Niemann, G.J. and Boon, J.J.** (1999). Changes in chemical composition related to fungal infection and induced resistance in carnation and radish investigated by pyrolysis mass spectrometry. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**(5):297-311.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. and Métraux, J. P.** (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**:235-270.
- Stothers, J. B.** (1981). Sesquiterpenes - biosynthetic studies with ¹³C and ²H magnetic resonance - a synthetic approach via homoenolization. *Pure Appl. Chem.* **53**:1241-1258.
- Tanaka, N., Che, F.S., Watanabe, N., Fujiwara, S., Takayama, S. and Isogai, A.** (2003). Flagellin from an incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H₂O₂ generation accompanying hypersensitive cell death and expression of PAL, Cht-1, and PBZ1, but not of LOX in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**(5):422-428.
- Thakore, Y.** (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology.* **2**(3):294-208.
- Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Broekaert, W. F. and Cammue, B. P.** (2001). The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr. Opin. Immunol.* **13**(1):63-68.
- Thordal-Christensen, H.** (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**(4):351-357.
- Timmusk, S. and Wagner, E.G.H.** (1999). The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: A possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**(11):951-959.
- Ton, J., D'Alessandro, M., Jourdie, V., Jakab, G., Karlen, D., Held, M., Mauch-Mani, B. and Turlings, T.C.J.** (2007). Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J.* **49**(1):16-26.
- Ton, J., De Vos, M., Robben, C., Buchala, A. J., Métraux, J.P., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J.** (2002a). Characterisation of *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance. *Plant J.* **29**(1):11-21.

- Ton, J., Van Pelt, J., Van Loon, L. and Pieterse, C.** (2002b). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**(1):27-34.
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A. and Thonart, P.** (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* **96**(5):1151-1160.
- Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., Höfte, M. and Raaijmakers, J.M.** (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol.* **175**(4):731-742.
- Tsuge, K., Ano, T. and Shoda, M.** (1996). Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8. *Arch. Microbiol.* **165**(4):243-251.
- Underhill, D.M. and Ozinsky, A.** (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* **14**(1):103-110.
- Valdebenito, M., Crumbliss, A.L., Winkelmann, G. and Hantke, K.** (2006). Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**(8):513-520.
- van Hulten, M., Pelsler, M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. and Ton, J.** (2006). Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**(14):5602-5607.
- van Loon, L.C., Bakker, P. and Pieterse, C. M. J.** (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**:453-483.
- van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M.** (2005). Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, edited by Z. A. Siddiqui: Springer.
- van Loon, L.C., Geraats, B.P.J. and Linthorst, H.J.M.** (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **11**(4):184-191.
- 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. *Mol. plant Pathol.* **55**(2):85-97.
- van Peer, R., Niemann, G.J. and Schippers, B.** (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology.* **81**(9):728-734.
- van Peer, R. and Schippers, B.** (1992). Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. *Neth. J. Plant Pathol.* **98**(2):129-139.
- van Wees, S.C.M., de Swart, E.A.M., van Pelt, J.A., van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J.** (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and

jasmonate- dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**(15):8711–8716.

van Wees, S.C.M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L. C. and Pieterse, C.M.J. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.* **41**(4):537-549.

van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., Trijssenaar, A., Van 't Westende, Y., Hartog, F. and Van Loon, L. C. (1997). Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**(6):716-724.

Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.S., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**(8):895-908.

Vignutelli, A., Wasternack, C., Apel, K. and Bohlmann, H. (1998). Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant J.* **14**(3):285-295.

Viswanathan, R. and Samiyappan, R. (2002a). Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. *Crop Protect.* **21**(1):1-10.

Viswanathan, R. and Samiyappan, R. (2002b). Role of oxidative enzymes in the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) mediated induced systemic resistance in sugarcane against *Colletotrichum falcatum*. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz.* **109**(1):88-100.

Wang, J., Wang, B., Zhao, H. and Li, B. (2005). Preliminary study on phytoalexin induction in cucumber. *Colloids Surf B Biointerfaces.* **43**(3-4):203-207.

Waspi, U., Blanc, D., Winkler, T., Ruedi, P. and Dudler, R. (1998). Syringolin, a novel peptide elicitor from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that induces resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**(8):727-733.

Wasternack, C. and Parthier, B. (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* **2**:302-307.

Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I. and Miersch, O. (2006). The wound response in tomato - Role of jasmonic acid. *J. Plant Physiol.* **163**(3):297-306.

Wei, G., Kloepper, J.W. and Tuzun, S. (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology.* **81**(12):1508-1512.

Weichert, H., Stenzel, I., Berndt, E., Wasternack, C. and Feussner, I. (1999). Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves - preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS Lett.* **464**(3):133-137.

- Weller, D.M., van Pelt, J.A., Mavrodi, D.V., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M. and van Loon, L.C.** (2004). Induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*. **94**(S108).
- Whipps, J.M.** (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**:487-511.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. and Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*. **414**(6863):562-565.
- Wojcieh, J. J. and Lise, K.** (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopatol.* **40**:411-441.
- Xing, T., Malik, K., Martin, T. and Miki, B.L.** (2001). Activation of tomato PR and wound-related genes by a mutagenized tomato MAP kinase through divergent pathways. *Plant Mol. Biol.* **16**(1):109-120.
- Xu, Y., Chang, P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghobhama, K.G., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A.** (1994). Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*. **6**(8):1077-1085.
- Yaeno, T., Matsuda, O. and Iba, K.** (2004). Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant J.* **40**(6):931-941.
- Yamaguchi, T., Tanabe, S., Minami, E. and Shibuya, N.** (2004). Activation of phospholipase D induced by hydrogen peroxide in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiol.* **45**(9):1261-1270.
- Yan, Z.N., Reddy, M.S., Ryu, C.M., McInroy, J.A., Wilson, M. and Kloepper, J.W.** (2002). Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. **92**(12):1329-1333.
- Yu, L. M.** (1995). Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**(10):4088-4094.
- Zehnder, G., Kloepper, J., Yao, C. and Wei, G.** (1997). Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (*Coleoptera: Chrysomelidae*) by plant growth promoting rhizobacteria. *J. Eco. Entomol.* **90**(2):391-396.
- Zehnder, G.W., Murphy, J.F., Sikora, E.J. and Kloepper, J.W.** (2001). Application of rhizobacteria for induced resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**(1):39-50.
- Zehnder, G. W., Yao, C. B., Murphy, J. F., Sikora, E. R. and Kloepper, J. W.** (2000). Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol*. **45**(1):127-137.
- Zhang, C., Gutsche, A. and Shapiro, A.** (2004a). Feedback control of the Arabidopsis hypersensitive response. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17** (4):357-365.

- Zhang, S. A., Moyne, A. L., Reddy, M. S. and Kloepper, J. W.** (2002). The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biol. Control*. **25**(3):288-296.
- Zhang, W., Wang, C., Qin, C., Wood, T., Olafsdottir, G., Welti, R. and Wang, X.** (2003). The oleate-stimulated phospholipase D, PLD α , and phosphatidic acid decrease H₂O₂-induced cell death in Arabidopsis. *Plant Cell*. **15**:2285-2295.
- Zhang, Z.G., Wang, Y.C., Li, J., Ji, R., Shen, G., Wang, S.C., Zhou, X. and Zheng, X.B.** (2004b). The role of SA in the hypersensitive response and systemic acquired resistance induced by elicitor PB90 from *Phytophthora boehmeriae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **65**(1):31-38.
- Zhao, H., Zhao, H., Wang, J., Wang, B. and Wang, Y.** (2005b). Stress stimulation induced resistance of plant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **43**(3-4):174-178.
- Zhao, H.C., Li, G.J. and Wang, J.B.** (2005c). The accumulation of phytoalexin in cucumber plant after stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **43**(3-4):187-193.
- Zhou, F., Menke, F.L., Yoshioka, K., Moder, W., Shirano, Y. and Klessig, D.F.** (2004). High humidity suppresses ssi4-mediated cell death and disease resistance upstream of MAP kinase activation, H₂O₂ production and defense gene expression. *Plant J.* **39**(9):920-932.
- Zhou, T. and Paulitz, T. C.** (1994). Induced resistance in the biocontrol of *Pythium aphanidermatum* by *Pseudomonas* spp. on cucumber. *J. Phytopathol.* **142**(1):51-63.
- Zuber, P., Nakano, M. M. and Marahiel, M. A.** (1993). Peptide antibiotics. In *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria*, edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. Losick. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

Listes des publications et activités scientifiques

Diplômes complémentaires et expériences depuis l'obtention du diplôme de second cycle

2000-2001 : DU-SBBC « Diplôme Université de la Spécialisation en Biochimie et Biologie Cellulaire », Université d'Aix-Marseille II, France.

2001 : Stage d'un mois effectué sous la direction du Professeur Max BERGOIN, dans le laboratoire de « Virologie Moléculaire », Station de pathologie comparée, INRA à St. Christol-lez-Alès, France.

1998-2000 : Chercheur-assistant à la Commission de l'Énergie Atomique Syrienne (CEAS), division de Biotechnologie. L'activité scientifique couvre les domaines de la lutte biologique contre les insectes nuisibles.

Distinctions

1993-1994 : certificat de Bassel Assad de distinction, Université de Damas, Syrie

1995-1996 : certificat de Bassel Assad de distinction, Université de Damas, Syrie

2006 : prix de second meilleur poster au congrès IOBC/wprs « Fundamental and practical approaches to increase biocontrol efficacy », Spa, Belgique

Publications

En tant que premier ou co-premier auteur dans des revues internationales

Adam A., Jourdan E., Ongena M., Duby F., Dommes J. and Thonart P. (2005). Resistance induced in cucumber and tomato by a non-pathogenic *Pseudomonas putida* strain. *Parasitica*. **61**:13-22.

Adam A., Duby F., Ongena M., Jourdan E., Dommes J., Thonart P. (2006). The systemic resistance induced in tomato by a non-pathogenic *Pseudomonas* strain is associated with the stimulation of the lipoygenase pathway. *IOBC Bulletin*. **30**:583-586.

Adam A., Ongena M., Duby F., Dommès J. and Thonart P. (2007). Systemic resistance and lipoxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. Soumis à *Plant Physiology and Biochemistry*.

En tant que co-auteur dans des revues internationales

Leclère V., Bechet M., Adam A., Guez J. S., Wathelet B., Ongena M., Thonart P., Gancel F., Chollet-Imbert M. and Jacques P. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**:4577-4584.

Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J.-L. and Thonart P. (2007a). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*. **9**:1084-1090.

Ongena M., Jourdan E., Adam A., Schäfer M., Budzikiewicz H. and Thonart P. (2007b). Amino Acids, Iron, and Growth Rate as Key Factors Influencing Production of the *Pseudomonas Putida* BTP1 Benzylamine Derivative Involved in Systemic Resistance Induction in Different Plants. *Microb Ecol.* DOI 10.1007/s00248-007-9275-5

Jourdan E., Ongena M., Adam A. and Thonart P. (2005). Physiological and physico-chemical factors modulating ISR elicitor production by *Pseudomonas putida*. *IOBC Bulletin*. **29**:45-52.

Jourdan E., Ongena M., Adam A. and Thonart P. (2006). PGPR-induced systemic resistance: activity of amphiphilic elicitors and structural analogues on different plants species. *IOBC Bulletin*. **30**:123-126.

Communications à des congrès

Adam A., Duby F., Ongena M., Jourdan E., Dommès J. and P. Thonart (2006). The systemic resistance induced in tomato by a non-pathogenic *Pseudomonas* strain is associated with the stimulation of the lipoxygenase pathway. IOBC/wprs Workshop "Fundamental and Practical Approaches to Increase Biocontrol Efficacy", Spa, Belgium.

Adam A., Duby F., Ongena M., Jourdan E., Dommès J. and Thonart P. (2006). The lipoxygenase pathway as defense mechanism against fungal disease specifically stimulated in tomato plants by a non-pathogenic *Pseudomonas putida*. Bioforum, Liège, Belgium.

Ongena M., Adam A., Duby F., Dommès J. and Thonart P. (2005). Systemic resistance induced by *Pseudomonas putida* BTP1: elicitation and defense response in the

host plant. XII international congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Merida, Mexico.

Jourdan E., Ongena M., Adam A., Schafer M., Budzikiewicz H. and Thonart P. (2006). New players in the molecular talk associated with plant immunization by non-pathogenic bacteria. Bioforum, Liège, Belgium.

Participation aux Congrès

1. Bioforum, Décembre/2004, Liège, Belgium.
2. 57th International Symposium on Crop Protection, Mai/2005, Gent, Belgium.
3. Bioforum, 2006, Mai/Liège, Belgium.
4. IOBC/wcps, Septembre/2006, Spa, Belgium.

