



Caractérisation des réactions de défense de la vigne et identification d'éliciteurs: l'endopolygalacturonase 1 de *Botrytis cinerea*, une fonction d'avirulence pour un facteur de virulence.

Benoit Poinssot

► To cite this version:

Benoit Poinssot. Caractérisation des réactions de défense de la vigne et identification d'éliciteurs: l'endopolygalacturonase 1 de *Botrytis cinerea*, une fonction d'avirulence pour un facteur de virulence.. Phytopathologie et phytopharmacie. Université de Bourgogne (UB), 2002. Français. NNT: 2002DIJOS030 . tel-03744354

HAL Id: tel-03744354

<https://u-bourgogne.hal.science/tel-03744354>

Submitted on 3 Aug 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES VIE ET SANTE**

Unité mixte de Recherche I.N.R.A./Université de Bourgogne
Laboratoire de Biochimie, Biologie Cellulaire et Ecologie
Des Interactions Plantes/Micro-organismes

THESE

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Bourgogne
Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire**

Par

Benoît POINSSOT

**CARACTERISATION DES REACTIONS DE DEFENSE DE LA VIGNE
ET IDENTIFICATION D'ELICITEURS.
L'ENDOPOLYGALACTURONASE 1 DE *BOTRYTIS CINEREA* :
UNE FONCTION D'AVIRULENCE POUR UN FACTEUR DE VIRULENCE**

Soutenue le 28 Octobre 2002 devant la commission d'examen :

Mr. B. FRITIG, Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg
Mr. B. WALTER, Professeur, Université de Haute Alsace, Colmar
Mr. L.C. VAN LOON, Professeur, Université d'Utrecht
Mr. J. GUERN, Professeur
Mr. A. PUGIN, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon
Mr. P. COUTOS-THEVENOT, Professeur, Université de Poitiers

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

Ce travail a vu le jour et existé grâce au co-financement du Conseil Régional de Bourgogne et du Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne. Je tenais à remercier vivement ces partenaires, particulièrement M^{me} Odile MEURGUES du BIVB, pour le grand intérêt manifesté à l'égard de ce projet.

Je remercie très sincèrement Alain PUGIN, dont les extra-ordinaires qualités humaines et scientifiques ont permis l'initiation, l'existence et le bon déroulement de ce programme de recherche. Une mention spéciale pour ses corrections avisées et nos longues discussions tardives qui m'ont transmis, je l'espère, une dose d'un savant cocktail à base de passion pour la recherche et l'enseignement, de générosité et d'humanité.

Un grand merci également à Pierre COUTOS-THEVENOT, co-directeur de thèse, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, son aide et son accueil chaleureux à Poitiers.

Mes sincères remerciements à Mr. Bernard FRITIG, Mr. Bernard WALTER, Mr. Jean GUERN et Mr. Leendert Cornelis VAN LOON qui me font l'honneur de participer à mon jury de thèse et pour le travail fourni pour évaluer cette étude.

Au sein du laboratoire « H », un merci particulier à David LECOURIEUX, David WENDEHENNE et Olivier LAMOTTE dont les talents respectifs et le soutien m'ont toujours communiqué l'entrain et la rigueur scientifique qui les caractérisent.

Par ordre d'apparition dans le groupe vigne, un énorme merci à :

- Nicolas BESOZZI, pour sa bonne humeur et sa participation à l'étude des différentes souches de *Botrytis cinerea* et de leurs filtrats,
- Marc BENTEJAC, pour son franc parler et dont les compétences m'ont beaucoup aidé pendant la purification de l'élécuteur,
- Xavier DAIRE, pour sa joie de vivre, le partage de ses connaissances de la vigne et de ses dérivés aromatiques, et l'existence du RVVS,
- Marielle ADRIAN, pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide précieuse pour le dosage des phytoalexines de la vigne,
- Agnès KLINGUER, pour ses rires et ses excellentes compétences techniques, notamment pour les cultures cellulaires de vigne,
- Elodie VANDELLE, pour sa grande vivacité qui a permis et permettra, j'en suis sûr, d'avancer encore plus loin dans cette étude (sincères félicitations pour ton DEA),
- Stéphane BOURQUE, jeune enseignant statutaire dont les grandes capacités favoriseront l'avancée des recherches sur la vigne,
- Claire BILLEREY, qui permet déjà la caractérisation de nouveaux éliciteurs tout en conservant son petit sourire réservé.

Toute ma sympathie à Aziz AZIZ, Fabienne BAILLIEUL, Annie BEZIER et Bernard LAMBERT, qui m'ont accueilli si gentiment à Reims et initié à la PCR quantitative en temps réel. En espérant que les échanges fructueux réalisés au sein du RVVS se poursuivent pendant de longues années.

Enfin, je tiens à remercier Marie-Noëlle BINET, Annick CHILTZ, Leïla GUENANECHÉ, Badea KERKEB, Angela LEBRUN-GARCIA, Fatma LECOURIEUX, Elisabeth TROUCHE et tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à ce travail.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ADN-T	ADN de transfert
AjPG	endopolygalacturonase d' <i>Aspergillus japonicus</i>
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AOC	appellation d'origine contrôlée
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
AS	acide salicylique
ATP	adénosine triphosphate
Avr	gène d'avirulence
BABA	acide β -amino butyrique
BAPTA	1,2-bis(aminophénoxy)éthane-N,N,N',N'-tétra acétate
BcPG1	endopolygalacturonase 1 de <i>Botrytis cinerea</i>
CaM	calmoduline
CC	coiled-coil
CEA	commissariat à l'énergie atomique
CDPK	protéine kinase dépendante du calcium
Ct	cycle seuil
CTAB	hexadecyltriméthylammonium bromide
CTP	cytidine triphosphate
cv	cultivar
DMSO	diméthyl sulfoxyde
dNTP	désoxyribonucléotides
dp	degré de polymérisation
DPI	diphenylene iodonium
DTT	dithiothréitol
E	éthylène
EGTA	éthylène glycol-bis(β -amino éthyl éther)-N, N, N',N'- tétra acétate

ERK	external signal-regulated protein kinase
FAO	formes actives de l'oxygène
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GTP	guanosine triphosphate
Hepes	N-(2-hydroxyéthyl) piperazine-N'-(acide 2-éthane sulfonique)
HPD	hybride producteur direct
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
Hrp	hypersensitive reaction and pathogenicity
IAEDENS	N-iodoacétyl-N'-(5-sulfo-1-naphtyl)éthylène diamine
INAO	institut national des appellations d'origine
INRA	institut national de la recherche agronomique
IUVV	institut universitaire de la vigne et du vin
JA	jasmonates
LB	milieu de Luria Bertani
LPS	lipo-polysaccharide
LRR	répétitions riches en leucine
LZ	fermeture « Eclair » à leucines
M2	milieu expérimental des suspensions cellulaires de vigne
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionization - time of flight
MAPK	protéine kinase activée par les mitogènes
MAP2K	MAPK kinase
MAP3K	MAP2K kinase
MBP	protéine basique de myéline
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
NADPH	nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate
NBS	site de liaison aux nucléotides
OG	oligogalacturonates
OGA	oligogalacturonates actifs
pb	paire de bases
PBS	tampon phosphate salin
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PFC	poids frais de cellules
PGIP	protéine inhibitrice de polygalacturonase
PMSF	paramethylsulfonate fluoride

PR	pathogenesis-related
pv	pathovar
p/v	poids/volume
Q-TOF	quadripole-time of flight
R	gène de résistance
RGU	reducing group unit
RH	réaction hypersensible
RIS	résistance induite systémique
RLU	unité de luminescence relative
RPK	récepteur à protéine kinase
rpm	rotation par minute
RSA	résistance systémique acquise
RT-PCRq	PCR quantitative en temps réel
RVVS	réseau vignes et vins septentrionaux
SDS	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes
SSC	citrate de sodium salin (20x SSC : NaCl 3 M, citrate de sodium 0,3M)
TBST	tampon Tris salin additionné de Tween-20
TIR	toll interleukin 1 receptor
UV	ultra-violets
VC	volume de colonne
VT	cible de virulence
v/v	volume/volume

SOMMAIRE

I.	CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
1	Situation du sujet.....	1
2	Spécificité des interactions plantes/pathogènes	4
2-1	Résistance race/cultivar spécifique : modèle « gène pour gène »	4
2-2	Les éliciteurs aspécifiques.....	10
3	Reconnaissance d'un éliciteur, transduction du signal et activation des mécanismes de défense	14
3-1	Reconnaissance d'un éliciteur	14
3-2	Voies de transduction intra-cellulaires.....	15
3-3	Les mécanismes induits de défense des plantes	20
3-4	Résistances systémiques.....	24
4	La vigne et ses pathogènes	28
4-1	Les principaux pathogènes fongiques de la vigne.....	29
4-2	Réactions de défense connues chez la vigne.....	32
4-3	Amélioration de la résistance de la vigne par des moyens de lutte alternatifs à l'utilisation des produits chimiques	36
II.	MATERIELS ET METHODES	38
1	Matériel biologique	38
1-1	Matériel végétal.....	38
1-2	Matériel fongique	39

1-3	Eliciteurs	39
2	Purification d'un éliciteur produit par <i>Botrytis cinerea</i>	39
2-1	Obtention de filtrats de culture pré-purifiés	39
2-2	Nature chimique de l'éliciteur	40
2-3	Purification par chromatographie	41
2-4	Dosage et séparation des protéines en SDS-PAGE	43
2-5	Détection des glycoprotéines	44
3	Identification de l'éliciteur et analyse de l'ADNc correspondant.....	45
3-1	Micro-séquençage de l'éliciteur et identification	45
3-2	Séquençage et analyse de l'ADNc codant la protéine élicitrice	46
3-3	Activité enzymatique de l'éliciteur	47
4	Obtention de cellules de vigne transformées	48
4-1	Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
4-2	Contrôle de la transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> par PCR	49
4-3	Transformation de cellules de vigne et sélection des cals transformés.....	50
4-4	Contrôle de l'expression fonctionnelle du transgène	51
5	Réponses de cellules de vigne à différents éliciteurs	52
5-1	Mesure de l'influx de calcium.....	52
5-2	Mesure de l'efflux de nitrate	53
5-3	Mesure de la production de FAO	54
5-4	Analyse de l'activation de protéines kinases	54
5-5	Analyse de l'accumulation de transcrits	56

5-6	Mesure de la production de phytoalexines	58
5-7	Mesure de la mort cellulaire	59
6	Tests de protection sur cellules isolées	59
III. RESULTATS		61
CHAPITRE 1. IDENTIFICATION D'UN ELICITEUR DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i> ET REACTIONS DE DEFENSE DE LA VIGNE		61
1	Comparaison de la pathogénie de différentes souches de <i>Botrytis cinerea</i> sur vitro-plants de vigne	61
2	Etude comparative de la capacité des filtrats de culture de différentes souches de <i>Botrytis cinerea</i> à activer des réponses de défense chez la vigne	62
2-1	Obtention de suspensions cellulaires de vigne	62
2-2	Activation des réactions de défense de cellules de vigne en suspension par des filtrats pré-purifiés de <i>Botrytis cinerea</i>	62
2-3	Optimisation de la production d'éliciteurs par la souche T4 de <i>Botrytis cinerea</i>	64
3	Purification et caractérisation de l'éliciteur à partir du filtrat de culture de la souche T4 de <i>Botrytis cinerea</i>	66
3-1	L'éliciteur est une protéine possédant des ponts disulfures	66
3-2	Purification de la glycoprotéine élicitrice par chromatographie	67
3-3	Identification de la protéine élicitrice par spectrométrie de masse	69
3-4	Séquençage nucléotidique de l'ADNc codant la protéine élicitrice T4BcPG1 et polymorphisme de séquences	71
4	Etudes des réactions de défenses de suspensions cellulaires de vigne activées par l'éliciteur purifié	74

4-1	Influx de calcium.....	74
4-2	Variation de la concentration cytosolique en calcium libre.....	75
4-3	Production de FAO.....	78
4-4	Activation de MAPK.....	78
4-5	Relations entre influx de calcium, production de FAO et activation des MAPK.....	80
4-6	Cinétique d'expression de gènes de défense.....	82
4-7	Production de phytoalexines	85
4-8	Induction de la mort cellulaire et de nécroses foliaires.....	86
5	L'activité élicitrice de T4BcPG1 est indépendante de son activité enzymatique	87
5-1	Comparaison de l'activité élicitrice de T4BcPG1 et des oligogalacturonates	88
5-2	Comparaison de l'activité élicitrice de T4BcPG1 et de AjPG utilisées à la même activité enzymatique <i>in vitro</i>	92
5-3	Discrimination des activités élicitrice et enzymatique de T4BcPG1	93
 CHAPITRE 2. CARACTERISATION D'AUTRES ELICITEURS ACTIFS SUR LA VIGNE : ACTIVATION DES REACTIONS DE DEFENSE ET PROTECTION.....		96
1	Détection de produits avec une activité élicitrice	96
2	Activité élicitrice de la laminarine	97
2-1	Evénements précoces	97
2-2	Expression de gènes de défense et mort cellulaire.....	99
3	Protection induite par l'utilisation d'éliciteurs	101
3-1	Test de protection sur cellules.....	101
IV.	DISCUSSION	103

La souche T4 de <i>Botrytis cinerea</i> produit un éliciteur des réactions de défense de la vigne : l'endopolygalacturonase 1	103
Voies de signalisation et réactions de défense induites par des éliciteurs chez la vigne	111
L'activité élicitrice de T4BcPG1 est indépendante de son activité enzymatique	126
Protection de la vigne par activation des réactions de défense	131
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	133
VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	137
VII. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	164

I. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Situation du sujet

Les plantes sont continuellement confrontées à une multitude de pathogènes potentiels (virus, bactéries, champignons, ravageurs...) mais le développement de la maladie reste exceptionnel. En effet, les plantes ont développé au cours de l'évolution des mécanismes de défense performants qui leur permettent de résister à la plupart des agressions.

L'issue de l'interaction entre une plante et un micro-organisme dépend à la fois du pouvoir pathogène de l'agresseur et des capacités de la plante à se défendre. Dans la plupart des cas, le micro-organisme n'a pas les capacités de pénétrer ou de se multiplier dans la plante, aucun symptôme n'est visible, et on parle alors de résistance passive. Cette résistance s'explique notamment par l'existence de barrières structurales (cuticule, paroi pecto-cellulosique) et la présence constitutive de composés anti-microbiens dans la plante. Un second type de résistance est la résistance active qui est induite par la détection du micro-organisme par la plante. La forme la plus raffinée de cette résistance est la résistance race/cultivar spécifique. Dans ce dernier cas, pour une espèce végétale donnée, certains cultivars ont la faculté de stopper immédiatement l'infection alors que d'autres sont sensibles à la maladie. Si le cultivar est résistant, l'interaction est dite incompatible et le pathogène avirulent (race avirulente). Au contraire, lors d'une interaction compatible, la race virulente du pathogène se multiplie au sein d'un cultivar sensible, et la maladie se développe. Dans ce type de résistance, la reconnaissance du pathogène par la plante est une étape clé. Cette reconnaissance est déterminée génétiquement par la présence d'un gène de résistance (*R*) dans le cultivar végétal et d'un gène d'avirulence (*Avr*) dans la souche du pathogène (Flor, 1971). L'absence de l'un ou l'autre ou de ces deux gènes conduit au développement de la maladie.

Dans un cultivar résistant, la reconnaissance des produits des gènes *Avr* conduit à l'activation des réactions de défense de la plante. Par définition, toute molécule capable d'activer

les réactions de défense des plantes est appelée éliciteur (Ebel et Cosio, 1994). Les protéines Avr sont donc considérées comme des éliciteurs spécifiques qui induisent la résistance dans un seul cultivar. Cependant, d'autres composés (protéines, lipides, sucres...) sont capables de provoquer l'activation des réactions de défense chez plusieurs cultivars ou espèces de plantes : on parle alors d'éliciteurs généraux ou aspécifiques.

La perception d'un éliciteur par la plante active des voies de signalisation intra-cellulaires qui mènent généralement à la production de formes actives de l'oxygène (FAO), à l'expression de gènes de défense, à la production de phytoalexines, de protéines PR (pathogenesis related), au renforcement des parois et quelquefois à la mort cellulaire. Dans de nombreuses interactions plantes/pathogènes, la mort des cellules végétales en contact avec le micro-organisme permet de confiner l'agresseur au niveau du site d'infection : c'est la réaction hypersensible (RH). L'ensemble de ces réactions de défense contribue à limiter le développement du pathogène et participe à la résistance active de la plante. De plus, la reconnaissance d'un éliciteur ou d'un micro-organisme par la plante peut, dans certains cas, provoquer une résistance systémique qui protège l'ensemble de la plante contre un large spectre d'agresseurs. Cette résistance systémique a notamment été mise en évidence sur le tabac après application de la cryptogéine, un éliciteur protéique de 10 kD produit par l'oomycète *Phytophthora cryptogea* (Ricci *et al.*, 1989). Dans notre équipe de recherche, les voies de signalisation intra-cellulaires activées par la cryptogéine chez le tabac sont étudiées depuis plusieurs années.

Au sein de cette équipe, mon travail de thèse a eu pour but d'étudier les réactions de défense d'une autre plante, d'intérêt économique : la vigne. En viticulture, la lutte contre les maladies fongiques se fait essentiellement par l'utilisation de produits phytosanitaires. Cet emploi massif suscite des inquiétudes concernant l'environnement et la santé du consommateur tout en nuisant à l'image de tradition et de qualité des vins d'Appellation d'Origine Contrôlée (AOC). Il convient donc de rechercher des moyens alternatifs de lutte contre les pathogènes afin de développer une viticulture raisonnée. Or, l'amélioration de la résistance de la vigne aux maladies par voie génétique (croisement ou transgénèse) est interdite dans les vignobles d'AOC pour préserver la typicité des crus, en partie liée au patrimoine génétique des cépages. C'est pourquoi,

la stimulation des défenses naturelles de la vigne par l'utilisation d'éliciteurs est une stratégie intéressante qui répond à une demande actuelle de la société.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude consistait à trouver des éliciteurs actifs sur la vigne, à caractériser les réactions de défense de cette plante, et à vérifier que l'activation des défenses de la plante par des éliciteurs pouvait conduire à une résistance accrue aux pathogènes.

2 Spécificité des interactions plantes/pathogènes

La résistance active de la plante est provoquée par la détection d'éliciteurs qui témoignent de la présence d'un micro-organisme potentiellement pathogène. Elle peut être très spécifique d'un couple race/cultivar et basée sur la reconnaissance « gène pour gène », ou plus générale et induite par la reconnaissance d'éliciteurs aspécifiques.

2-1 Résistance race/cultivar spécifique : modèle « gène pour gène »

Le concept « gène pour gène » a été développé par Flor à partir de l'étude génétique des interactions qui existent entre le lin et *Melampsora lini* (Flor, 1942 ; Flor, 1971). Le modèle le plus simple pour expliquer ce concept génétique suggère l'existence d'une reconnaissance spécifique entre les produits des gènes *Avr* et *R* (Bent, 1996 ; Hammond-Kosack et Jones, 1997). C'est pourquoi N.T. Keen (1972) a développé la notion d'éliciteur pour désigner les produits des gènes *Avr* qui activent les réactions de défense des plantes possédant le gène *R* partenaire (Keen et Partridge, 1972). L'existence d'une interaction physique éliciteur/récepteur, produits respectifs des gènes *Avr/R*, fut alors suggérée pour expliquer les relations compatibles ou incompatibles. Depuis, cette interaction physique entre les produits des gènes *Avr* et *R* a pu être démontrée dans quelques cas (Jia *et al.*, 2000 ; Tang *et al.*, 1996a ; Leister et Katagiri, 2000) et de nombreux gènes d'avirulence et de résistance ont été identifiés.

2-1-1 Les gènes d'avirulence microbiens

Malgré l'identification de plus de 40 gènes *Avr* d'origine virale, bactérienne ou fongique, la plupart d'entre eux n'ont pas d'entité structurale commune (pour revue : Bonas et Lahaye, 2002). De plus, la fonction de la majorité des produits des gènes *Avr* est encore inconnue. Il subsiste donc une certaine ignorance quant à leur utilité pour le micro-organisme. La pression de sélection exercée par l'existence de nombreux gènes de résistance végétaux aurait dû conduire les pathogènes à éliminer leurs gènes *Avr*. Mais, le maintien de ces gènes *Avr* suggère qu'ils jouent un rôle dans la virulence du pathogène sur des plantes sensibles (Nimchuk *et al.*, 2001).

Cette idée s'appuie sur des études qui ont montré que certains gènes *Avr*, qui codent des protéines impliquées dans la réplication, l'encapsidation ou le mouvement des virus et qui participent donc à leur virulence, sont reconnues par les protéines R correspondantes (Kjemtrup *et al.*, 2000). Elle s'appuie également sur le fait que des bactéries possédant un gène *Avr* se développent mieux sur des cultivars sensibles que des bactéries qui en sont dépourvues (Tsiamis *et al.*, 2000). De plus, les produits de nombreux gènes *Avr* bactériens, reconnus par des protéines R, sont des protéines qui appartiennent ou utilisent le système de sécrétion de type III (Mudgett and Staskawicz, 1998). Ce système de sécrétion est retrouvé dans la plupart des bactéries gram⁻ pathogènes des mammifères ou des plantes. Il permet à la bactérie d'injecter dans la cellule hôte des protéines effectrices qui peuvent être des facteurs de virulence ou d'avirulence, en fonction de la présence ou non de la protéine R correspondante. Les gènes codant ces protéines avaient d'ailleurs été appelés *Hrp* pour « hypersensitive reaction and pathogenicity » puisque ces gènes déterminent à la fois la capacité de la bactérie à être pathogène sur un cultivar sensible et à déclencher la RH sur les cultivars résistants (Collmer, 1998). Il semble donc que certaines protéines *Avr* soient à l'origine des facteurs de virulence que quelques cultivars ont reconnus au cours de la co-évolution plantes/pathogènes. C'est pourquoi des mutations ciblées dans un gène *Avr* ou *R* qui suppriment l'interaction physique entre les deux protéines rendent le pathogène virulent et la plante sensible (Jia *et al.*, 2000).

2-1-2 Les gènes de résistance des plantes

Depuis l'isolement du premier gène de résistance en 1993 (Martin *et al.*, 1993), de nombreux gènes *R* qui confèrent des résistances à des virus, des bactéries, des champignons, ou des nématodes ont été identifiés chez différentes espèces végétales (Jones, 2001). L'analyse des produits de l'ensemble des gènes *R* a montré qu'ils possèdent généralement des motifs protéiques communs caractéristiques des récepteurs retrouvés chez la levure, la drosophile ou les mammifères. Ils ont été regroupés en 4 classes en fonction de ces motifs et de la localisation cellulaire des protéines R (Figure 01).

La première classe regroupe les gènes *R* qui codent pour des protéines intra-cellulaires de type NBS-LRR. Les motifs « leucine rich repeat » (LRR) sont impliqués dans divers types

d'interaction protéine-ligand (Kajava, 1998). Ces LRR seraient des motifs très évolués qui détermineraient la spécificité de la reconnaissance par la variabilité fréquente de certains acides-aminés (Dangl et Jones, 2001). Le site de liaison aux nucléotides (NBS) est essentiel pour la liaison de l'ATP ou du GTP dans d'autres protéines comme l'adénylate cyclase (Traut, 1994). La présence de ce motif suggère que les protéines R puissent notamment activer des protéines kinases au sein d'un complexe multimérique, permettant ainsi la transduction du signal après fixation de leur ligand. Dans ce groupe (Classe Ib), on distingue les protéines codées par les gènes *Cre3* du blé conférant la résistance à un nématode (Lagerdah *et al.*, 1997), *Rp1* du maïs (résistance à *Puccinia sorghi* 1 ; Collins *et al.*, 1999), *Mla* de l'orge responsable de la résistance à *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Zhou *et al.*, 2001) et *Pib* et *Pi-ta* impliqués dans la résistance du riz à *Magnaporthe grisea* (Wang *et al.*, 1999 ; Jia *et al.*, 2000). L'interaction physique entre le domaine LRR de la protéine *Pi-ta* et le produit du gène d'avirulence *Avr-Pita* de *Magnaporthe grisea* a récemment été mise en évidence *in vitro* et par la méthode du double hybride (Jia *et al.*, 2000). D'autres protéines possèdent en plus des domaines NBS et LRR, un domaine de type coiled-coil (CC), constitué de deux à cinq hélices. Deux protéines possédant un domaine CC peuvent interagir ensemble par un mécanisme de type fermeture « Eclair » à leucines (leucine-zipper ; LZ). Les interactions protéines-protéines, *via* les domaines CC, pourraient participer à la transduction du signal. Les protéines R de type NBS-LRR-CC correspondent notamment aux produits des gènes *RPS2* et *RPM1* d'*Arabidopsis thaliana* impliqués dans la résistance à différentes races de *Pseudomonas syringae* (Bent *et al.*, 1994 ; Mindrinos *et al.*, 1994 ; Grant *et al.*, 1995), et *I2* de la tomate (résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersicon* ; Ori *et al.*, 1997). Dans d'autres protéines, le domaine CC est remplacé par un domaine « Toll and Interleukin 1 Receptor » (TIR). La protéine Toll contrôle l'induction de gènes impliqués dans l'immunité chez la drosophile (Lemaître *et al.*, 1996). Le domaine TIR est présent dans les protéines *Prf* de tomate (résistance à *Pseudomonas syringae* pv *tomato* ; Salmeron *et al.*, 1996), *N* de tabac qui est impliquée dans la résistance au virus de la mosaïque du tabac (Whitham *et al.*, 1994), *L6* et *M* du lin responsables de la résistance à deux races de *Melampsora lini* (Lawrence *et al.*, 1995 ; Anderson *et al.*, 1997), *RPP5* et *RPS4* d'*Arabidopsis thaliana* respectivement impliquées dans la résistance à *Peronospora parasitica* et *Pseudomonas syringae* pv *tomato*

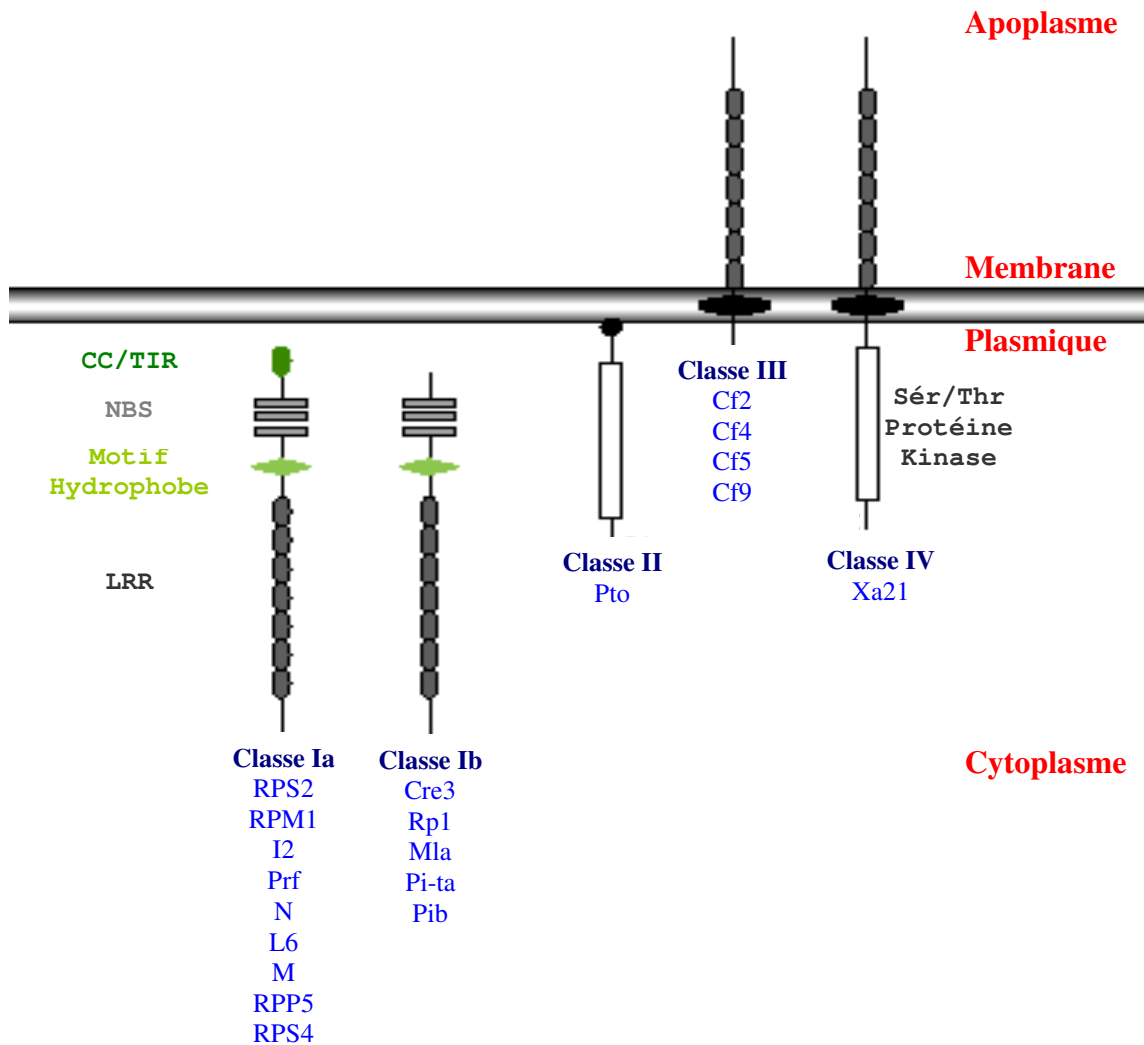


Figure 01 : Structure et localisation cellulaire des produits des gènes de résistance de différentes classes.

Les domaines identiques sont de même forme et de même couleur. **CC** : “Coiled-Coil”. **TIR** : “Toll and Interleukin 1 Receptor”. **NBS** : “Nucleotide Binding Site”. **LRR** : “Leucine Rich Repeat”.

(Parker *et al.*, 1997 ; Gassmann *et al.*, 1999). Ces deux derniers types de protéines R (CC- ou TIR-NBS-LRR) constituent la classe Ia.

Les gènes *R* de la seconde classe codent des sérine/thréonine protéines kinases. *Pto* fut le premier gène de résistance qui confirma le concept « gène pour gène » puisqu'une interaction physique AvrPto/Pto fut démontrée (Tang *et al.*, 1996a). Il confère, en présence du gène *Prf* (NBS-LRR), la résistance de la tomate à la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* porteuse du gène d'avirulence *AvrPto* (Martin *et al.*, 1993). *Pto* est une sérine/thréonine protéine kinase cytoplasmique qui interagit à la fois avec AvrPto mais aussi avec des facteurs de transcription (Pti4, Pti 5 et Pti 6) de gènes de défense (Van der Biezen et Jones, 1998).

La troisième classe est principalement composée des gènes *Cf* de la tomate. Les protéines Cf2, Cf4, Cf5 et Cf9 des cultivars correspondants ne contiennent que des motifs LRR extra-cellulaires. Elles confèrent la résistance des cultivars de tomate aux races de *Cladosporium fulvum* portant respectivement les gènes *Avr2*, *Avr4*, *Avr5* et *Avr9* (Thomas *et al.*, 1998).

Les protéines qui correspondent à la quatrième classe de gènes *R* sont transmembranaires (membrane plasmique), comportent un motif LRR extra-cellulaire et un domaine kinase intra-cellulaire. Le gène *Xa21* du riz, qui permet la reconnaissance du produit du gène *AvrXa21* de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*, appartient à cette famille (Song *et al.*, 1995).

Le gène de résistance *RPW8* qui confère la résistance d'*Arabidopsis thaliana* à *Erysiphe orontii* n'a pour l'instant pas été classé. La protéine correspondante serait membranaire et ne présente qu'un motif CC (Xiao *et al.*, 2001).

La probable co-localisation sub-cellulaire (Figure 02) des protéines R et des protéines Avr correspondantes est en faveur d'une interaction physique des deux protéines. Ainsi, la plupart des protéines Avr bactériennes sont injectées dans le cytoplasme de l'hôte *via* le système de sécrétion de type III (Staskawicz *et al.*, 2001) et les protéines R correspondantes ont des séquences qui suggèrent une localisation dans le cytoplasme. Par contre, la protéine Avr9 du champignon non invasif *Cladosporium fulvum* est sécrétée dans l'apoplaste (Joosten et De Wit, 1999), et les motifs LRR de Cf9, la protéine R correspondante, sont extra-cellulaires (Piedras *et al.*, 2000). Les protéines conférant la résistance à des champignons invasifs sont localisées dans le cytoplasme, suggérant que ces micro-organismes transfèrent les protéines Avr à l'intérieur des

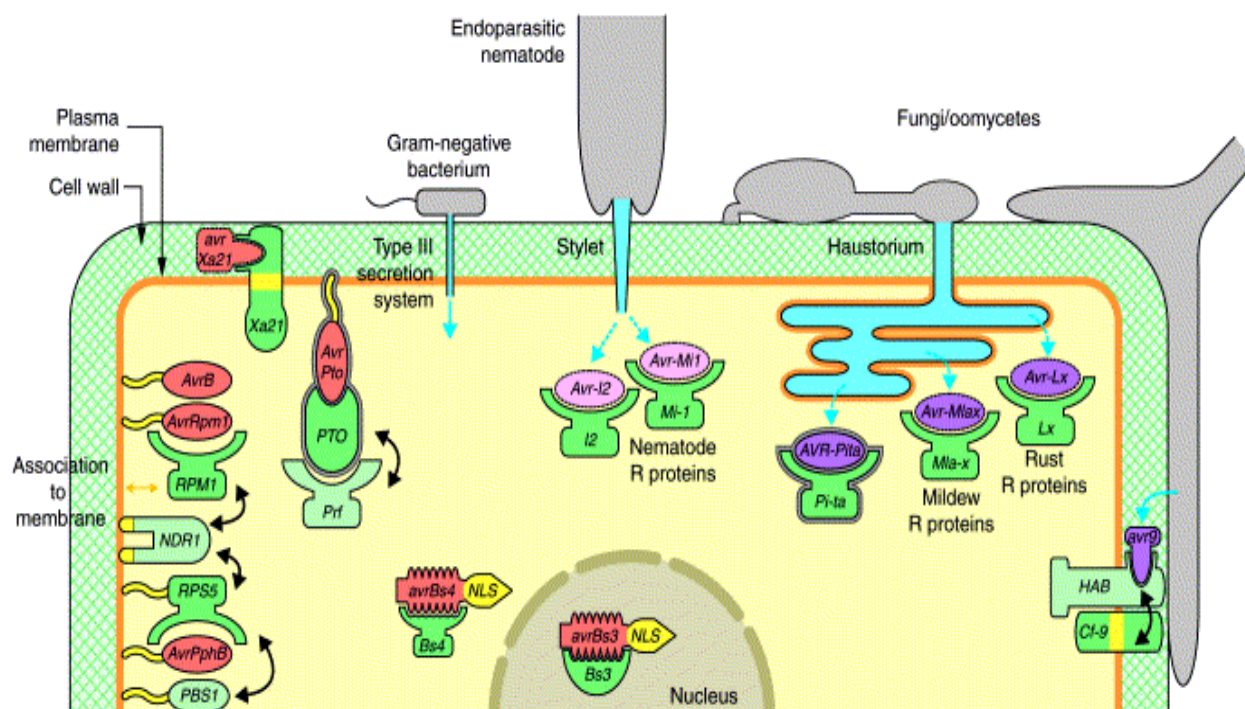


Figure 02 : Co-localisation des protéines de résistance et des produits des gènes *Avr* correspondants dans différentes interactions plantes/pathogènes (d'après Bonas et Lahaye, 2002).

L'analyse des protéines *Avr* bactériennes et des protéines *R* correspondantes révèle généralement une interdépendance spatiale. La prédiction de la localisation intra-cellulaire de nombreuses protéines *R*, qui confèrent la résistance à des champignons invasifs ou à des nématodes, suggère que les protéines *Avr* correspondantes sont transférées par le pathogène dans le cytoplasme de l'hôte. Les protéines *Avr* de bactéries, de champignons ou de nématodes sont respectivement en rouge, violet et rose. Les protéines impliquées dans la résistance sont en vert (clair ou foncé). Les interactions physiques *R/Avr* démontrées sont entourées d'un filet gris. Les systèmes invasifs des pathogènes sont en bleu. Les flèches bleues indiquent les voies de transfert probablement empruntées par les protéines *Avr*. Les flèches noires indiquent les protéines interdépendantes.

cellules végétales *via* l'haustorium. Cette hypothèse s'appuie sur des expériences d'expression *in planta* de *Avr-Pita*, issu du champignon invasif *Magnaporthe grisea*, dans des plantes exprimant le gène de résistance *Pi-ta*. En effet, cette expression hétérologue dans le cytoplasme conduit à la mort cellulaire alors que l'infiltration dans l'apoplaste de *Avr-Pita* n'induit pas la RH (Jia *et al.*, 2000).

Cependant, l'interaction physique entre des protéines R et Avr, issue du concept « gène pour gène », n'a pu être mise en évidence que dans trois systèmes : *AvrPto/Pto* chez la tomate (Tang *et al.*, 1996a), *Avr-Pita/Pi-ta* chez le riz (Jia *et al.*, 2000) et *AvrRPT2/RPS2* chez *Arabidopsis thaliana* (Leister et Katagiri, 2000). Dans d'autres cas (comme *Avr9/Cf9*), il a été montré que cette interaction physique directe R/Avr n'existe pas (Luderer *et al.*, 2001). Pour expliquer les cas où cette interaction physique n'a pas pu être mise en évidence, certains auteurs ont imaginé un nouveau modèle à trois composantes : le modèle de garde (Van der Biezen et Jones, 1998 ; Dangl et Jones, 2001 ; Bonas et Lahaye, 2002 ; Van der Hoorn *et al.*, 2002). En effet, dans plusieurs interactions incompatibles, la résistance race/cultivar nécessite la présence d'au moins deux *loci* distincts chez la plante. Ainsi, la reconnaissance spécifique des souches de *Pseudomonas syringae* porteuses du gène *AvrPphB* requiert la présence des deux gènes *RPS5* (NBS-LRR) et *PBS1* (Sér/Thr kinase) chez *Arabidopsis thaliana* (Swiderski et Innes, 2001). Chez la tomate, bien qu'il existe une interaction physique *AvrPto/Pto* (Sér/Thr kinase), c'est la présence du produit du gène *Prf* (NBS-LRR) qui déclenche la résistance (Salmeron *et al.*, 1996). De même, la résistance à *Cladosporium fulvum* exprimant *Avr2* nécessite la présence des gènes *Cf-2* et *Rcr3* dans le génome de la tomate (Dixon *et al.*, 2000). Enfin, bien qu'il n'existe pas d'interaction physique *Avr9/Cf9* (Luderer *et al.*, 2001), il existe une autre protéine (HABS pour high affinity binding site) capable de fixer *Avr9* (Kooman-Gersmann *et al.*, 1996 ; Kooman-Gersmann *et al.*, 1998). Par ailleurs, la structure et la fonction prédites de certaines de ces protéines de la plante hôte suggéraient qu'elles étaient en fait la cible de virulence des pathogènes. Par exemple, la protéine *Pto* est une kinase cytoplasmique capable de phosphoryler des facteurs de transcription (*Pti1*, *Pti 4*, *Pti5*, *Pti6*) impliqués dans l'expression de gènes de défense (Van der Biezen et Jones, 1998 ; Gu *et al.*, 2000). Van der Biezen et Jones (1998) ont alors supposé que dans les cultivars sensibles, la séquestration de *Pto* par *AvrPto* bloquait

l'interaction de Pto avec les Pti, inhibant ainsi les réactions de défense et conduisant à une virulence accrue du pathogène. Au contraire, dans les cultivars résistants, la protéine Prf (NBS-LRR) participe à l'activation des réactions de défense de la tomate après avoir reconnu soit l'interaction Pto/AvrPto soit une modification structurale de Pto induite par AvrPto (Dangl et Jones, 2001). Dans ce cas, Prf est la protéine de garde capable de détecter une modification de Pto, cible de virulence de la protéine AvrPto. Plus généralement, dans ce modèle de garde, la résistance de la plante est donc liée à l'existence d'une protéine de garde (R) qui reconnaît une modification de la cible de virulence (VT pour virulence target) induite par la protéine (Avr). C'est donc un modèle à trois partenaires Avr/VT/R dans lequel la présence de la protéine de garde va transformer une réaction compatible en réaction incompatible. Ce modèle de garde vient d'être démontré expérimentalement par Mackey *et al.* (2002). Ces auteurs ont étudié la protéine RPM1 d'*Arabidopsis thaliana* et la protéine AvrRpm1 de la bactérie *Pseudomonas syringae* sp. *maculicola* 1. Les protéines AvrRpm1 sont injectées dans le cytoplasme via le système de sécrétion type III et la protéine RPM1 est intra-cellulaire. Alors qu'une interaction physique entre RPM1 et AvrRpm1 était supposée, Mackey *et al.* ont montré qu'il existait une protéine intermédiaire capable d'interagir à la fois avec RPM1 et AvrRpm1 : la protéine RIN4 (RPM1-interacting protein-4). Ils ont ensuite découvert que RIN4 inhibait l'expression basale des gènes de défense. De plus, dans les cultivars sensibles, AvrRpm1 phosphoryle RIN4 en augmentant probablement sa capacité de réguler négativement les réactions de défense, favorisant alors le développement de la bactérie (Figure 03). Par contre, dans les cultivars résistants, la protéine RPM1 déclenche une mort cellulaire localisée (RH) après détection d'une modification de la protéine RIN4 induite par AvrRpm1, inhibant ainsi le développement de *Pseudomonas syringae*. Ainsi, ces auteurs ont montré qu'une protéine Avr peut agir comme un facteur de virulence capable d'augmenter l'activité d'un inhibiteur de réactions de défense dans les cultivars sensibles. Ils ont aussi mis en évidence que, dans les cultivars résistants, la protéine de garde RPM1 reconnaît une modification de la cible de virulence RIN4 induite par AvrRpm1. Plus généralement, la résistance race/cultivar spécifique pourrait soit dépendre d'une interaction physique Avr/R de type ligand-récepteur (cas de AvrPita/Pi-ta), soit de la reconnaissance, par la protéine de garde, d'une modification de la cible de virulence induite par la protéine Avr :

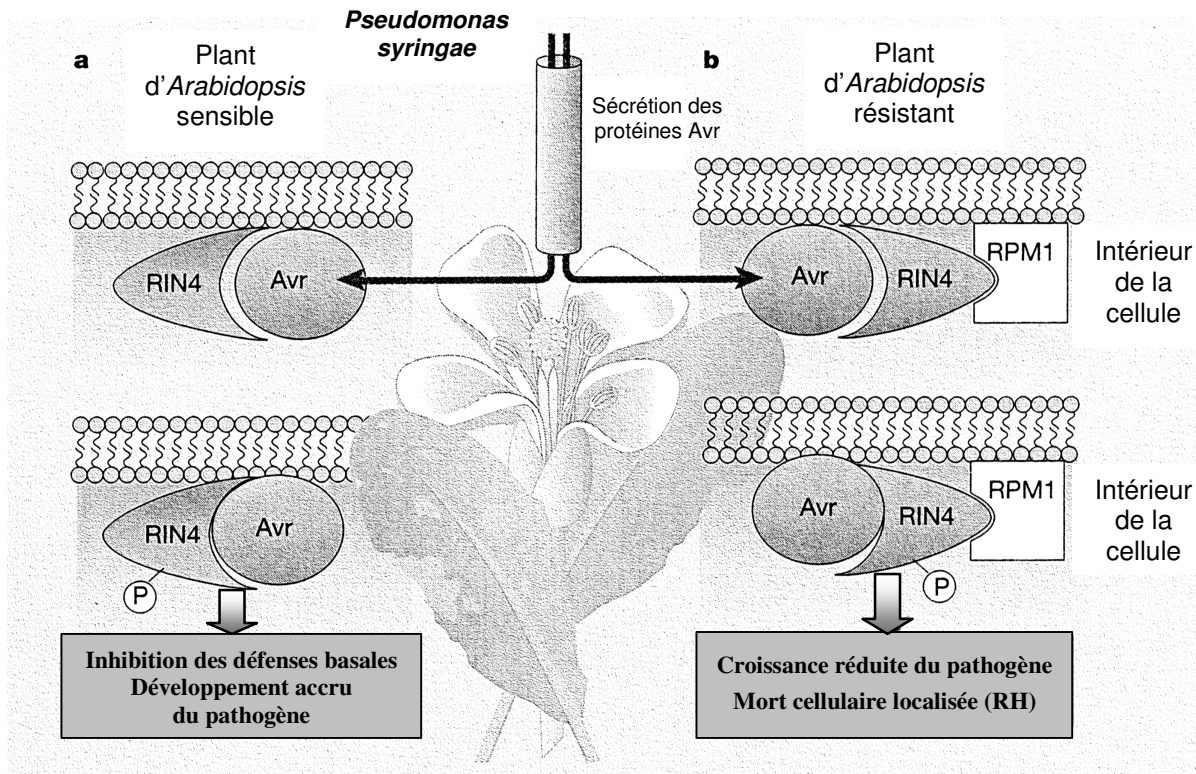


Figure 03 : Modèle de garde impliquant les protéines AvrRpm1/RIN4/RPM1 dans l'interaction *Arabidopsis thaliana*/*Pseudomonas syringae* (d'après De Wit, 2002 ; Mackey *et al.*, 2002)

a : dans les génotypes sensibles, la protéine Avr se fixe à RIN4 et la phosphoryle. Cette phosphorylation de RIN4 provoque une augmentation de son activité inhibitrice des réactions de défense de la plante permettant ainsi le développement accru du micro-organisme. Dans ce cas, la protéine Avr est considérée comme un facteur de virulence.

b : dans les génotypes résistants, RPM1 reconnaît une modification de RIN4 induite par la protéine Avr bactérienne, ce qui entraîne l'activation de la RH et permet de restreindre le développement du micro-organisme. Ici, Avr est une protéine d'avirulence.

interactions Avr/VT/R ou R est la protéine de garde (cas de AvrRpm1/RIN4/RPM1 ; Figure 04 ; Van der Hoorn *et al.*, 2002).

2-2 Les éliciteurs aspécifiques

Le terme éliciteur était à l'origine utilisé pour définir des molécules qui induisent l'accumulation de phytoalexines chez les plantes (Keen, 1975). Il est maintenant utilisé pour définir des composés biologiques ou chimiques (naturels ou de synthèse) capables d'activer les réactions de défense des plantes (Ebel et Cosio, 1994). Les éliciteurs généraux (ou aspécifiques) sont capables d'activer les réactions de défense sur plusieurs plantes (de variétés, d'espèces ou de genres différents). Cette propriété les différencie des produits de gènes *Avr* impliqués dans la résistance race/cultivar, qui sont des éliciteurs spécifiques d'un seul cultivar (§ 2-1). Les éliciteurs aspécifiques peuvent provenir soit de constituants structuraux microbiens ou végétaux, soit être directement sécrétés par le micro-organisme. Nombre d'entre eux ont été identifiés et ils sont de natures chimiques variées : sucre, peptide, (glyco)protéine, lipide...

2-2-1 Les éliciteurs (glyco)protéiques

Parmi les éliciteurs protéiques, certains induisent une RH, les autres provoquent des réactions de défense sans mort cellulaire.

Les élicitines sont des protéines de 10 kD sécrétées par la plupart des espèces de *Phytophthora* (Kamoun *et al.*, 1993). Seuls les isolats pathogènes du tabac (*Phytophthora parasitica* pv *nicotianae*) n'en sécrètent pas durant leur interaction avec la plante (Bonnet *et al.*, 1994). Ces élicitines purifiées déclenchent une RH chez le tabac et protègent la plante entière contre un large spectre de pathogènes (tel que *Phytophthora parasitica* pv *nicotianae*) par la mise en place d'une résistance systémique (Ricci *et al.*, 1989). Toutes les variétés de *Nicotiana tabacum* (et certaines espèces du genre *Nicotiana*) répondent aux diverses élicitines. Des élicitines ont été purifiées et séquencées à partir d'une dizaine d'espèces de *Phytophthora* (Yu, 1995 ; Ricci, 1997). Toutes induisent des nécroses foliaires sur tabac mais les élicitines basiques sont environ 100 fois plus efficaces que les élicitines acides (Nespoulous *et al.*, 1992 ; Pernollet *et al.*, 1993). L'élicitine la plus étudiée est la cryptogéine, produite par *Phytophthora cryptogea*.

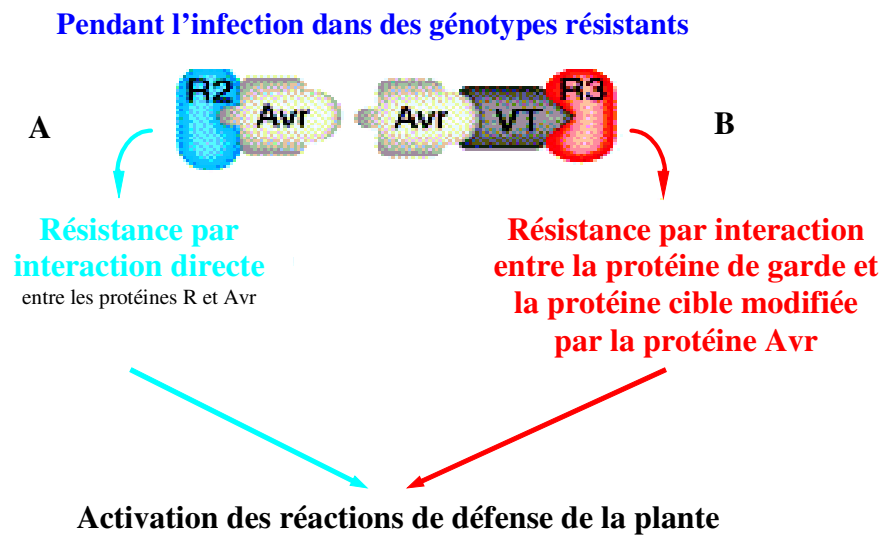


Figure 04 : Modèle simplifié de la résistance race/cultivar dans le cas d'une reconnaissance directe ou indirecte de la protéine Avr par la protéine R correspondante (d'après Van der Hoorn *et al.*, 2002).

Dans des plantes résistantes, les protéines R sont capables de reconnaître la protéine Avr elle-même (A) ou une modification de la protéine cible (VT) provoquée par la protéine Avr (B). Cet événement de reconnaissance déclenche l'activation des réactions de défense et rend la plante résistante.

Avr : protéine codée par un gène d'avirulence du pathogène. **VT** : cible de virulence de la protéine Avr, qui peut être une protéine modulatrice des réactions de défense de la plante. **R2** : protéine de résistance qui déclenche l'activation des réactions de défense après interaction physique avec la protéine Avr. **R3** : protéine de résistance qui déclenche l'activation des réactions de défense après reconnaissance d'une modification de la protéine VT provoquée par la protéine Avr.

Elle est constituée de 98 acides aminés, dont 6 cystéines engagées dans trois ponts disulfures intra-moléculaires (Boissy *et al.*, 1996). La cryptogéine purifiée reproduit les nécroses observées avec le champignon à des doses aussi faibles que 100 picomoles par plante (Ricci, 1997). Elle est capable de fixer des acides gras (Osman *et al.*, 2001) et de transporter des stérols indispensables à la reproduction du champignon, stérols qu'il est incapable de synthétiser (Mikes *et al.*, 1997 ; Mikes *et al.*, 1998). De plus, il a été montré que l'expression du gène de la cryptogéine dans des plants de tabac, avec un adressage apoplastique, leur confère une résistance accrue aux pathogènes, notamment à *Phytophthora parasitica* pv. *nicotianae* (Keller *et al.*, 1999). Sur suspensions cellulaires de tabac, l'utilisation de la cryptogéine a permis d'étudier les voies de signalisation qui participent à l'activation de réactions de défense (§ 3).

Des éliciteurs protéiques aspécifiques ont également été purifiées à partir de bactéries du genre *Erwinia* et *Pseudomonas*. Ces protéines, appelées harpines, provoquent une RH sur plantes (Wei *et al.*, 1992 ; He *et al.*, 1993).

La mégaspermine, une glycoprotéine de 32 kD purifiée du filtrat de culture de *Phytophthora megasperma* H20, est également capable de provoquer une RH lorsqu'elle est infiltrée dans des feuilles de tabac. Elle induit notamment la production d'acide salicylique, l'expression de gènes de défense, la synthèse de protéines PR et une résistance systémique (Baillieul *et al.*, 1995).

Une autre glycoprotéine, de 42 kD, a été isolée de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* (Parker *et al.*, 1991). Cet éliciteur induit notamment la production d'H₂O₂, l'expression de gènes codant des protéines PR et la production de phytoalexines dans les suspensions cellulaires de persil (Parker *et al.*, 1991 ; Nürnberger *et al.*, 1994). A partir de cette glycoprotéine, un peptide actif minimal de 13 acides aminés a été obtenu (Pep-13). Pep-13 provoque les mêmes réactions de défense que la glycoprotéine de 42 kD (Nürnberger *et al.*, 1994).

De la même façon, un peptide éliciteur de 22 acides aminés (flg22) a été isolé dans la partie N-terminale de la flagelline ; protéine du flagelle conférant la motilité de certains bacilles (Felix *et al.*, 1999). Ce peptide est actif sur de nombreuses espèces végétales et la reconnaissance de la flagelline ou de flg22 par *Arabidopsis thaliana* dépend du gène *FLS2* qui code une protéine possédant des motifs LRR et kinase (Gomez-Gomez et Boller, 2000). Par contre, les peptides correspondants issus de la flagelline de bactéries pathogènes des plantes (*Agrobacterium*

tumefaciens et *Ralstonia melilotii*) sont inactifs (Gomez-Gomez *et al.*, 1999). Sur plants d'*Arabidopsis thaliana*, flg22 induit des dépôts de callose, la production d'éthylène et entraîne l'expression de certains gènes de défense mais ne provoque pas de RH (Gomez-Gomez et Boller, 2002).

Une autre protéine élicitrice (PaNie) a été identifiée à partir de *Pythium aphanidermatum*. Dans des suspensions cellulaires de carotte, elle induit l'accumulation d'acide 4-hydroxybenzoïque et la mort cellulaire. Lorsqu'elle est infiltrée dans des feuilles de dicotylédones, PaNie induit la formation de nécroses et le dépôt de callose. Par contre, il semble qu'elle soit inactive sur les monocotylédones (Veit *et al.*, 2001).

2-2-2 Les éliciteurs oligosaccharidiques

Les éliciteurs oligosaccharidiques sont essentiellement de quatre types : les β -glucanes (polymère ramifié de β -1,6-, β -1,3-glucose ou polymère linéaire de β -1,3-glucose), les oligomères de chitine (polymère de β -1,4 N-acétyl glucosamine), de chitosan (polymère de β -1,4 glucosamine), et les oligogalacturonates (polymère de α -1,4 acide galacturonique). Ils sont généralement libérés par des hydrolases du pathogène ou de la plante, à partir des parois végétales ou fongiques.

Ajoutés à des suspensions cellulaires, les oligomères de chitine ou de chitosan peuvent notamment provoquer l'accumulation de phytoalexines, de chitinases et des dépôts de callose (Hadwiger et Beckman, 1980 ; Conrath *et al.*, 1989 ; Ren et West, 1992 ; Ebel, 1998). La nature et l'intensité des réponses de défense induites dépend de l'espèce végétale mais aussi du degré de polymérisation (dp) et d'acétylation des oligomères éliciteurs (Boller, 1995 ; Vander *et al.*, 1998 ; Asensio *et al.*, 2000).

Les premiers β -glucanes identifiés furent détectés dans les filtrats de culture de *Phytophthora megasperma* pv *sojae* (Ayers *et al.*, 1976). Le plus petit d'entre eux est un heptaglucoside (chaîne pentamérique de β -1,6-glucose ramifiée par une liaison β -1,3-glucose sur les monomères 2 et 4) capable d'induire la production de phytoalexines dans des suspensions cellulaires de soja (Sharp *et al.*, 1984). La laminarine (polymère linéaire de β -1,3-glucose de dp 25 à 30) extraite de l'algue brune *Laminaria digitata*, induit un ensemble de réactions de défense

chez le tabac et provoque une résistance accrue à une souche de la bactérie *Erwinia carotovora* (Klarzynski *et al.*, 2000 ; Lecourieux *et al.*, 2002).

Des oligogalacturonates (OG) éliciteurs ont été obtenus après hydrolyse acide ménagée de parois végétales (Hahn *et al.*, 1981) ou par digestion *in vitro* de pectine par des enzymes pectinolytiques microbiennes (Davis *et al.*, 1986). Les OG les plus actifs (OGA) ont un dp compris entre 10 et 15 (Mathieu *et al.*, 1991). Ils induisent plusieurs événements de signalisation (§ 3) qui mènent notamment à l'accumulation de phytoalexines (Jin et West, 1984) et d'activités glucanases (Davis et Hahlbrock, 1987). *In vitro*, les enzymes pectinolytiques (endopolygalacturonase, pectate lyase ou pectine lyase) dégradent rapidement l'acide polygalacturonique en mono-, di- et quelquefois tri-mère d'acide galacturonique, biologiquement inactifs (De Lorenzo *et al.*, 1993). Il existe au niveau des parois végétales des protéines capables de ralentir *in vitro* l'activité enzymatique de certaines polygalacturonases fongiques, permettant ainsi la libération d'OG plus longs actifs (Cervone *et al.*, 1989). Cervone et al. suggèrent que, *in vivo*, ces protéines inhibitrices de polygalacturonases (PGIP ; § 3-3-3) se fixeraient spécifiquement, par leurs motifs LRR (Federici *et al.*, 2001), à certaines polygalacturonases fongiques pour les inhiber et permettre la libération d'OG longs actifs (Cervone *et al.*, 1987). Cependant, dans les parois végétales, la pectine est essentiellement composée de galacturonanes méthylés à environ 70%. Or l'activité enzymatique de quatre polygalacturonases d'*Aspergillus niger* est réduite de 95% à 98% (en fonction des enzymes) lorsque le degré de méthylation de l'homogalacturonane passe de 0% à 75% (Benen *et al.*, 1999). L'hypothèse de Cervone et al. suppose donc, *in vivo*, l'action préalable d'une pectine méthyl estérase (végétale ou fongique). Une autre enzyme pectinolytique, la pectine lyase, peut libérer des OG à partir d'homogalacturonanes méthylés. Néanmoins, il a été montré que l'activité élicitrice de la pectine lyase ne provenait pas de la libération d'OGA à partir de la paroi cellulaire végétale (Rouet-Mayer *et al.*, 1997). Par ailleurs, de nombreuses polygalacturonases (notamment bactériennes) ne sont pas inhibées par les PGIP (Cervone *et al.*, 1990). Dans l'état actuel des connaissances, des études sont encore nécessaires pour mieux comprendre le rôle des polygalacturonases, des PGIP et des OG lors d'interactions plantes/pathogènes.

2-2-3 Les éliciteurs lipidiques

L'ergostérol, stérol majeur de la membrane lipidique chez les champignons, induit une alcalinisation du milieu de culture de suspensions cellulaires de tomate alors que les stérols d'origine animale sont inactifs (Granado *et al.*, 1995). L'acide arachidonique induit de nombreuses réactions de défense comme la production d'H₂O₂, l'accumulation de phytoalexine ou la synthèse d'éthylène (Bostock et Kuc, 1981 ; Garcia-Pineda et Lozoya-Gloria, 1999 ; Yoshioka *et al.*, 2001). Les lipo-polysaccharides (LPS) de certaines bactéries permettraient la potentialisation des réactions de défense des plantes, c'est à dire une expression plus forte et plus intense des réactions de défense uniquement en présence d'un micro-organisme (Newman *et al.*, 2002). Newman *et al.* ont montré que si le LPS n'active pas la plupart des gènes de défense, il permet une synthèse accrue de coumaroyl tyramine et de feruloyl tyramine *via* une accumulation de la tyramine hydroxycinnamoyl transférase.

3 Reconnaissance d'un éliciteur, transduction du signal et activation des mécanismes de défense

Trois phases se distinguent dans les mécanismes de défense : reconnaissance du pathogène ou de ses dérivés, transduction du signal, mise en place des réactions de défense.

3-1 Reconnaissance d'un éliciteur

Chez les plantes, l'implication de récepteurs dans la reconnaissance d'un pathogène est supposée en raison de l'existence d'une résistance race/cultivar spécifique, et par la présence au sein des protéines R de motifs protéiques impliqués dans des récepteurs chez la levure, la drosophile ou les mammifères. L'utilisation d'éliciteurs race-spécifiques ou généraux radio-marqués a permis de mettre en évidence, sur la membrane plasmique des cellules végétales, des sites de haute affinité, spécifiques, saturables et réversibles. Des expériences de compétition réalisés entre l'éliciteur actif et des dérivés inactifs, capables cependant de se fixer sur les mêmes sites, indiquent une étroite relation entre la fixation de l'éliciteur et l'activation des réponses

biologiques (Cheong et Hahn, 1991 ; Basse *et al.*, 1993 ; Nürnberger *et al.*, 1994 ; Wendehenne *et al.*, 1995 ; Fath et Boller, 1996 ; Kooman-Gersmann *et al.*, 1996 ; Hanania et Avni, 1997 ; Bourque *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2001).

3-2 Voies de transduction intra-cellulaires

La transduction du signal éliciteur implique entre autres des flux d'ions, des phosphorylations de protéines et la production de formes actives de l'oxygène. Par exemple, en fonction des plantes testées, les OGA induisent une partie ou l'ensemble des événements suivants : des flux d'ions, une acidification du cytoplasme et une dépolarisation de la membrane plasmique (Mathieu *et al.*, 1991 ; Zimmermann *et al.*, 1998), des phosphorylations de protéines (Mathieu *et al.*, 1996), la production de FAO (Legendre *et al.*, 1992 ; Rouet-Mayet *et al.*, 1997 ; Binet *et al.*, 1998), l'activation de MAPK (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998) et une élévation de calcium libre cytosolique (Lecourieux *et al.*, 2002).

3-2-1 Flux ioniques

Suite à la reconnaissance d'un éliciteur, la modification des flux d'ions à travers la membrane plasmique est souvent rapportée. Des flux de Ca^{2+} , de Cl^- , de NO_3^- et de H^+ sont souvent décrits dans différents modèles cellules/éliciteurs (Mathieu *et al.*, 1991 ; Nürnberger *et al.*, 1994 ; Baker *et al.*, 1997 ; Jabs *et al.*, 1997 ; Pugin *et al.*, 1997). Ces flux d'ions sont vraisemblablement dus à l'activation de canaux ioniques (Nürnberger et Scheel, 2001).

Dans les cellules traitées par un éliciteur, l'influx de Ca^{2+} paraît impliqué dans la production de FAO, l'activation de certains gènes de défense et la production de phytoalexines (Hahlbrock *et al.*, 1995 ; Tavernier *et al.*, 1995 ; Yang *et al.*, 1997). Dans plusieurs modèles, des ionophores à Ca^{2+} peuvent mimer certains effets des éliciteurs (Schwacke et Hager, 1992 ; Ishihara *et al.*, 1996). En réponse à des éliciteurs, l'ouverture de canaux calciques de la membrane plasmique (Gelli *et al.*, 1997 ; Zimmermann *et al.*, 1997) peut conduire à une élévation de la concentration en Ca^{2+} libre cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) (Blume *et al.*, 2000 ; Lecourieux *et al.*, 2002). Mais, seule une élévation prolongée dans le temps de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ semble conduire à l'expression de certains gènes de défense et à la production de phytoalexines (Blume *et al.*, 2000 ; Lecourieux *et al.*,

2002). Par ailleurs, un canal Ca^{2+} potentiel (AtCNGC2 pour cyclic nucleotide gated channel 2), produit du gène *DND1* (pour defense no death), a été identifié chez *Arabidopsis thaliana* comme étant impliqué dans l'établissement de la RH en réponse à *Pseudomonas syringae* (Clough *et al.*, 2000).

Des efflux de Cl^- sont provoqués très rapidement après l'addition d'éliciteurs à des suspensions cellulaires (Nürnberger *et al.*, 1994 ; Pugin *et al.*, 1997). Wendehenne *et al.* (2002) viennent de montrer l'importance de ces efflux d'anions dans l'activation des réactions de défense de cellules de tabac en réponse à la cryptogéine. Un intense efflux d'anions (NO_3^-) est situé en amont de la production d' H_2O_2 , de l'activation d'une protéine kinase de 40 kD, de l'expression de certains gènes de défense et de la RH (Wendehenne *et al.*, 2002).

La H^+ -ATPase du plasmalemm est une enzyme importante de la cellule pour le transport des protons dans l'apoplaste et le contrôle des symports ou antiports d'ions associés. Un traitement des cellules par un éliciteur peut provoquer deux types de réponse : soit une inhibition de la H^+ -ATPase parallèle à la dépolarisation de la membrane plasmique (Atkinson et Baker, 1989), soit une activation de cette pompe à protons qui a pour conséquence une acidification du milieu extra-cellulaire et une hyperpolarisation du potentiel de membrane (Vera-Estrella *et al.*, 1994). Chez la tomate, l'activation de la H^+ -ATPase par des éliciteurs spécifiques de *Cladosporium fulvum* semble être due à l'activation d'une phosphatase, elle-même responsable de la déphosphorylation de la pompe à protons (Xing *et al.*, 1996). Dans le tabac, en réponse à la cryptogéine, cette H^+ -ATPase est probablement inhibée (Pugin *et al.*, 1997) mais son inhibition n'a jamais pu être mise en évidence expérimentalement (Pr. A. Pugin, communication personnelle).

3-2-2 Phosphorylation et déphosphorylation de protéines

Les protéines kinases et les protéines phosphatases jouent également un rôle clé dans les cascades de signalisation activées par les éliciteurs, comme dans le cas du modèle *Arabidopsis*/flagelline (Figure 05 ; Gomez-Gomez et Boller, 2002). Des phosphorylations et déphosphorylations de protéines spécifiques interviennent précocement et plus tardivement dans les voies de signalisation conduisant aux réponses de défense (Grab *et al.*, 1989 ; Felix *et al.*,

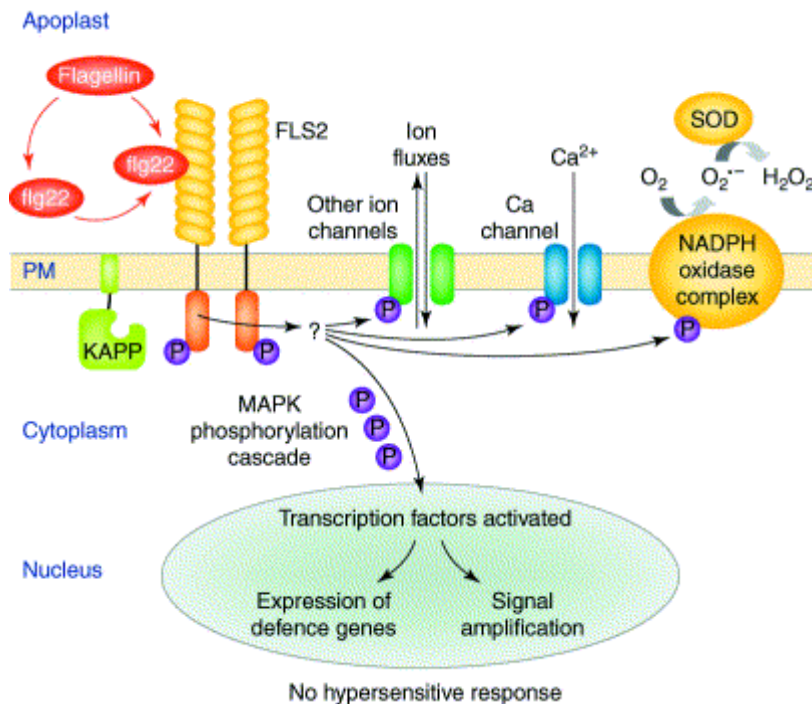


Figure 05 : Modèle de signalisation de la flagelline chez *Arabidopsis thaliana* (d'après Gomez-Gomez et Boller, 2002).

La flagelline (provenant des flagelles bactériens) ou des fragments de flagelline comme flg22 sont reconnus directement ou indirectement par le récepteur à la flagelline sur la membrane plasmique qui comprend notamment la protéine FLS2. Cet événement de reconnaissance pourrait conduire à l'auto-phosphorylation de FLS2 et à la phosphorylation d'autres protéines cibles en aval. Ces cibles protéiques pourraient vraisemblablement être des canaux ioniques, une NADPH-oxydase impliquée dans la production de FAO et une cascade MAPK. Une protéine phosphatase associée aux kinases (KAPP) serait un régulateur négatif de cette voie de signalisation. De plus, l'activation du module MAPK active des facteurs de transcription inconnus qui permettraient l'expression de gènes de défense et des facteurs de transcription de type WRKY. Cependant, l'activation de cette voie n'entraîne pas la RH.

1993 ; Vera-Estrella *et al.*, 1994 ; Viard *et al.*, 1994 ; Suzuki and Shinshi, 1995 ; Desikan *et al.*, 1999 ; Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000 ; Peck *et al.*, 2001). En effet, des inhibiteurs de protéines kinases (K-252a et staurosporine) empêchent l'activation d'événements impliqués dans les réactions de défense comme l'influx de calcium (Tavernier *et al.*, 1995), l'alcalinisation extra-cellulaire (Felix *et al.*, 1991 ; Mathieu *et al.*, 1996), la production de FAO (Chandra et Low, 1995 ; Mathieu *et al.*, 1996), l'activation de MAPK (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998), ou la transcription de gènes de défense (Suzuki et Shinshi, 1995). A l'opposé, des inhibiteurs de protéines phosphatases (calyculine A) miment l'action d'un éliciteur en induisant une alcalinisation du milieu extra-cellulaire ou une production de FAO (Felix *et al.*, 1994 ; Mathieu *et al.*, 1996 ; Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000). Par ailleurs, le fait que les gènes de résistance *Pto* de la tomate et *Xa21* du riz codent des sérine/thréonine kinases suggère qu'une réaction de phosphorylation doit assurer la liaison entre l'étape de reconnaissance du ligand et la transduction, ou peut même être un des événements de la reconnaissance (Martin *et al.*, 1993 ; Song *et al.*, 1995). Une étude a récemment montré que le domaine kinase intra-cellulaire de la protéine *Xa21* (LRR-kinase responsable de la résistance du riz aux *Xanthomonas*) est impliqué dans l'activation des réactions de défense. He *et al.* (2000) ont construit un gène chimérique en remplaçant les domaines LRR de *Xa21* par ceux de *BRI1* (autre LRR-kinase impliquée dans la perception des brassinostéroïdes). Le traitement par des brassinostéroïdes des suspensions cellulaires de riz exprimant ce gène chimérique a conduit à l'activation des réactions de défense. Ce résultat montre donc que *Xa21* et *BRI1* reconnaissent spécifiquement leur ligand et que la spécificité de la voie de transduction activée est déterminée par le domaine kinase associé au récepteur.

Des travaux récents rapportent également l'implication de modules MAPK en réponse à des éliciteurs variés (pour revue : Romeis, 2001). Deux MAPK, la SIPK (salicylic induced protein kinase) de 50 kD, et la WIPK (wound induced protein kinase) de 46 kD chez le tabac, sont activées en réponse à une infection ou un traitement éliciteur (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 1998 ; Romeis *et al.*, 1999). Les orthologues de ces deux MAPK sont également activés par un éliciteur dans des cellules de persil, d'alfalfa et d'*Arabidopsis thaliana* (Ligterink *et al.*, 1997 ; Cardinale *et al.*, 2000 ; Nuhse *et al.*, 2000). Ainsi, le gène *WIPK* du tabac correspond au

gène *SAMK* d'alfalfa, *AtMPK3* d'*Arabidopsis thaliana*, alors que le gène *SIPK* a pour orthologue le gène *SIMK* d'alfalfa, et *AtMPK6* d'*Arabidopsis thaliana* (Zhang et Klessig, 2001). Or, chez la levure, l'animal ou la plante, l'activation de MAPK par phosphorylation provient de l'activité d'une MAPK Kinase (MAP2K), elle-même activée par une MAP2K Kinase (MAP3K). Cette cascade de MAP kinases permet la transduction d'un signal du récepteur à des facteurs de transcription, grâce à des phosphorylations de protéines. Chez *Arabidopsis thaliana*, il a récemment été montré que toute une cascade MAPK (MEKK1, MKK 4-5, MPK6) et le facteur de transcription WRKY étaient activés après fixation de la flagelline à FLS2 (Asai *et al.*, 2002). Mais, il semble qu'en fonction des cascades MAPK, la régulation des réactions de défense des plantes soit différente. Ainsi, la mutation dans le gène *EDR1* d'*Arabidopsis thaliana* (enhanced disease resistance 1) qui code une MAP3K, provoque une résistance accrue à de nombreux pathogènes, suggérant une régulation négative des réactions de défense par cette MAP3K, chez les plantes sauvages (Frye *et al.*, 2001). Une MAPK (*AtMPK4*) est également soupçonnée de réguler négativement la mise en place de la résistance systémique acquise chez *Arabidopsis thaliana* (Petersen *et al.*, 2000). Au contraire, l'expression d'une MAP2K (*NtMEK2*) constitutivement active dans des tabacs transgéniques provoque l'activation de certains gènes de défense et la mort cellulaire de type hypersensible, ce qui laisse supposer une régulation positive des réactions de défense par cette MAP2K (Yang *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, 20 gènes de MAPK, 10 gènes de MAP2K et 60 gènes de MAP3K ont été identifiés (Ichimura *et al.*, 2002), ce qui donne un aperçu de la complexité globale de ces voies de signalisation.

De plus, d'autres types de protéines kinases sont impliqués dans la phosphorylation de protéines lors de la transduction des signaux éliciteurs. Par exemple, Romeis *et al.* (2000) ont mis en évidence l'activation d'une CDPK (calcium dependent protein kinase) lors de l'interaction *Avr9/Cf-9*.

3-2-3 Formes actives de l'oxygène (FAO)

Les plantes répondent aux pathogènes par une production rapide de FAO constituée principalement de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), de radicaux hydroxyls ($OH^{\cdot}$) et d'oxyde nitrique (NO), ce dernier semblant exercer des fonctions

complémentaires des autres FAO (Baker *et al.*, 1993 ; Mehdy, 1994 ; Lamb et Dixon, 1997 ; Pugin *et al.*, 1997 ; Sandermann, 2000 ; Wendehenne *et al.*, 2001).

Dans les plantes, la production de FAO, aussi appelée « burst oxydatif », pourrait avoir plusieurs origines : l'activation du complexe NADPH-oxydase de la membrane plasmique (Hammond-Kosack et Jones, 1996 ; Blumwald *et al.*, 1998), une activité oxydase-peroxydase du plasmalemma (Papadakis et Roubelakis-Angelakis, 1999) ou un système de type flavine-oxydase intra-cellulaire (Allan et Fluhr, 1997). Chez les mammifères, la formation du complexe de la NADPH-oxydase dépend d'une phosphorylation de protéines. Ainsi, les sous-unités gp91 et p22 demeurent silencieuses au niveau de la membrane plasmique jusqu'à ce qu'un événement de phosphorylation permette l'accrochage des deux sous-unités cytosoliques p47 et p67 aux deux précédentes pour former le complexe enzymatique actif au niveau de la membrane plasmique (Nürnberg et Scheel, 2001). L'identification d'homologues gp91 du complexe enzymatique de la NADPH-oxydase de mammifères, notamment chez le riz et *Arabidopsis thaliana*, suggère l'existence de ce type de complexe enzymatique chez les plantes (Groom *et al.*, 1996 ; Torres *et al.*, 1998).

Le rôle des FAO dans les réactions de défense est multiple. En particulier, elles ont une action toxique directe sur le pathogène (Mehdy, 1994) et elles induisent des renforcements de paroi qui ralentissent la dégradation pariétale par les hydrolases du pathogène (Brisson *et al.*, 1994 ; Brady et Fry, 1997). Une connexion existe entre la production de FAO et la synthèse de phytoalexines dans certains systèmes plantes/pathogènes (Mehdy, 1994 ; Jabs *et al.*, 1997) alors que l'indépendance de ces deux événements est rapportée pour d'autres modèles (Levine *et al.*, 1994 ; Rustérucci *et al.*, 1996 ; Mithöfer *et al.*, 1997). Par ailleurs, la production de FAO pourrait jouer un rôle important dans le développement de la mort cellulaire caractéristique de la RH (Levine *et al.*, 1994 ; Harding et Roberts, 1998 ; Jabs, 1999) mais d'autres études démontrent que ces deux événements sont dissociés (Glazener *et al.*, 1996 ; Dorey *et al.*, 1999 ; Binet *et al.*, 2001). Cette contradiction apparente pourrait s'expliquer par un effet synergique de NO et d'H₂O₂ dans l'induction de la RH (Delledonne *et al.*, 2001). En effet, des travaux récents ont souligné l'implication de NO comme second messager lors de l'établissement de la réaction d'hypersensibilité (Delledonne *et al.*, 1998 ; 2001). D'autres études ont aussi montré le rôle de

NO dans la mise en place des réactions de défense des plantes (Durner *et al.*, 1998 ; Klessig *et al.*, 2000 ; Wendehenne *et al.*, 2001).

Pour résumer les événements impliqués dans la transduction du signal éliciteur, nous pouvons prendre l'exemple du modèle tabac/cryptogéine (Figure 06). Sur cellules de tabac en suspension, la cryptogéine se fixe à des sites de haute affinité (Wendehenne *et al.*, 1995 ; Bourque *et al.*, 1999) avant d'induire notamment des flux d'ions (Blein *et al.*, 1991 ; Tavernier *et al.*, 1995 ; Wendehenne *et al.*, 2002 ; Lecourieux *et al.*, 2002), une dépolarisation membranaire (Pugin *et al.*, 1997), la phosphorylation de protéines (Viard *et al.*, 1994 ; Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000), la production d'H₂O₂ (Bottin *et al.*, 1994 ; Simon-Plas *et al.*, 1997), de NO (Foissner *et al.*, 2000), l'activation de MAPK (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998) et la dépolymérisation des microtubules (Binet *et al.*, 2001). Cette cascade de signalisation mène à l'activation de réactions de défenses typiques comme la production de phytoalexines (Milat *et al.*, 1991), l'expression de gène de protéines PR (Wendehenne *et al.*, 2002), et la mort cellulaire (Binet *et al.*, 2001).

3-3 Les mécanismes induits de défense des plantes

Après perception d'un éliciteur, la transduction du signal au niveau intra-cellulaire aboutit à des modifications de la transcription de nombreux gènes. Le séquençage systématique des génomes et la technique de « microarray » permettent de comparer l'expression simultanée de milliers de gènes d'un organisme placé dans deux conditions différentes. Dans le domaine des interactions plantes/pathogènes, cette technique a récemment été utilisée pour comparer l'expression de gènes dans une plante saine ou attaquée par un pathogène. Ainsi, 72 h après l'infection d'*Arabidopsis thaliana* par *Alternaria brassicola*, les transcrits de 168 gènes (sur 2375 testés) sont spécifiquement induits (Schenk *et al.*, 2000). Chez le maïs, 6 h après l'infection par le champignon *Cochliobolus carbonum*, l'expression de 117 gènes (sur 1500 testés) est modifiée (Baldwin *et al.*, 1999). Les produits de ces gènes, dont l'expression est induite lors de l'interaction avec des pathogènes, participent essentiellement au métabolisme, au contrôle de l'état redox, à des voies de signalisation ou directement aux réactions de défense de la cellule végétale. Ceux qui participent aux mécanismes de défense peuvent être impliqués dans la mise

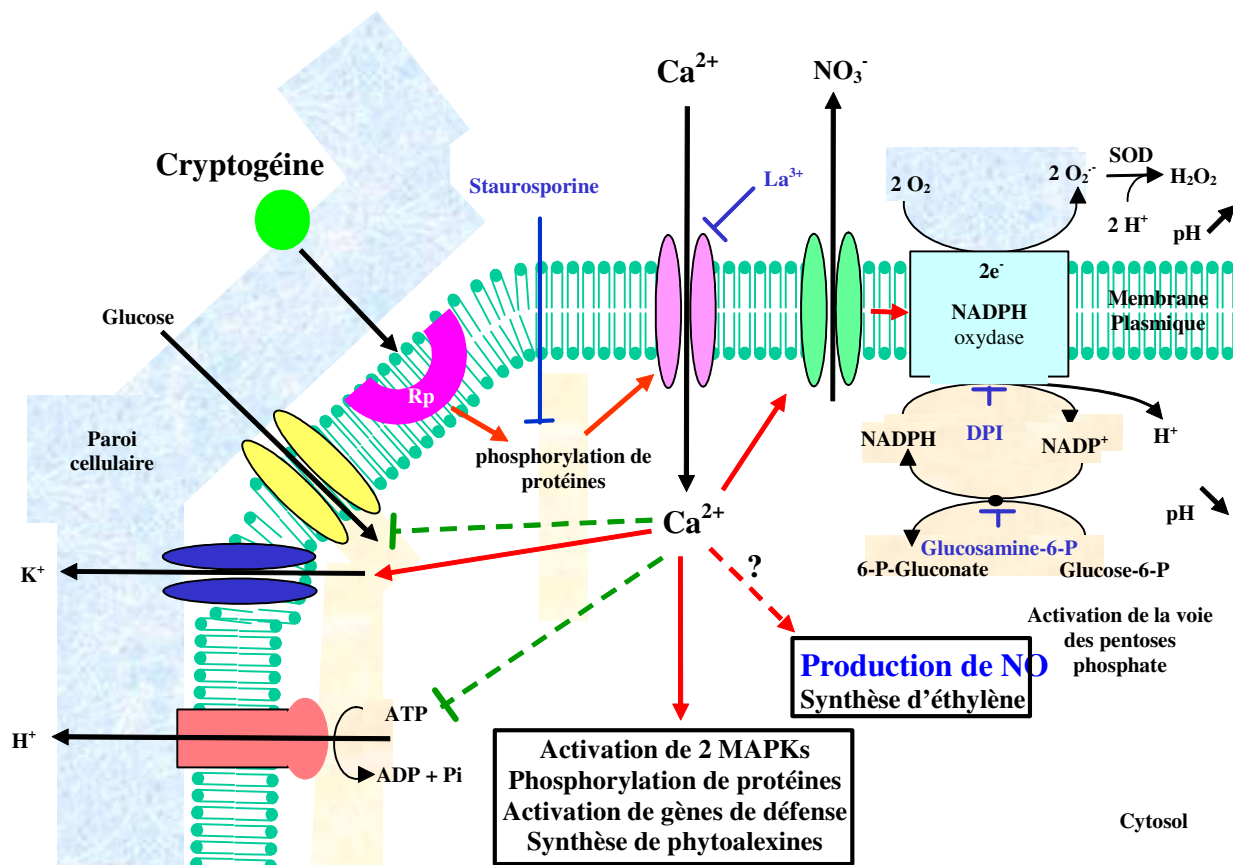


Figure 06 : Réactions de défense et voies de signalisation activées après perception de l'éléciteur dans le modèle tabac/cryptogéine.

en place de la RH, coder des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de composés antimicrobiens (phytoalexines), des protéines PR ou des protéines qui participent aux renforcements des parois cellulaires. L'ensemble de ces processus participe à limiter le développement du pathogène.

3-3-1 Réaction hypersensible : RH

La RH se manifeste par l'apparition de lésions nécrotiques localisées au site de pénétration du pathogène. Cette réaction hypersensible a pour conséquence d'empêcher la propagation du micro-organisme grâce à la mort des cellules végétales qui l'entourent. Les mécanismes moléculaires qui gouvernent la mise en place de cette mort cellulaire sont encore méconnus mais il semble que les FAO et les canaux ioniques y jouent un rôle important. Les FAO pourraient intervenir dans ce processus de mort cellulaire soit en provoquant directement des dommages membranaires (Levine *et al.*, 1994) soit en induisant l'expression de gènes dont les produits vont conduire à la mort cellulaire hypersensible (Dangl *et al.*, 1996). L'identification des mutants *dnd1* (defense no death) d'*Arabidopsis*, qui sont résistants aux pathogènes mais ne développent plus de lésions nécrotiques, a permis de relier la mort cellulaire aux canaux ioniques. Le gène *DND1* (également appelé *AtCNGC2*), qui code pour un canal à calcium potentiel régulé par les nucléotides cycliques, est requis pour la mise en place de la RH dans ce modèle (Clough *et al.*, 2000). De plus, dans le modèle tabac/cryptogéine, l'inhibition de canaux anioniques démontre leur implication dans le processus de mort cellulaire hypersensible (Wendehenne *et al.*, 2002). Il semble donc qu'une altération de l'homéostasie ionique soit cruciale pour les événements de signalisation qui conduisent à la RH.

D'autres gènes impliqués dans la RH ont été identifiés : *Lsd*, *Acd* et *HSR203*. Ces trois gènes sont des régulateurs négatifs de la mort cellulaire. En effet, les mutants d'*Arabidopsis* *lsd* (lesion simulating disease) et *acd* (accelerated cell death) forment des lésions nécrotiques spontanées en absence d'infection (Dietrich *et al.*, 1994 ; Dietrich *et al.*, 1997 ; Rate *et al.*, 1999). De la même façon, des tabacs transgéniques exprimant une construction antisens de *HSR203* développent des lésions nécrotiques de façon accélérée (Tronchet *et al.*, 2001).

Par ailleurs, une étude réalisée chez le tabac traité par la cryptogéine montre que des peroxydes d'acides gras générés par une activité lipoxigénase seraient également responsables de la mort cellulaire hypersensible (Rustérucci *et al.*, 1999).

3-3-2 Production de phytoalexines

Les phytoalexines sont des métabolites secondaires antimicrobiens, synthétisés par les plantes dans les tissus qui jouxtent la zone infectée par le pathogène, ou en réponse à un éliciteur. Elles appartiennent à des groupes chimiques variés comprenant notamment les isoflavonoïdes (pisatine, phaséoline), les sesquiterpènes (capsidiol), les coumarines (scopolétine) et les stilbènes (resvératrol, viniférines) (Hammerschmidt, 1999). Le rôle des phytoalexines dans la résistance des plantes est mal défini. En effet, une résistance accrue aux pathogènes a été observée dans différentes plantes transgéniques surexprimant la stilbène synthase de vigne, enzyme produisant le resvératrol (Hain *et al.*, 1993 ; Stark-Lorenzen *et al.*, 1997 ; Coutos-Thévenot *et al.*, 2001), alors que des mutants *pad* (phytoalexin déficient) d'*Arabidopsis*, déficients en camalexine, sont toujours autant résistants à *Pseudomonas syringae*, *Cochliobolus carbonum* et *Peronospora parasitica* (Glazebrook and Ausubel, 1994). L'explication pourrait venir du fait que de nombreux pathogènes sont capables de détoxifier ces molécules. Ainsi, la pathogénie de *Nectria hematococca* est directement liée à la présence du gène de la pisatine déméthylase qui détoxifie la phytoalexine du pois (Van Etten *et al.*, 1989).

3-3-3 Production de protéines de défense liées à la pathogénèse

Le terme de protéines PR a été utilisé pour la première fois en 1970 pour décrire les protéines extra-cellulaires synthétisées chez le tabac en réponse à une infection par le virus de la mosaïque du tabac (Gianinazzi *et al.*, 1970 ; Van Loon et Van Kammen, 1970). Il désigne maintenant un groupe de protéines fortement accumulées lors de la pathogénèse ou des situations reliées. Des protéines PR ont été détectées dans de nombreuses espèces végétales dans des situations de stress biotiques ou abiotiques (Stintzi *et al.*, 1993). La classification actuelle comprend 14 familles de protéines PR (Tableau I ; Van Loon et Van Strien, 1999). Les fonctions de toutes les protéines PR ne sont pas connues mais la plupart ont des activités antifongiques

Famille	Membre type	Propriétés	Symboles des gènes
PR-1	PR-1a de tabac	inconnue	<i>pr1</i>
PR-2	PR-2 de tabac	β -1,3-glucanase	<i>pr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]]
PR-3	P, Q de tabac	Chitinase de type I, II, IV, V, VI, VII	<i>pr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	'R' de tabac	Chitinase de type I, II	<i>pr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	S de tabac	Thaumatococine-like ou osmotine	<i>pr5</i>
PR-6	Inhibiteur I de tomate	Inhibiteur de protéase	<i>pr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	P ₆₉ de tomate	Endoprotéase	<i>pr7</i>
PR-8	Chitinase de concombre	Chitinase de type III	<i>pr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	peroxydase de tabac 'formant la lignine'	Peroxydase	<i>pr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	'PR1' de persil	'Ribonuclease-like'	<i>pr10</i>
PR-11	Chitinase de classe V de tabac	Chitinase de type I	<i>pr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Rs-AFP3 de radis	Défensine	<i>pr12</i>
PR-13	THI2.1 d' <i>Arabidopsis</i>	Thionine	<i>pr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	LTP4 de l'orge	Protéine de transfert de lipides	<i>pr14</i> , <i>Ltp</i>

Tableau I : Les familles de protéines PR (d'après Van Loon et Van Strien, 1999).

et/ou antibactériennes. Certaines, comme les β -1,3-glucanases (PR-2) et les chitinases (PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11), sont directement capables de dégrader les parois de certains champignons (Fritig *et al.*, 1998). D'autres, telles que les PR-1 et PR-5, pourraient avoir une action antimicrobienne *via* leur interaction avec la membrane plasmique du pathogène (Niderman *et al.*, 1995 ; Abad *et al.*, 1996). Depuis peu, des peptides anti-microbiens sont également considérés comme des protéines PR (Van Loon et Van Strien, 1999). Il s'agit des thionines, des défensines et des protéines de transfert de lipides (LTP), peptides fortement induits en réponse à l'infection par des pathogènes (Broeckeaert *et al.*, 1997).

Les protéines inhibitrices de polygalacturonases (PGIP), peuvent être produites en réponse à un pathogène ou à un éliciteur (Bergmann *et al.*, 1994 ; Machinandiarena *et al.*, 2001). Elles ont pour rôle de prévenir la dégradation de la paroi végétale en inhibant les polygalacturonases fongiques, enzymes qui sont souvent considérées comme des facteurs de virulence (Ten Have *et al.*, 1998 ; De Lorenzo *et al.*, 2001). Les PGIP possèdent des motifs LRR très variables qui leur confèrent une spécificité d'interaction physique avec les polygalacturonases fongiques. Ainsi, certaines sont capables d'inhiber les polygalacturonases de plusieurs pathogènes alors que d'autres sont spécifiques d'une seule polygalacturonase (De Lorenzo et Ferrari, 2002). Ainsi, le changement d'un seul acide aminé dans un motif LRR d'une PGIP peut lui conférer de nouvelles possibilités d'interactions avec des polygalacturonases précédemment non reconnues (Leckie *et al.*, 1999).

D'autres protéines sont induites lors d'une interaction plantes/pathogènes : les lipoxgénases (LOX) (Croft *et al.*, 1990 ; Fournier *et al.*, 1993 ; Melan *et al.*, 1993). Les LOX catalysent l'incorporation de l'oxygène moléculaire dans certains acides gras insaturés pour former les hydroperoxydes correspondants, eux-même précurseurs du jasmonate (Weber, 2002). Pour démontrer le rôle de LOX dans la mise en place des réactions de défense, Rancé *et al.* (1998) ont utilisé une stratégie antisens. Les tabacs transgéniques, dépourvus d'activité LOX deviennent sensibles à *Phytophthora parasitica* pv *nicotianae* alors que pour les tabacs non transformés l'interaction est incompatible (Rancé *et al.*, 1998). Les LOX pourraient contribuer à la RH par la production de radicaux libres et d'hydroperoxydes (Rustérucchi *et al.*, 1999 ; Blée, 2002).

3-3-4 Renforcement des parois cellulaires

La paroi cellulaire végétale constitue une barrière naturelle de la plante que l'agent pathogène doit franchir pour pénétrer dans la plante hôte. Le renforcement des parois cellulaires intervient rapidement suite à une infection grâce au dépôt de molécules nouvellement synthétisées comme la callose, des composés phénoliques et des protéines riches en hydroxyproline et en glycine (Benhamou, 1996 ; Hammond-Kosack et Jones, 1996). Ce renforcement des parois contribuerait à l'élaboration d'une barrière mécanique qui empêche la propagation du pathogène (Dixon *et al.*, 1996).

3-4 Résistances systémiques

Suite à une première attaque par un pathogène, la plante déclenche parfois une résistance systémique. Ainsi, des tissus n'ayant jamais été infectés deviennent résistants à des micro-organismes auxquels ils étaient préalablement sensibles. Il existe essentiellement deux résistances systémiques : la résistance systémique acquise (RSA) et la résistance induite systémique (RIS). Pour l'essentiel, trois types de molécules endogènes (Figure 07) sont actuellement décrites pour être impliquées dans la mise en place des résistances systémiques : l'acide salicylique (AS), l'éthylène (E) et les jasmonates (JA).

3-4-1 La résistance systémique acquise : RSA

Une tentative d'infection par un micro-organisme avirulent ou l'application d'un éliciteur peut conduire à la protection de la plante vis à vis de nouvelles infections par des pathogènes virulents (Ward *et al.*, 1991). Cette protection, qui se propage dans la plante par le système vasculaire (Ross, 1966), est appelée RSA. Elle apparaît relativement tardivement (quelques jours) et son activité protectrice peut durer pendant plusieurs semaines. Lors d'une RSA, de nombreux gènes de défense sont induits et une accumulation importante d'AS est détectée. L'accumulation massive des messagers *PR-1* et des gènes *SAR* dans les parties non inoculées de la plante fait de ces gènes d'excellents marqueurs de la RSA (Alexender *et al.*, 1992 ; Sticher *et al.*, 1997 ; Cameron *et al.*, 1999).

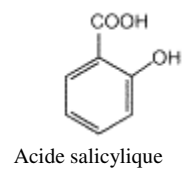
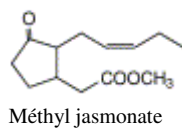
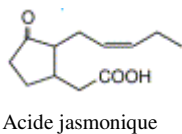
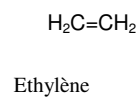
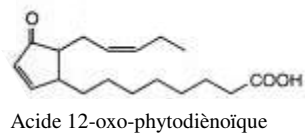


Figure 07 : Formules chimiques des molécules impliquées dans la mise en place des résistances systémiques.

Les récentes approches génétiques sur *Arabidopsis thaliana* ont permis d'identifier des mutants affectés dans la RSA. Ainsi le mutant *mpk4*, qui possède une mutation dans le gène de la MAPK4, présente de façon constitutive une accumulation d'AS, l'expression de gènes liés à la RSA et une résistance à de nombreux pathogènes (Petersen *et al.*, 2000). Le mutant *edr1* (enhanced disease resistance), déficient d'une MAP3K, présente aussi une résistance (dépendante de l'AS) accrue à des pathogènes comme *Pseudomonas syringae* et *Erysiphe cichoracearum* (Frye *et al.*, 2001). A l'opposé, d'autres mutants sont incapables d'induire la RSA. C'est notamment le cas du mutant *eds1* (enhanced disease susceptibility) qui est sensible à des pathogènes normalement avirulents. Le gène *EDS1* code pour une protéine qui a des similitudes avec une lipase (Falk *et al.*, 1999). Le mutant *npr1* (non-expresser of PR genes), également appelé *nim1* (non inducible immunity), est déficient dans la mise en place de la RSA et dans l'expression des gènes PR induits par l'AS (Dong, 2001). La protéine NPR1, localisée au niveau du noyau, est capable d'interagir physiquement avec les facteurs de transcription de la famille TGA (Kinkema *et al.*, 2000 ; Després *et al.*, 2000). De plus, l'élément *as-1* du promoteur du gène *PR-1*, qui fixe les facteurs de transcription TGA, est requis pour induire l'expression AS-dépendante de *PR-1*. Ceci suggère que les TGA soient des activateurs de la transcription du gène *PR-1* (Lebel *et al.*, 1998).

3-4-2 La résistance induite systémique : RIS

La rhizobactérie non-pathogène *Pseudomonas fluorescens* colonise les racines des plantes en provoquant une résistance induite systémique (RIS) indépendante de l'accumulation d'AS et de l'expression de certains gènes PR (Pieterse *et al.*, 1996 ; Van Wees *et al.*, 1999). La mise en place de cette RIS protège la plante contre une large gamme de pathogènes des racines et des feuilles (Pieterse et Van Loon, 1999). Contrairement à la RSA, la RIS est indépendante de l'AS mais nécessite la présence de JA et d'E. En effet, les mutants *jar1* (jasmonate response) et *etr1* (ethylene triple response), respectivement déficients dans la réponse à JA et E, sont incapables de développer une RIS alors qu'ils peuvent développer une RSA (Pieterse *et al.*, 1998 ; Pieterse et Van Loon, 1999). De plus, la capacité de l'éthylène à induire la RIS dans le mutant *jar1* suggère l'activation séquentielle de la voie de signalisation JA-dépendante puis de celle qui

dépend de l'éthylène (Pieterse *et al.*, 1998). De plus, bien que la RIS ne dépende pas de l'AS, elle nécessite la présence de NPR1 pour activer en aval des mécanismes de défenses différents de ceux impliqués dans la RSA (Figure 08A ; Pieterse *et al.*, 1998).

3-4-3 Signaux impliqués dans les résistances systémiques

L'AS (Figure 07) joue un rôle important dans l'activation des réactions de défense des plantes et pour la mise en place de la RSA. En effet, la RSA est souvent tributaire d'une augmentation du taux d'AS (Gaffney *et al.*, 1993 ; Cameron *et al.*, 1999 ; Martinez *et al.*, 2000). L'application d'AS à des plants de tabac ou d'*Arabidopsis* entraîne l'activation de gènes caractéristiques de la RSA, la production de certaines protéines PR, ainsi qu'une résistance accrue aux pathogènes (Ward *et al.*, 1991 ; Uknes *et al.*, 1993). De plus, des plants de tabac transgéniques exprimant la salicylate hydroxylase de *Pseudomonas putida* (gène *NahG*), incapables d'accumuler de l'AS, ne déclenchent plus de RSA et deviennent sensibles à de nombreux pathogènes. Dans ces tabacs, l'aptitude à exprimer une RSA est rétablie par apport d'AS (Gaffney *et al.*, 1993 ; Delaney *et al.*, 1994). Il a cependant été démontré que l'AS n'était pas le signal mobile de la RSA. Un scion de tabac *NahG* greffé sur un pied de tabac sauvage infecté, n'exprime pas de RSA au niveau des feuilles du scion. A l'inverse, lorsqu'un scion sauvage est greffé sur un pied *NahG* infecté, les feuilles du scion mettent en place une RSA démontrant ainsi que ce n'est pas l'AS produit au site d'infection qui permet d'activer la résistance systémique acquise (Vernooij *et al.*, 1994).

L'éthylène (ou E ; Figure 07) est une phytohormone volatile impliquée dans de nombreux processus physiologiques dont la défense des plantes (Ecker, 1995). Suite à une infection ou à un traitement éliciteur, la synthèse d'éthylène peut être fortement augmentée (Milat *et al.*, 1991) (Hanania et Avni, 1997) et conduire à la synthèse de diverses molécules de défense comme des protéines PR (Bol *et al.*, 1990). Des approches génétiques ont permis de montrer que l'éthylène ne semble pas jouer un rôle majeur dans la résistance aux micro-organismes biotrophes alors qu'il paraît impliqué dans la résistance aux pathogènes nécrotrophes (Thomma *et al.*, 2001). Ainsi, les mutants de la voie de l'éthylène d'*Arabidopsis* sont plus sensibles que les plantes sauvages au nécrotrophe *Botrytis cinerea* (Thomma *et al.*, 1999 ; Diaz *et al.*, 2002). A l'inverse,

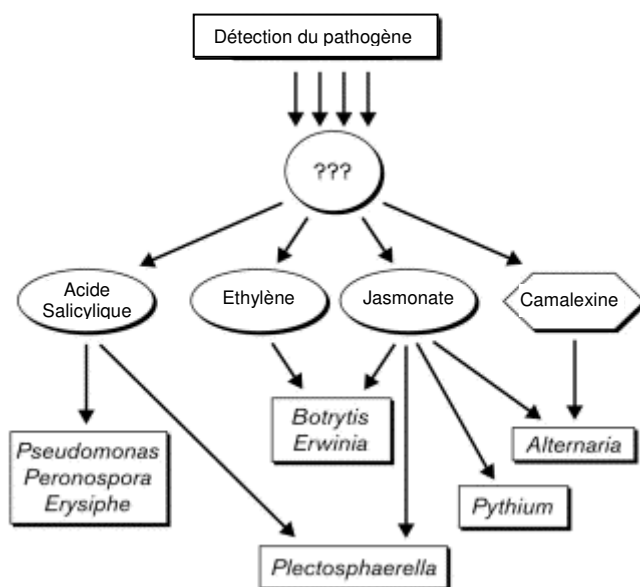
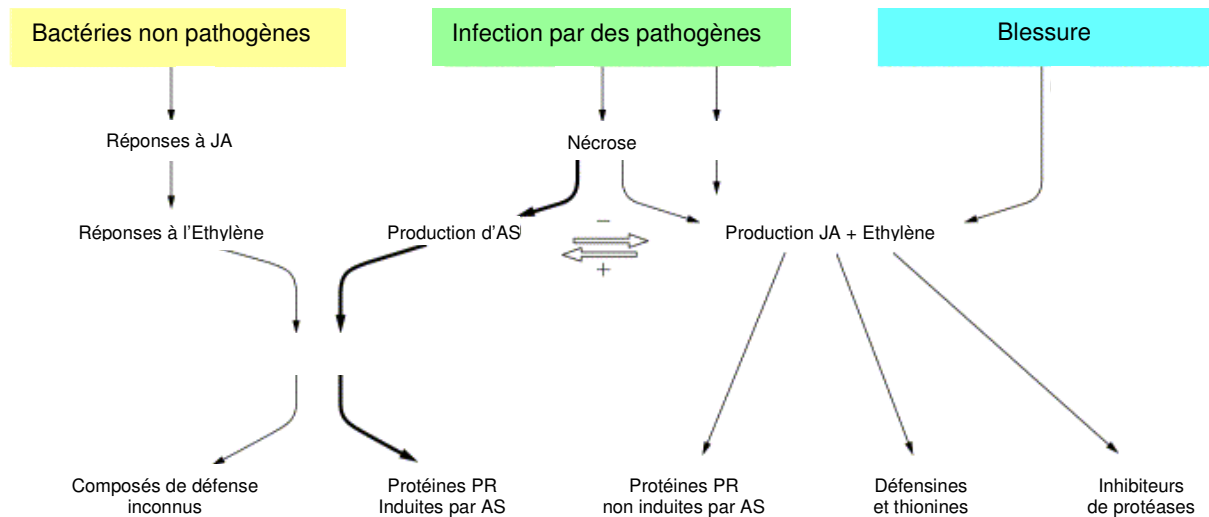


Figure 08 : Interconnexions entre les différentes voies de signalisation qui conduisent à une résistance de la plante pour différents pathogènes.

A : Modèle d'interconnexions entre les différentes voies de signalisation qui peuvent être induites chez les plantes par des rhizobactéries bénéfiques, l'infection par un pathogène ou la blessure provoquée par un ravageur (d'après Pieterse et Van Loon, 1999). AS : acide salicylique. JA : acide jasmonique. RIS : résistance systémique induite. RSA : résistance systémique acquise.

B : Schéma de la résistance d'*Arabidopsis thaliana* à différents pathogènes via différentes molécules (d'après Thomma et al., 2001).

il a récemment été montré que l'expression constitutive du gène *ERF1* (ethylene response factor), un facteur de transcription induit par l'éthylène qui mime une production permanente de cette hormone, provoque une résistance accrue contre deux pathogènes nécrotrophes (*Botrytis cinerea* et *Plectosphaerella cucumerina*) mais pas contre la bactérie biotrophe *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). Par ailleurs, il semble qu'il y ait une coopération entre E et AS pour l'expression de *PR-1* et la résistance à *Plectosphaerella cucumerina* (Lawton *et al.*, 1994 ; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). L'éthylène coopère aussi avec JA pour induire, indépendamment de l'AS, l'expression des gènes de défense tels que *PDF1.2* (codant une défensine, PR-12), *Thi2.1* (codant une thionine, PR-13) et *Chit1b* (codant la chitinase 1 basique, PR-3) (Penninckx *et al.*, 1998 ; Thomma *et al.*, 1998 ; Ellis et Turner, 2001 ; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002).

La famille des jasmonates (JA) regroupe un grand nombre de molécules dont les plus étudiées sont l'acide jasmonique, le méthyl jasmonate et un des précurseurs de l'acide jasmonique : l'acide 12-oxo-phytodienoïque (Figure 07). La biosynthèse de l'acide jasmonique est réalisée au sein de la voie octadécanoïque en commençant par l'acide linoléique (Weber, 2002). La voie de signalisation impliquant JA paraît différente de la voie de l'AS puisque le mutant d'*Arabidopsis coi1* (coronatine insensitive) affecté dans la réponse à JA a une sensibilité accrue aux nécrotrophes *Alternaria Brassicola* et *Botrytis cinerea* mais pas vis à vis du biotrophe *Peronospora parasitica* alors que, au contraire, le mutant *npr1* (incapable d'accumuler de l'AS) perd sa résistance à *Peronospora parasitica* mais n'est pas plus sensible à *Alternaria brassicola* ou *Botrytis cinerea* (Thomma *et al.*, 1998). De plus, JA et AS paraissent avoir des effets antagonistes pour l'expression de certains gènes PR (Niki *et al.*, 1998). Néanmoins, des travaux relatent l'existence d'un effet synergique de JA et E pour l'induction des gènes *PDF1.2* et *Chit1b* alors qu'il existe un effet antagoniste entre JA et E pour l'expression des gènes *VSP* (vegetative storage protein) (Ellis et Turner, 2001). Il existe donc à la fois des effets synergiques et des effets antagonistes entre SA, JA et E en fonction des gènes régulés par ces trois voies de signalisation. Des études plus approfondies par « microarray » ont révélé que plusieurs gènes ont été co-régulés par deux ou trois de ces molécules chez *Arabidopsis thaliana* (Kazan *et al.*, 2001). Sur 2375 gènes étudiés, l'expression de 711 gènes est modifiée par SA, JA ou E (Schenk *et al.*,

2000). La moitié des gènes induits par l'E le sont également par JA. De plus, 55 gènes sont à la fois induits par AS ou JA alors que 28 sont co-réprimés par ces deux molécules. Ces résultats indiquent que ces trois voies de signalisation (dépendantes d'AS ou JA) ont certaines cibles identiques et partagent donc vraisemblablement des portions de voies communes.

En résumé, il ressort qu'il existe dans la plante des voies de signalisation différentes qui sont partiellement interconnectées pour réaliser une régulation fine de la résistance en fonction du type d'agresseur. Cependant, bien que certains modèles commencent à apparaître (Figure 08B), ces interconnexions ne sont pas entièrement comprises. De plus, dans le pathosystème *Arabidopsis thaliana/Phytophthora porri*, il semble que la résistance de la plante soit indépendante des voies de signalisation décrites, impliquant l'AS, JA ou l'E (Roetschi *et al.*, 2001). De nombreux travaux complémentaires sont donc nécessaires pour élucider toutes les voies de signalisation et leurs relations qui mènent à la résistance d'une plante.

4 La vigne et ses pathogènes

La vigne, dont la culture est d'un grand intérêt économique pour de nombreux pays, est une plante sensible à de nombreuses maladies, pour la plupart causées par des pathogènes fongiques (pourriture grise, mildiou, oïdium...). Pour combattre ces pathogènes, la viticulture utilise essentiellement la lutte chimique (en Europe, la viticulture consomme 50% des produits phytosanitaires, soit 120000 tonnes par an, alors qu'elle ne représente que 1% des surfaces cultivées). Les réglementations internationales tendent à limiter l'utilisation des produits phytosanitaires en viticulture afin de maintenir voire améliorer la qualité du raisin tout en adoptant des pratiques qui respectent l'environnement et assurent la santé du consommateur. De plus, cet emploi massif des produits chimiques porte préjudice à l'image « naturelle et traditionnelle » des vins d'AOC. Ainsi, les organismes en charge de la viticulture, dont le comité d'intérêt scientifique et technique de Bourgogne, fixe comme priorité d'accélérer la production raisonnée en viticulture notamment par une meilleure utilisation des moyens alternatifs de lutte contre les pathogènes afin de diminuer les quantités utilisées de fongicides.

4-1 Les principaux pathogènes fongiques de la vigne

La vigne est confrontée à l'attaque de nombreux agresseurs : phytoplasmes, virus, bactéries, champignons et autres ravageurs. Parmi eux, trois champignons sont responsables de maladies qui provoquent actuellement une forte diminution de la quantité et de la qualité des récoltes : il s'agit du mildiou, de l'oïdium et de la pourriture grise.

Le mildiou de la vigne, identifié en France en 1879, est une maladie causée par l'oomycète *Plasmopara viticola*, qui appartient à la famille des Péronosporacées. Son cycle biologique (Figure 09) fait apparaître une conservation hivernale sous forme d'oospores généralement conservés dans les feuilles mortes présentes sur le sol. Au retour de conditions favorables, l'oospore germe pour donner naissance à une macroconidie qui contient les zoospores flagellées. Les précipitations printanières vont permettre aux zoospores de se disséminer et de germer sur les feuilles avant d'atteindre les stomates, site de pénétration dans la plante. Le mycélium se développe au sein des parenchymes en émettant des suçoirs qui pénètrent dans les cellules végétales pour fournir des nutriments au pathogène. Après cette phase de développement, il y a reproduction asexuée avec formation de conidiophores qui sortent de la plante principalement au niveau des stomates de la face inférieure des feuilles. Ces organes fructifères portent des conidies qui vont se différencier en nouvelles zoospores capables de réaliser des contaminations secondaires. A l'automne, la phase de reproduction sexuée conduit à la formation des oospores pour la conservation hivernale. *Plasmopara viticola* est un parasite obligatoire qui se développe essentiellement sur les feuilles et les inflorescences de vigne en engendrant un affaiblissement de la plante, une perte de rendement et de qualité des récoltes.

L'oïdium, apparu en Europe en 1847, est une maladie provoquée par le champignon ascomycète *Uncinula necator* (forme parfaite ou sexuée) qui fait partie de la famille des Erysiphacées. *Uncinula necator* est également un parasite obligatoire de la vigne. L'hiver le champignon peut se conserver sous sa forme mycélienne asexuée (alors nommée *Oïdium tuckeri*) présente dans les bourgeons dormants ou sous sa forme sexuée grâce aux cléistothèces présents à la surface des feuilles (Figure 10). Au printemps, les infections primaires sont déclenchées par la libération des ascospores présentes à l'intérieur des cléistothèces ou par les conidies produites par les conidiophores à partir des mycéliums. Disséminées par le vent, ces

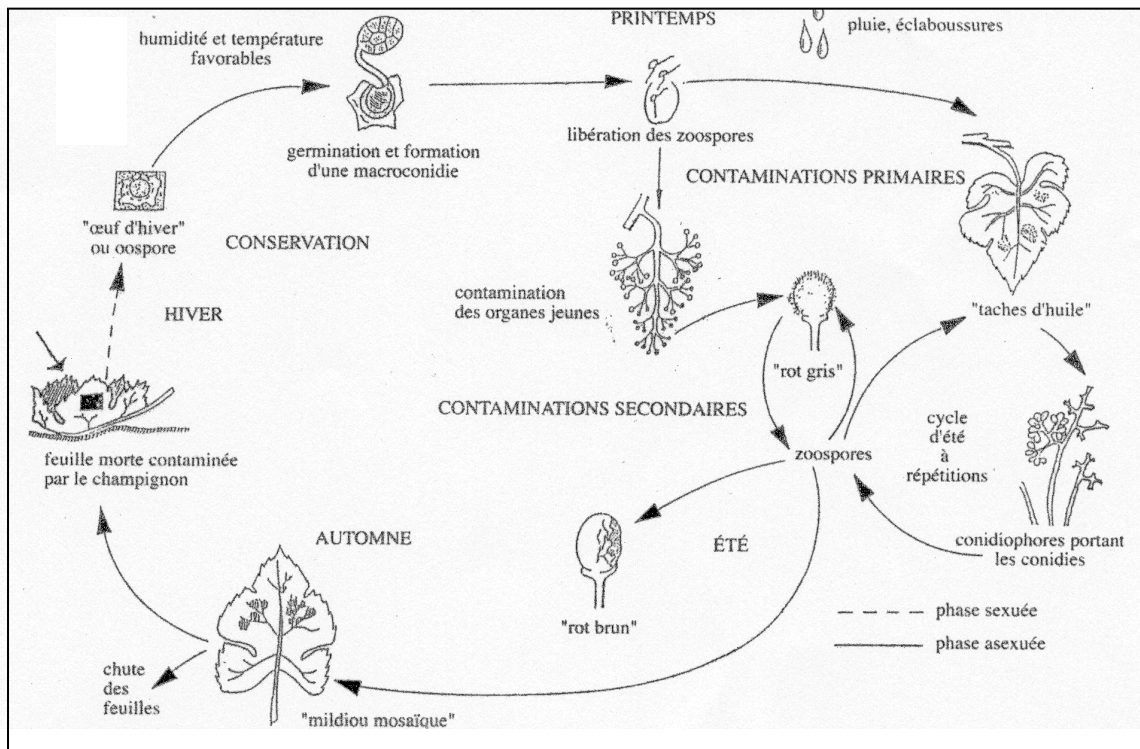


Figure 09 : Cycle biologique de *Plasmopara viticola*, agent du mildiou de la vigne (d'après Dubos, 1999).

ascospores et conidies arrivent au contact des organes herbacés de la vigne sur lesquels elles germent. Le mycélium émet alors des appressoriums qui perforent la cuticule et permettent l'accès aux cellules épidermiques dont le champignon va se nourrir grâce à la formation de suçoirs. Ensuite, les conidiophores, apparaissant notamment à la face supérieure des feuilles, libèrent de nouvelles conidies qui vont contribuer au développement de plusieurs cycles asexués. A l'automne, la phase de reproduction sexuée aboutit à la formation des cléistothèces, une des formes de conservation du champignon pendant l'hiver. *Uncinula necator* attaque principalement les feuilles et les inflorescences de la vigne. Il provoque également un affaiblissement de la plante et des diminutions importantes de la quantité et de la qualité des raisins.

La pourriture grise, maladie connue depuis l'antiquité, est causée par le champignon ascomycète *Botrytis cinerea* (forme asexuée) qui appartient à la famille des Sclerotiniacées. Il se conserve principalement sous forme de sclérotés (amas condensés de mycélium de couleur brune) que l'on rencontre l'hiver sur les sarments de vigne (Figure 11). Au retour des conditions favorables, les sclérotés donnent généralement naissance à des conidiophores qui portent des conidies ovoïdes. Le champignon peut aussi rentrer dans sa phase de reproduction sexuée (il porte alors le nom de *Botryotinia fuckeliana*) en formant des apothécies à la surface des sclérotés. Les conidies (ou les ascospores) peuvent ensuite contaminer de jeunes feuilles ou des inflorescences mais c'est surtout à la fin de l'été que *Botrytis cinerea* envahit les grappes de raisin mûr. A l'automne, le champignon forme de nouvelles sclérotés. Beaucoup d'incertitudes demeurent sur ce cycle biologique puisque l'observation de la forme sexuée reste exceptionnelle au vignoble et il semble qu'il n'existe pas de cycle épidémiologique (infections primaires puis secondaires). Cependant, des analyses moléculaires réalisées sur 356 souches prélevées en Champagne montrent qu'il existe de fréquentes recombinaisons génétiques qui laissent supposer que la reproduction sexuée existe. Dans ce cas, des apothécies devraient être observables au vignoble même si leur existence doit être discrète (Giraud *et al.*, 1998).

Les dégâts de la pourriture grise, essentiellement occasionnés sur baies mûres, s'accompagnent de pertes de rendements mais surtout de graves altérations des qualités organoleptiques du raisin (oxydation des phénols, acidification, diminution du taux de glucose,

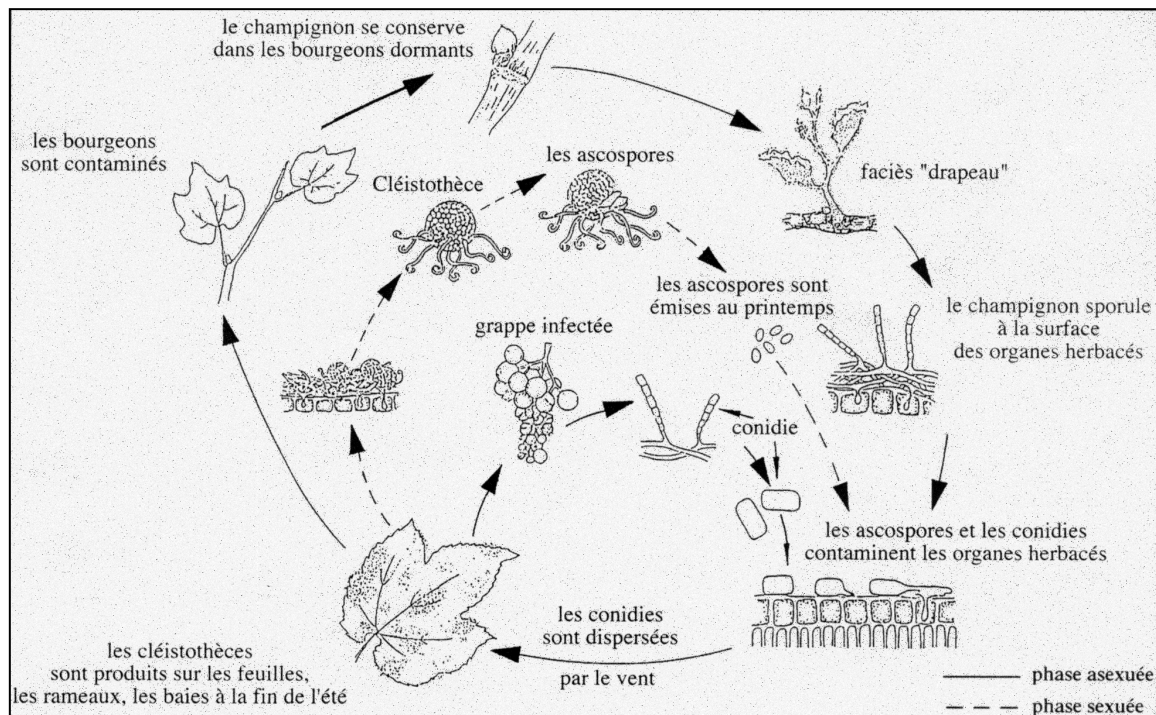


Figure 10 : Cycle biologique de *Uncinula necator*, agent de l'oïdium de la vigne (d'après Dubos, 1999).

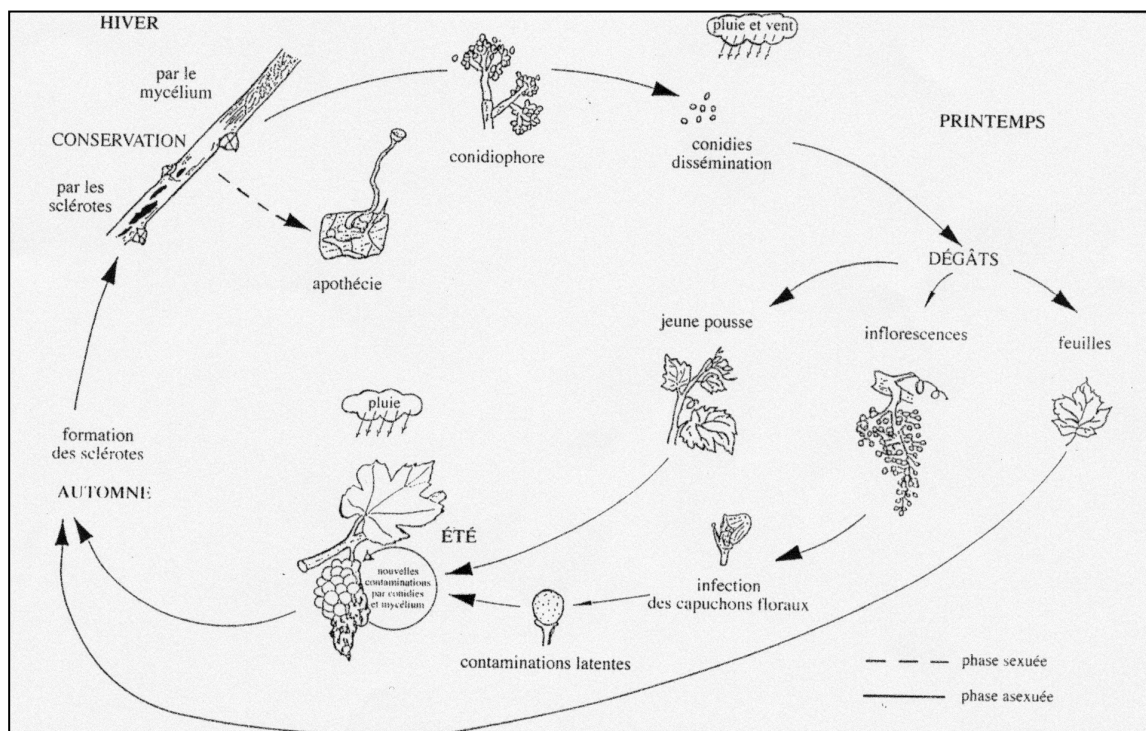


Figure 11 : Cycle biologique de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la vigne (d'après Dubos, 1999).

modification des arômes...). Cependant, *Botrytis cinerea* est également l'agent responsable de la pourriture noble, à la base des vins liquoreux de Sauternes.

Botrytis cinerea est considéré comme un champignon polyphage capable de se développer sur plus de 200 hôtes différents. Sur la vigne, une étude a montré qu'il existe au moins deux types différents de *Botrytis cinerea* : *transposa* (dont le génome contient les deux éléments transposables Boty et Flipper) et *vacuma* (qui n'en contient aucun). Les souches *vacuma* sont majoritairement présentes sur feuilles de vigne en Juin alors que les souches *transposa* sont majoritaires sur baies mûres. Il pourrait ainsi exister une forte spécificité d'hôte(s) voire d'organe(s) dans la nature (Giraud *et al.*, 1998). De plus, ces résultats suggèrent qu'il n'y ait pas plusieurs cycles d'un seul clone de *Botrytis cinerea* mais plutôt de multiples infections par des souches génétiquement différentes. *Botrytis cinerea* est un champignon considéré comme nécrotrophe bien qu'il se situe à la frontière du parasitisme et du saprophytisme. En effet, il possède tous les systèmes enzymatiques pour pénétrer dans la plante (cutinases, protéases, polygalacturonases, pectinases, lipases ; Staples and Mayer, 1995 ; Reignault *et al.*, 2000 ; Ten Have *et al.*, 2001) et détoxifier ses produits de réactions de défense afin de s'y multiplier (Breuil *et al.*, 1998 ; Gil-ad and Mayer, 1999). Mais en fait, il semble qu'il utilise plutôt certaines réactions de défense de la plante (H_2O_2 et RH) pour se développer (Govrin et Levine, 2000). Par ailleurs, il semble que l'éthylène joue un rôle important dans la résistance des plantes à ce champignon (§ 3-4-3). Chez la tomate un pré-traitement des plantes par l'éthylène conduit à une plus forte résistance à ce champignon alors qu'un pré-traitement avec le 1-méthylcyclopropène (un inhibiteur irréversible du récepteur à l'éthylène) provoque une sensibilité accrue à *Botrytis cinerea* (Diaz *et al.*, 2002). Dans cette étude, l'utilisation du mutant de tomate *Epinastic* (ayant une production constitutive d'éthylène) et d'une lignée transgénique exprimant l'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) déaminase (qui dégrade le précurseur de l'éthylène) ont permis de montrer que plus les plantes produisent d'éthylène, plus elles sont résistantes à *Botrytis cinerea*.

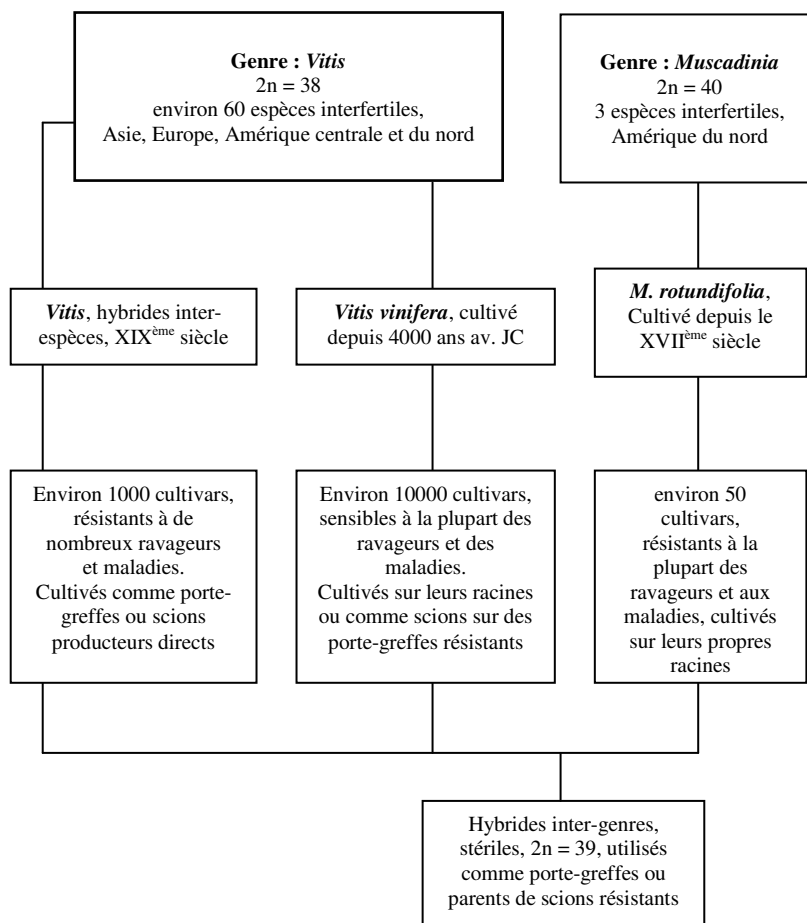


Figure 12 : historique et état actuel de l'amélioration de la vigne par croisements génétiques (d'après Alleweldt et Possingham, 1988)

Caractère de résistance	Espèces
<i>Stress abiotiques</i>	
froid	<i>V. amurensis</i> , <i>V. riparia</i>
chlorose	<i>V. vinifera</i> , <i>V. berlandieri</i>
salinité	<i>V. berlandieri</i>
<i>Maladies</i>	
mildiou	<i>V. riparia</i> , <i>V. rupestris</i> , <i>V. lincecumii</i> , <i>V. cinerea</i> , <i>V. berlandieri</i> , <i>V. labrusca</i>
oïdium	<i>V. aestivalis</i> , <i>V. cinerea</i> , <i>V. berlandieri</i> , <i>V. labrusca</i>
pourriture grise	Toutes les espèces américaines
Galle du colet	<i>V. amurensis</i> , <i>V. labrusca</i>
Nématodes	<i>V. champinii</i> , <i>V. longii</i> , <i>V. rufotomentosa</i>
Phylloxera	<i>V. riparia</i> , <i>V. rupestris</i> , <i>V. berlandieri</i> , <i>V. cinerea</i> , <i>V. champinii</i>

Tableau II : principales sources de résistances chez la vigne (d'après Alleweldt et Possingham, 1988)

4-2 Réactions de défense connues chez la vigne

La vigne est une plante pérenne, ligneuse et grimpante qui appartient à la famille des Vitacées. Cette famille comprend deux genres : les *Vitis* ($2n=38$) et les *Muscadinia* ($2n=40$). Le genre *Vitis* regroupe une soixantaine d'espèces d'origine européenne, américaine et asiatique alors que le genre *Muscadinia* ne comporte que trois espèces américaines (Figure 12). La plupart des cépages (cultivars) actuellement cultivés en France appartiennent à l'espèce *Vitis vinifera*, d'origine euro-asiatique. Depuis 1868, les dégâts causés par le phylloxera (insecte se nourrissant de racines ou de feuilles de vigne) ont conduit en France à greffer des scions de *Vitis vinifera* (feuilles résistantes et racines sensibles), espèce conférant la typicité et la qualité des vins, sur des porte-greffes issus de croisements génétiques avec des espèces américaines (feuilles sensibles et racines résistantes).

La résistance de la vigne aux différents stress biotiques et abiotiques varie en fonction de l'espèce, du pathogène (pour les stress biotiques), de l'organe et du stade de développement. Les espèces d'origine américaine (*Vitis riparia*, *Vitis berlandieri*, *Vitis labrusca*...) sont généralement résistantes aux maladies (Tableau II) alors que tous les cépages de *Vitis vinifera* (Pinots, Chardonnay, Gamay...) sont globalement sensibles, à des degrés plus ou moins importants. C'est pourquoi les porte-greffes résistants (notamment au phylloxera) sont en général des hybrides issus d'un croisement interspécifique entre un *Vitis vinifera* et une espèce américaine. Parmi les *Vitis vinifera*, un même cépage peut être très sensible à un pathogène et peu sensible à un autre alors que, pour un même pathogène, un cépage peut être très sensible et un autre relativement tolérant (Dubos, 1999). De plus, pour un même plant de vigne, certains organes sont très touchés par la maladie alors que d'autres le sont moins. Ainsi, les feuilles sont facilement envahies par *Uncinula necator* et *Plasmopara viticola* alors que les baies sont peu touchées. A l'inverse, les baies mûres sont très sensibles à la pourriture grise tandis que les feuilles le sont moins.

La résistance de la vigne aux maladies, comme celle de la majorité des plantes, peut provenir de l'existence de défenses constitutives et/ou de réactions de défense activées après détection d'un pathogène.

Plusieurs phénomènes pourraient contribuer à la résistance constitutive de la vigne. Tout d'abord des phénomènes physiques comme l'épaisseur de la cuticule, de l'épiderme ou la compacité des grappes de raisin. Ainsi, il existe une bonne corrélation entre l'épaisseur de la cuticule et la résistance à l'oïdium (Heintz et Blaich, 1989). De même, la structure anatomique de la grappe (épaisseur de la pellicule de la baie, aération ou compacité de la grappe) joue un rôle important dans la sensibilité à la pourriture grise (Karadimcheva, 1982). Des composés chimiques et des enzymes participeraient également à la résistance constitutive de la vigne. Ainsi, la présence constitutive de certaines isoformes de peroxydases, de tannins et de dérivés galliques contribuerait à la résistance au mildiou (Calderon *et al.*, 1992 ; Dai *et al.*, 1995a).

Concernant les réactions de défense de la vigne activées en réponse à un pathogène ou un éliciteur, l'essentiel des connaissances concerne les composés phénoliques et les protéines PR. A notre connaissance, l'étude des événements précoces impliqués dans l'activation des réactions de défense de la vigne n'a jamais donné lieu à des publications scientifiques.

Les composés phénoliques synthétisés par la vigne en réponse à un stress biotique sont principalement des flavonoïdes, des tannins et des phytoalexines stilbéniques. L'inoculation du mildiou sur un cépage résistant provoque une accumulation rapide de flavonoïdes et de tannins condensés alors que celle-ci est beaucoup plus tardive sur un cépage sensible (Dai *et al.*, 1995b ; Dai *et al.*, 1995c). Les phytoalexines de la vigne appartiennent à la famille des stilbènes. La première d'entre-elles identifiée fut le trans-resvératrol (Langcake et Pryce, 1976). Les autres phytoalexines découvertes depuis sont, soit des oligomères (α -viniférine, β -viniférine, ϵ -viniférine et γ -viniférine), soit des dérivés diméthyl (ptérostilbène) ou glucose (picéide) du trans-resvératrol (Langcake et Pryce, 1977a ; Langcake et Pryce, 1977b ; Pryce et Langcake, 1977 ; Langcake et McCarthy, 1979 ; Pezet et Pont, 1988 ; Waterhouse et Lamuela-Raventos, 1994). Le trans-resvératrol est produit par la stilbène synthase (VST) à partir de trois malonyl-CoA et un 4-coumaroyl-CoA, provenant lui même de l'acide cinnamique synthétisé par la phénylalanine ammonia lyase (PAL) (Figure 13). Les viniférines seraient obtenues par polymérisation oxydative du resvératrol (Calderon *et al.*, 1994). D'ailleurs, *in vitro*, l'addition du couple peroxydase/H₂O₂ à du trans-resvératrol conduit à un dimère de structure chimique très voisine de l' ϵ -viniférine (Langcake et Pryce, 1977c). L'activité anti-microbienne de la plupart de

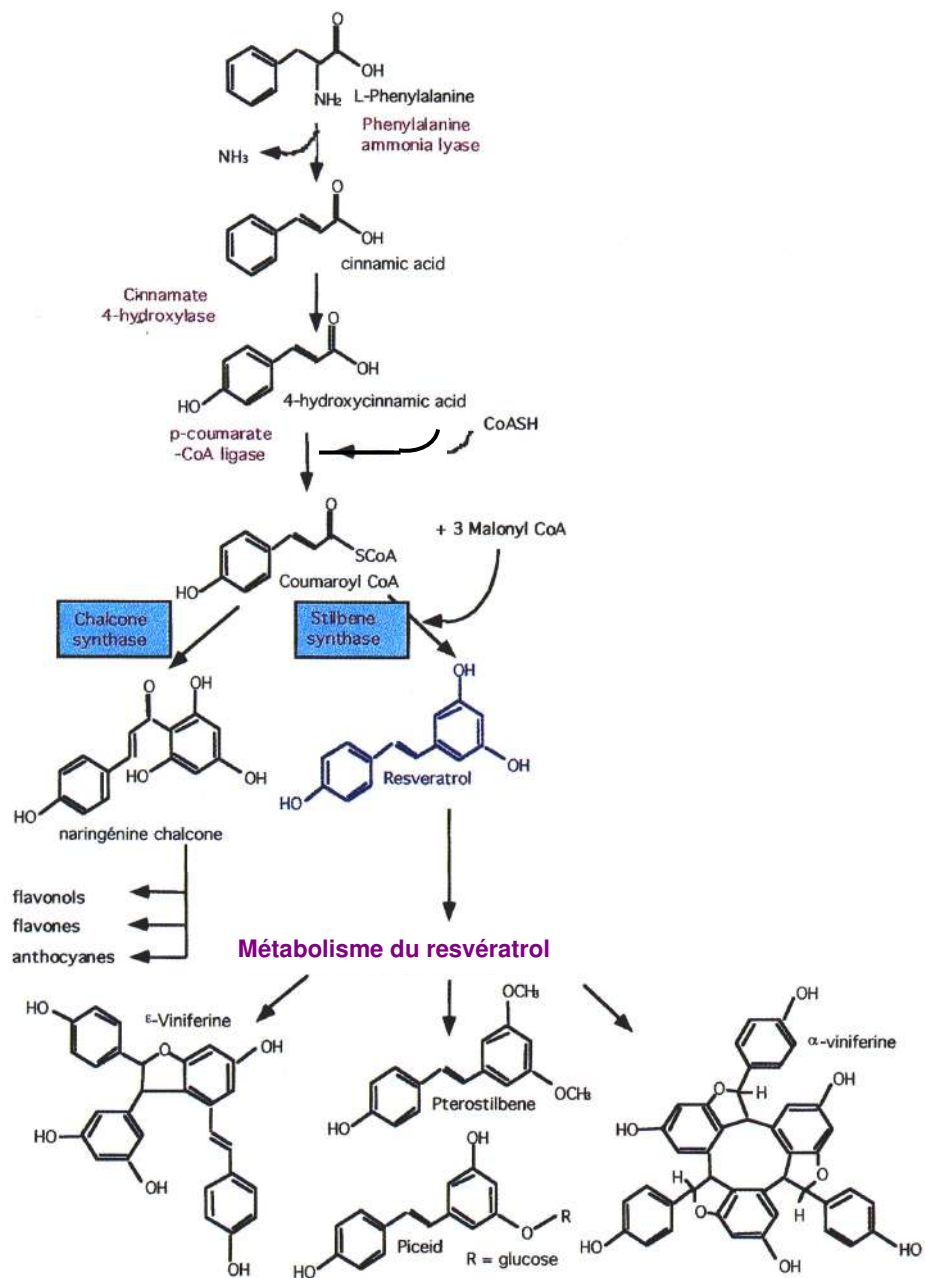


Figure 13 : Biosynthèse du trans-resvératrol et de ses dérivés (d'après Coutos-Thévenot *et al.*, 2001)

ces phytoalexines a été démontrée (Pryce et Langcake, 1977 ; Hoos et Blaich, 1990 ; Pont et Pezet, 1990 ; Adrian *et al.*, 1997 ; Coutos-Thévenot *et al.*, 2001) et l'expression de la VST dans diverses plantes transgéniques conduit fréquemment à une résistance accrue aux pathogènes (Hain *et al.*, 1993 ; Stark-Lorenzen *et al.*, 1997 ; Thomzik *et al.*, 1997 ; Hipskind et Paiva, 2000 ; Coutos-Thévenot *et al.*, 2001). De plus, il semble qu'au cours de la maturation des baies de raisin, l'augmentation de la sensibilité à *Botrytis cinerea* soit liée à leur incapacité à produire des phytoalexines, rapidement et en quantités suffisantes (Jeandet *et al.*, 1991 ; Bais *et al.*, 2000).

Depuis 1996, plusieurs travaux relatent l'expression de protéines PR chez la vigne. Des gènes de vigne codant des chitinases de classe I, III et IV, des β -1,3-glucanases (PR-2), des osmotines (PR-5), une « ribonuclease-like » (PR-10) et une protéine de transfert de lipides (Ltp ; PR-14), ont été identifiés. Des détectations sérologiques ont également permis de mettre en évidence des peroxydases (PR-9) et PR-1 chez la vigne (Repka *et al.*, 2000 ; Repka *et al.*, 2001).

La plupart des données concernant les chitinases de vigne ont été obtenues par mesure de leur activité dans les feuilles. Derckel *et al.* (1996 ; 1999) ont ainsi montré que 6 isoformes de chitinases (4 basiques et 2 acides) sont constitutives, 4 autres (acides) sont induites par la blessure et un traitement par l'AS alors que 3 autres (acides) sont induites par *Botrytis cinerea*. Il existerait donc au moins 13 isoformes de chitinases chez la vigne : 9 acides et 4 basiques. Ces études biochimiques n'avaient cependant pas permis de déterminer quelles classes de chitinases étaient constitutives ou induites. Busam *et al.* (1997) ont alors isolé deux ADNc codant respectivement une chitinase basique de classe I (Chit1b) et une chitinase acide de classe III (Chit3 ; PR-8). L'analyse de l'accumulation des transcrits de ces deux chitinases a révélé une forte induction de *Chit3* dans des feuilles de vigne infectées par *Plasmopara viticola* ou *Uncinula necator* alors que les ARNm de *Chit1b* n'étaient détectables que dans des feuilles sévèrement infectées par *Uncinula necator* (Busam *et al.*, 1997 ; Jacobs *et al.*, 1999). Le gène d'une seconde chitinase de classe I a ensuite été identifié (Chit1a) (Jacobs *et al.*, 1999). L'accumulation des transcrits *Chit1a* augmente fortement dans des feuilles infectées par la bactérie *Pseudomonas syringae* pv *pisi* (dont l'interaction avec la vigne est incompatible ; Robert *et al.*, 2001) ou par *Botrytis cinerea*. Dans ces deux interactions, le gène *Chit3* n'est induit que par *Pseudomonas syringae* pv *pisi* alors que le gène *Chit1b* n'est induit que lors

d'une infection par *Botrytis cinerea* (Robert *et al.*, 2002). L'activité chitinase dans les baies mûres est environ dix fois supérieure à celles des feuilles (Derckel *et al.*, 1996). Cette augmentation pourrait provenir de la forte accumulation d'une isoforme de chitinase de classe IV (Chit4 ; PR-3) pendant la maturation du raisin (Robinson *et al.*, 1997 ; Derckel *et al.*, 1998). Cette chitinase de classe IV inhibe la germination et la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* (Derckel *et al.*, 1998 ; Salzman *et al.*, 1998).

Des β -1,3-glucanases de vigne ont d'abord été identifiées par immuno-détection dans des feuilles traitées par l'AS ou infectées par *Botrytis cinerea* (Renault *et al.*, 1996). Aucune activité glucanase n'est détectable dans les baies de raisin saines, qu'elles soient mûres ou non (Robinson *et al.*, 1997 ; Derckel *et al.*, 1998). Trois gènes de β -1,3-glucanases ont ensuite été identifiés (respectivement *Glua*, *Glub* et *Gluc*) dont deux (*Glua* et *Glub*) coderaient des β -1,3-glucanases basiques extra-cellulaires. Les analyses par northern blot ont révélé que les transcrits *Glub* s'accumulent fortement dans des feuilles infectées par *Uncinula necator* alors que l'accumulation des messagers *Glua* n'est induite que dans les baies infectées par ce pathogène (les transcrits *Gluc* ne s'accumulent dans aucun des deux cas ; Jacobs *et al.*, 1999).

Concernant les osmotines (ou thaumatin-like), la première fut détectée par son activité antifongique (Salzman *et al.*, 1994). Il fut ensuite montré que l'accumulation de cette osmotine était corrélée à la maturation du raisin (Salzman *et al.*, 1998). Parmi les deux gènes d'osmotine identifiés (*Tl1* et *Tl2*), seul *Tl2* est induit aussi bien dans les feuilles que dans les baies infectées par *Uncinula necator* (Jacobs *et al.*, 1999).

Des protéines PR-10 et PR-14 ont également été mises en évidence chez la vigne et un gène de PR-10 (*PR10-1*) a été récemment identifié. Ses transcrits s'accumulent fortement lors de l'interaction incompatible *Vitis vinifera*/*Pseudomonas syringae* pv *pisi* (Robert *et al.*, 2001). La Ltp (PR-14) s'accumule lors de la maturation du raisin et semble avoir une activité antimicrobienne (Salzman *et al.*, 1998).

4-3 Amélioration de la résistance de la vigne par des moyens de lutte alternatifs à l'utilisation des produits chimiques

Au-delà de l'utilisation des produits phytosanitaires, les méthodes alternatives de lutte contre les pathogènes sont essentiellement l'amélioration de la résistance par voie génétique (production d'hybrides ou transgénèse), la lutte biologique et la stimulation des défenses naturelles par l'utilisation d'éliciteurs.

L'épidémie de phylloxéra et l'introduction de maladies cryptogamiques d'origine américaine ont conduit à l'obtention et à la plantation d'hybrides producteurs directs (HPD), résistants aux maladies. Mais, cette amélioration génétique de la vigne a entraîné des modifications de la typicité variétale qui s'est accompagnée d'une perte de qualité des raisins. En France, une loi sur les Appellations d'Origine (1955), réglementant les cépages autorisés en AOC, a donc rendu obligatoire l'arrachage des HPD pour préserver la typicité des crus. En 1999, le contexte socio-économique a conduit l'Institut National des Appellations d'Origine (INAO) à rejeter la possibilité d'utiliser la transgénèse pour des vignes destinées à la production de vins d'AOC, bien que des résultats intéressants d'amélioration de la résistance aux pathogènes aient été obtenus par cette technique (Yamamoto *et al.*, 2000 ; Coutos-Thévenot *et al.*, 2001). Par conséquent, l'amélioration de la résistance de la vigne par voie génétique est tout simplement interdite en France pour une utilisation dans les vignobles d'AOC. De plus, le fait que les résistances de la vigne aux maladies semblent essentiellement polygéniques complique fortement l'identification de gènes de résistance en recherche fondamentale.

La lutte biologique se concentre principalement sur la lutte contre les insectes ravageurs et l'utilisation de micro-organismes bénéfiques à la protection de la plante. En viticulture, les prédateurs d'acariens et la confusion sexuelle pour lutter contre les vers de la grappe sont couramment utilisés. En laboratoire, l'inoculation des racines de vigne par une souche de *Pseudomonas* sp. permet de stimuler la croissance des vitro-plants et d'améliorer leur résistance à *Botrytis cinerea* (Barka *et al.*, 2000). De même, l'inoculation des vitro-plants avec une souche de *Bacillus* induit une inhibition du développement de *Botrytis cinerea* et la production de phytoalexines (Paul *et al.*, 1998).

La stimulation des défenses naturelles de la vigne par des éliciteurs est peu étudiée. Quelques travaux relatent cependant que l'application de molécules impliquées dans la signalisation liée à la résistance (AS, JA, E ou leurs dérivés) induit l'expression de différentes protéines PR (Derckel *et al.*, 1996 ; Busam *et al.*, 1997 ; Derckel *et al.*, 1998 ; Cohen *et al.*, 1999 ; Repka *et al.*, 2001). Mais, aucun de ces auteurs n'a étudié la résistance induite par ces molécules. Seule l'équipe du Dr. Y. Cohen a réussi à montrer que l'application de l'acide β -amino butyrique (BABA) sur la vigne induit une résistance systémique à *Plasmopara viticola* en laboratoire et au vignoble (Cohen *et al.*, 1999 ; Reuveni *et al.*, 2001). Le BABA, qui induit une résistance contre de nombreux pathogènes chez différentes plantes (Jakab *et al.*, 2001), ne semble pas agir comme un éliciteur puisqu'il est incapable d'activer les réactions de défense des plantes lorsqu'il est utilisé seul. En revanche il potentialise les réactions de défense de la plante, c'est à dire que lorsqu'un pathogène infecte une plante pré-traitée par le BABA, l'expression des défenses est plus forte et plus rapide que dans une plante témoin (Zimmerli *et al.*, 2000).

Dans ce contexte général, l'objectif de ce travail de thèse était à la fois de rechercher et d'identifier des éliciteurs actifs sur la vigne, de caractériser les événements de signalisation et les réactions de défense activés par ces éliciteurs et enfin de vérifier que l'application d'éliciteurs sur la vigne pouvait conduire à une résistance accrue aux pathogènes. Le but de ce travail est donc de contribuer à l'application de stratégies alternatives dans la lutte contre les pathogènes de la vigne dans un contexte de viticulture raisonnée.

II. MATERIELS ET METHODES

1 Matériel biologique

1-1 Matériel végétal

1-1-1 Cultures cellulaires de vigne

Les suspensions cellulaires de vigne ont été initiées au laboratoire à partir de cals provenant de boutons floraux obtenus par l'équipe du Pr. R. Bessis de l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (IUVV, Dijon). Ces cellules isolées de vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay et Pinot Noir), sont cultivées dans le milieu de Nitsch-Nitsch dépourvu d'hormones (Nitsch et Nitsch, 1969). Elles sont maintenues sous agitation permanente (130 rpm) en salle climatisée (25°C), sous une lumière continue (2000 ergs/cm²). A mi-saturation, les suspensions cellulaires sont diluées au demi par addition de milieu de culture neuf, et utilisées 24 h plus tard pour la mesure des activités biologiques. Avant l'expérience, les cellules sont lavées trois fois par filtration sous vide partiel et re-suspendues, à raison de 0,1 g de poids frais de cellules (PFC) /mL dans le tampon M2 (MES 2 mM, mannitol 175 mM, K₂SO₄ 0,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM, pH 5,4) puis équilibrées 2 h à 24°C sous agitation permanente (150 rpm).

Les cellules de vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay) transformées sont cultivées dans les mêmes conditions, en présence d'antibiotiques dans le milieu de culture (paromomycine 100 µg/mL).

1-1-2 Vitro-plants

Les vitro-plants de vigne (*Vitis rupestris*), obtenus par bouturage et entretenus par multiplication végétative, sont cultivés en chambre climatisée (25°C, photopériode jour/nuit : 16h/8h) sur milieu Murashige et Skoog modifié par Mur (Murashige et Skoog, 1962). Ces vitro-plants sont utilisés 8 semaines après le repiquage, au stade 8 à 10 feuilles.

1-2 Matériel fongique

Différentes souches de *Botrytis cinerea* ont été utilisées : les souches K1, V940, T4, fournies par l'équipe du Dr. Y. Brygoo (laboratoire PMDV, INRA Versailles), ont respectivement été isolées sur kiwi, vigne et tomate. Toutes ces souches, issues d'un isolement mono-conidien, sont cultivées sur milieu V8 (jus de légumes commercial V8 dilué au demi, KH_2PO_4 5g/l, agar 30 g/l, pH 6,0) et repiquées tous les mois.

1-3 Eliciteurs

Les oligogalacturonates actifs (OGA) sont purifiés et fournis par le Dr. P. Potin (CNRS-Goëmar, Roscoff) et utilisés comme un mélange d'oligomères avec des degrés de polymérisation (dp) compris entre 9 et 20.

La laminarine (polymère linéaire de β -1,3-glucane avec des dp compris entre 25 et 30) est extraite de l'algue brune *Laminaria digitata* et fournie par le Dr. P. Potin (CNRS-Goëmar, Roscoff).

2 Purification d'un éliciteur produit par *Botrytis cinerea*

2-1 Obtention de filtrats de culture pré-purifiés

2-1-1 Conditions de culture

Pour la production de filtrats de culture, des fioles de Roux contenant 200 mL de milieu ont été ensemencées par 2000 conidies et placées à 25°C (photopériode 16h/8h). Différents milieux ont été testés (potato dextrose 15 g/L, extraits de malt 15 g/L, extraits de levure 15 g/L, solubilisés dans de l'eau ultra-pure ou du jus de raisin commercial, pH 6,0 ; le milieu de culture des cellules de vigne Nitsch-Nitsch, pH 6,0) avant de retenir le milieu Nitsch-Nitsch pour la production régulière de filtrats de culture.

2-1-2 Préparation des échantillons provenant des filtrats de culture

Les milieux de culture des différentes souches de *Botrytis cinerea* sont filtrés sur des tamis métalliques de maille décroissante. Les filtrats sont ensuite congelés à -20°C , décongelés et filtrés une seconde fois sur papier (filtre Durieux n°120), avant de les concentrer par dialyse (cellusep T2 avec seuil de coupure de 6000-8000 D) contre du polyéthylène glycol (masse moléculaire : 20 kD). Pour l'utilisation de filtrats pré-purifiés, les dialysats sont stérilisés par filtration (filtres 0,22 μm , Stérivex, Millipore) avant de subir un changement de tampon par chromatographie d'exclusion G25 (PD10 Pharmacia Biosciences) équilibrée avec le tampon M2 (§ 1-1-1).

2-2 Nature chimique de l'éliciteur

Afin de déterminer la nature chimique de l'éliciteur, différents tests ont été menés : ultrafiltration sur des membranes avec des seuils de coupure déterminés ; traitement par la chaleur ; digestion par des protéases ; oxydation des sucres ; réduction et alkylation des ponts disulfures.

2-2-1 Traitements physiques

La dénaturation par la chaleur est réalisée en incubant l'éliciteur à différentes températures (de 30 à 100°C) pendant des temps variant de 1 min à 16 h en fonction des expériences. La nature macro-moléculaire de l'éliciteur est testée soit par ultrafiltration sur membranes (seuils de coupure de 10 et 30 kD, Centricon, Millipore) réalisée par centrifugation aux vitesses indiquées par le fabricant, soit par chromatographie d'exclusion G 25 (PD 10, Pharmacia Biosciences).

2-2-2 Digestion enzymatique

L'éliciteur (3 μg) est soumis à une digestion enzymatique par des protéases (pronase 5 mg/mL, Hepes 50 mM pH 7,5, SDS 0,01%) à 40°C durant 1 à 16 h en fonction des expériences.

2-2-3 Traitements chimiques

L'oxydation de sucres éventuellement impliqués dans la fonction élicitrice est réalisée par traitement au métapériodate de sodium 5 mM pendant 16 h à 4°C et à l'obscurité. La réduction suivie de l'alkylation des ponts disulfures putatifs est obtenue par traitements successifs 1 h à 37°C au dithiotréitol (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, DTT 500 µM) et 1 h à 37°C à l'obscurité en présence de l'agent alkylant (IAEDENS 5 mM). L'excès de réactifs est ensuite éliminé par ultrafiltration (§ 2-2-1) et l'activité élicitrice résiduelle est mesurée par la production d'H₂O₂ induite dans des suspensions cellulaires de vigne, 20 min après traitement (§ 5-3). Les résultats sont exprimés en activité élicitrice relative (% de l'activité de l'éliciteur placé dans les mêmes conditions de tampon et de température mais n'ayant pas subi de traitement chimique).

2-3 Purification par chromatographie

Toutes les chromatographies ont été effectuées avec un appareil HPLC (AKTA basic, Pharmacia Biosciences) équipé pour mesurer en continu le pH, la force ionique et l'absorbance.

2-3-1 Chromatographie échangeuse d'anions (basse pression)

Après dialyse et stérilisation par filtration (§ 2-1-2), 15 mL de la fraction obtenue sont dilués dans 35 mL de tampon d'équilibration (tampon A : éthanolamine 20 mM, pH 10,8), puis injectés, *via* une super boucle de 50 mL (Pharmacia Biosciences), sur une colonne échangeuse d'anions (Hitrap Q sépharose 5 mL, Pharmacia Biosciences) préalablement équilibrée avec 5 volumes de colonne (VC) de tampon A. Après élution des protéines non fixées avec 2 VC de tampon A, les protéines adsorbées sont éluées par un gradient linéaire de NaCl (0-700 mM en 15 VC) formé par un mélange des tampons A et B (tampon B : NaCl 1 M, éthanolamine 20 mM, pH 10,8) à un débit de 5 mL/min. La colonne est régénérée à la suite du gradient par des lavages successifs avec 5 VC de tampon B puis ré-équilibrée avec 5 VC de tampon A. La purification de la protéine élicitrice est suivie par sa capacité à induire la production d'H₂O₂ (§ 5-3) dans des suspensions cellulaires de vigne. Des aliquotes (20 µL) de chaque fraction (2 mL) sont ainsi ajoutées à 1 mL de suspension cellulaire de vigne et la production d'H₂O₂ est mesurée 20 min après le début du traitement. Les fractions contenant l'activité élicitrice sont regroupées puis

concentrées par ultra-filtration (Macrosep avec un seuil de coupure de 10 kD, Pall) préalablement à la chromatographie d'exclusion.

2-3-2 *Chromatographie d'exclusion*

La fraction concentrée issue de la chromatographie échangeuse d'anions est injectée (250 µL d'échantillon dans une boucle de 500 µL) sur une colonne d'exclusion (Superdex 75 HR 10/30, Pharmacia Biosciences) préalablement équilibrée avec 2 VC de tampon phosphate (NaH_2PO_4 50 mM, Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0). L'élution des protéines est réalisée, à un débit de 0,5 mL/min, avec 1,3 VC. Des fractions de 500 µL sont collectées et l'activité élicitrice est détectée sur une aliquote (20 µL) de chaque fraction par la mesure de la production d' H_2O_2 induite dans des suspensions cellulaires de vigne (1 mL) 20 min après le début du traitement. Les fractions actives sont rassemblées, concentrées par ultrafiltration puis 250 µL sont dilués dans 750 µL de tampon d'équilibration (tampon A : éthanolamine 20 mM, pH 10,8) préalablement à une dernière étape de purification par chromatographie échangeuse d'anions à moyenne pression.

2-3-3 *Chromatographie échangeuse d'anions (moyenne pression)*

L'échantillon issu de la chromatographie d'exclusion (1 mL) est injecté (boucle de 2 mL) sur une colonne échangeuse d'anions (Mini Q PE 4.6/50, Pharmacia Biosciences) équilibrée dans le tampon A (5 VC). Après élimination des protéines non fixées (2 VC de tampon A), les protéines retenues sont éluées en 12 CV par un gradient de NaCl (0-700 mM en 12 VC) généré par mélange des tampons A et B (tampon B : NaCl 1 M, éthanolamine 20 mM, pH 10,8). La colonne est régénérée par des lavages successifs avec le tampon B (5 VC) et le tampon A (2VC). Des fractions de 250 µL sont collectées à un débit de 0,5 mL/min et l'activité élicitrice est détectée sur une aliquote (10 µL) de chaque fraction par la mesure de l'induction de production d' H_2O_2 par des suspensions cellulaires de vigne (§ 2-3-1 et 2-3-2). Enfin, les fractions actives sont rassemblées, concentrées et dessalées par ultrafiltration en effectuant trois rinçages successifs par de l'eau ultra pure avant d'être aliquotées puis stocker à -20°C . La purification est suivie à chaque étape par une analyse en SDS-PAGE (§ 2-4-2).

2-4 Dosage et séparation des protéines en SDS-PAGE

2-4-1 Dosage des protéines

La concentration en protéines est déterminée par la méthode spectrophotométrique de Bradford (1976). Dans une micro-cuve, 900 μL de réactif de Bradford sont ajoutés à 100 μL d'échantillon. Après 5 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 595 nm. La quantité de protéines dans l'échantillon est déterminée grâce à la gamme étalon établie avec des quantités connues de sérum albumine bovine.

2-4-2 Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Des extraits contenant de 100 ng à 20 μg de protéines sont soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) avec une réticulation de polyacrylamide de 10% à 15% en fonction de la taille des protéines étudiées (gel de 8 cm x 7 cm x 1 mm – 10 puits). Les protéines sont dénaturées par addition de tampon Laemmli (1970) et chauffage 4 min à 100°C avant d'être séparées par électrophorèse (20 mA par gel pendant 1 h 30 min). Des standards de masse moléculaire (Bio-rad) sont déposés en parallèle des échantillons afin de suivre la migration et d'évaluer la masse moléculaire apparente de polypeptides inconnus.

2-4-3 Détection des protéines par coloration

- Coloration à l'argent : les protéines sont fixées 1 h dans une solution contenant de l'éthanol 30% (v/v) et de l'acide acétique 10% (v/v). La sensibilisation est réalisée pendant la nuit dans un mélange de glutaraldéhyde 0,5% (v/v), acétate de potassium 0,5 M, éthanol 20% (v/v) et $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 0,3% (p/v). Les gels sont ensuite rincés 5 fois 15 min dans l'eau distillée, imprégnés pendant 1 h dans une solution d' AgNO_3 0,2% (p/v) et HCHO 0,07% (v/v), rincés 10 s à l'eau distillée, et développés dans un mélange K_2CO_3 3% (p/v), HCHO 0,05 % (v/v) et $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 5 H_2O 12,5 mg/L. La réaction de coloration est arrêtée par un bain de 30 min dans un mélange Tris 5% (p/v) et acide acétique 2,5% (v/v).

- Coloration au bleu de Coomassie : les gels sont colorés pendant 1 h 30 dans une solution de bleu de Coomassie (R-250) 0,25% (p/v), méthanol 40% (v/v) et acide acétique 10% (v/v), puis décolorés durant 3 h dans un mélange méthanol 40% (v/v), acide acétique 10% (v/v).

2-5 Détection des glycoprotéines

Après transfert sur membrane, les glycoprotéines sont détectées avec le kit « ECL Glycoprotein detection system » de Pharmacia Biosciences selon les instructions du fabricant.

2-5-1 Transfert des protéines sur membrane : western blot

Après SDS-PAGE (§ 2-4-2), les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C, Pharmacia Biosciences) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (BioRad) et du tampon de transfert (Tris 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0,0375%, p/v, méthanol 20%, v/v). Sur l'anode sont successivement déposés 2 feuilles de papier Whatman, la membrane, le gel et à nouveau 2 feuilles de papier Whatman, en supprimant les bulles d'air à chaque étape. La membrane et les feuilles de papier Whatman ont été préalablement imbibées 10 min par le tampon de transfert. Le transfert est réalisé par l'application d'un champ électrique de 15 V pendant 30 min.

2-5-2 Détection des glycoprotéines

Après lavage de la membrane pendant 10 min avec du tampon phosphate salin (PBS, Sambrook *et al.*, 1989), la partie glucidique des glycoprotéines est oxydée par le métapériodate 10 mM pendant 20 min à l'obscurité. L'excès de métapériodate est éliminé par 3 lavages de 10 min avec du PBS puis les glycoprotéines sont marquées à la biotine (0,25 μ M) pendant 1 h. La membrane est à nouveau rincée 3 fois 10 min avec du PBS puis saturée pendant 1 h avec la solution de blocage (agent bloquant de composition inconnue 5%, p/v, dans le PBS). Après 3 lavages de 10 min avec le tampon PBS, la détection de la biotine est réalisée par l'utilisation de streptavidine couplée à une peroxydase (streptavidine-horse radish peroxidase diluée au 1/1000^{ème} dans le tampon PBS). Au final, après 3 lavages de la membrane avec du PBS, l'addition

du mélange des 2 réactifs du Kit ECL (Pharmacia Biosciences) permet l'oxydation du luminol qui se traduit par l'émission de photons capables d'imprimer un film photo (Kodak X-omat).

3 Identification de l'éliciteur et analyse de l'ADNc correspondant

3-1 Micro-séquençage de l'éliciteur et identification

3-1-1 Préparation de l'échantillon

Le séquençage de peptides par spectrométrie de masse, après digestion enzymatique d'une protéine dans un gel d'électrophorèse, nécessite des conditions drastiques pour éviter la contamination par des protéines exogènes (kératine...). Ainsi, tous les matériels en verre utilisés pour l'électrophorèse ou les étapes ultérieures sont décontaminés par une immersion de 2 h dans une solution de NaOH 1M. Les matériels en plastique sont nettoyés avec un détergent puissant (Micro-90), rincés avec de l'eau ultra pure stérile puis à l'éthanol technique. Enfin tous les tampons d'électrophorèse, de coloration et de décoloration utilisés sont fraîchement préparés.

Après purification, la protéine (1 µg) est soumise à une SDS-PAGE, avant d'être colorée au bleu de Coomassie (§ 2-4-3). Après décoloration, le gel de polyacrylamide est placé sur une plaque de verre et la bande contenant la protéine d'intérêt est découpée avec une lame de scalpel neuve puis stockée à 4°C dans de l'éthanol 20% (v/v). Le séquençage des peptides issus de la digestion trypsique de la protéine a été réalisé par le Dr. J. Garin et ses collaborateurs (Laboratoire de Chimie des Protéines, CEA Grenoble). La masse et la séquence des peptides obtenus ont respectivement été déterminées par MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization - time of flight) et Q-TOF (quadripole - time of flight).

3-1-2 Analyse des micro-séquences peptidiques par bio-informatique

L'identification de la protéine élicitrice a été réalisée grâce à différents logiciels informatiques. Le premier type de logiciel (Protein prospector et MS-FIT) permet d'identifier une protéine par son empreinte peptidique (fingerprint) en fonction des masses des peptides

obtenus après digestion par une enzyme donnée. Le second type de logiciel (BLASTp) permet d'identifier la protéine par comparaison des séquences peptidiques obtenues à celles déjà présentes dans les bases de données.

3-2 Séquençage et analyse de l'ADNc codant la protéine élicitrice

L'équipe du Dr Y. Brygoo (Laboratoire PMDV, INRA Versailles) a entamé, en collaboration avec le Génoscope, le séquençage du génome de *Botrytis cinerea* en prenant la souche T4 comme référence et 6400 étiquettes de gènes ont déjà été obtenues. Un ADNc pleine longueur codant la protéine élicitrice a été trouvé dans leur banque d'ADNc. Le séquençage nucléotidique de cet ADNc a été réalisé par le Dr C. Levis à l'INRA de Versailles.

3-2-1 Analyse de séquences par bio-informatique

A partir des séquences nucléotidiques brutes, l'utilisation de différents logiciels a permis :

- de déterminer la séquence peptidique de l'éliciteur et d'identifier les acides aminés strictement conservés au sein de la même super-famille de protéines (BLAST, Multialign, Vector NTI).
- d'identifier des motifs peptidiques présents dans la structure tridimensionnelle de protéines de la même superfamille préalablement cristallisées (Cn3D viewer).
- de déterminer le pI et la masse moléculaire théoriques de la protéine (ExPASy, PSORT II server).
- d'identifier des motifs putatifs de glycosylation, de phosphorylation, d'activité enzymatique au sein de la séquence peptidique (Prosite, Net-O-Glyc 2.0, NetPhos 2.0).
- d'établir la carte de restriction théorique du plasmide contenant l'ADNc codant la protéine élicitrice (Vector NTI suite).

3-2-2 Vérification de la carte de restriction théorique

La carte de restriction théorique du plasmide établie par bio-informatique est vérifiée par digestion de l'ADN plasmidique par différentes endonucléases (Promega). Un μg d'ADN plasmidique issu d'une mini préparation (§ 4-2-1) est incubé 1 h à 37°C avec 1 μL de chaque

enzyme (*Eco* RV, *Bam* HI, *Pvu* II, *Hind* III, *Kpn* I) dans le tampon adéquat, avant séparation par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% (p/v) et révélation aux UV après coloration au bromure d'éthidium.

3-3 Activité enzymatique de l'éliciteur

3-3-1 *Activité polygalacturonase en milieu gélifié*

Vingt cinq à 50 μ L d'échantillon sont déposés dans des puits réalisés au centre d'un milieu gélifié contenant de l'acide polygalacturonique (Agar 8 g/L, polygalacturonate de sodium 0,5%, p/v ; EDTA 10 mM ; Mes ou Tris 50 mM ; pH 5.0 ou 8.0). Après incubation une nuit à 30°C, l'acide polygalacturonique présent dans le milieu est précipité par une solution de CTAB 1% (p/v). L'activité polygalacturonase est mise en évidence par la présence d'un halot clair autour des puits car l'acide galacturonique, monomère issu de l'hydrolyse enzymatique de l'acide polygalacturonique, n'est pas précipité par le CTAB.

3-3-2 *Activité polygalacturonase par méthode spectrophotométrique*

L'activité polygalacturonase a également été mesurée par la méthode spectrophotométrique, mise au point par Bach et Schollmeyer (1992), utilisant le 2-cyanoacétamide. L'acide polygalacturonique (2,5%, p/v) a été utilisé comme substrat et les sucres réducteurs libérés par l'endopolygalacturonase (300 ng) sont quantifiés après 10 et 20 min d'incubation à 30°C, dans un milieu tamponné par du Mes ou du Tris 100 mM en fonction des pH testés (volume réactionnel : 350 μ L). A l'issue de la réaction enzymatique, 400 μ L de tampon borate 1M (pH 9.0) et 250 μ L de 2-cyanoacétamide 1% (p/v) sont ajoutés à chaque échantillon puis chauffés 10 min à 100°C. L'absorbance à 274 nm des intermédiaires de réaction formés est mesurée après dilution de chaque échantillon (d : 1/25^{ème}) dans de l'eau ultra pure. Les sucres réducteurs sont quantifiés grâce à une gamme étalon réalisée en parallèle avec des quantités connues d'acide galacturonique. L'activité enzymatique est exprimée en RGU (reducing group unit), 1 RGU correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μ mole de sucres réducteurs par min à pH 5.0 et à 30°C.

4 Obtention de cellules de vigne transformées

4-1 Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

La souche sauvage EHA 105 d'*Agrobacterium tumefaciens* a été fournie par le Pr. P. Coutos-Thévenot (ESA CNRS 6161, Laboratoire de Physiologie et Biochimie Végétales, Poitiers).

4-1-1 Préparation de cellules compétentes d'*Agrobacterium tumefaciens*

Une colonie de la souche EHA 105 estensemencée dans un tube contenant 5 mL de milieu de Luria Bertani (LB) + rifampycine 50 µg/mL. Les tubes sont agités à 250 rpm, 28°C et à l'obscurité jusqu'à ce que l'absorbance à 660 nm de la suspension bactérienne soit égale à 1. La culture est centrifugée 6 min à 1600 g et à 4°C. Le culot est repris par 300 µL de CaCl₂ 20 mM stérile et froid, aliquoté en 3 tubes de 100 µL et la transformation est réalisée dans la continuité.

4-1-2 Transformation par choc thermique

La transformation a été réalisée avec le vecteur binaire pBIN19 35S-apoaequorine pour l'expression de l'apoaequorine dans le cytosol afin de pouvoir mesurer *in vivo* la concentration en calcium libre (Figure 14). Ce vecteur a été fourni au laboratoire par le Dr. D. Lecourieux.

Pour la transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*, 1 µg de plasmide est ajouté à 100 µL d'agrobactéries rendues compétentes. Le mélange est congelé dans l'azote liquide puis décongelé 4 min à 37°C. Un mL de milieu LB est ensuite ajouté au mélange et les tubes sont agités pendant 4 h à 150 rpm et à 28°C. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 3600 g pendant 5 min et le surnageant est éliminé. Le culot est repris par 200 µL de milieu LB et 50 µL de la suspension bactérienne sont étalés sur milieu LB gélosé contenant les antibiotiques de sélection (kanamycine 50 µg/mL et rifampycine 50 µg/mL). Après 48 h à 28°C, les colonies sontensemencées dans 5 mL de milieu LB (kanamycine 50 µg/mL, rifampycine 50 µg/mL) et les tubes sont placés sous agitation pendant 36 h à 250 rpm et 28°C. Les suspensions bactériennes sont stockées à -80°C en présence de glycérol 10% (v/v).

Bioluminescence

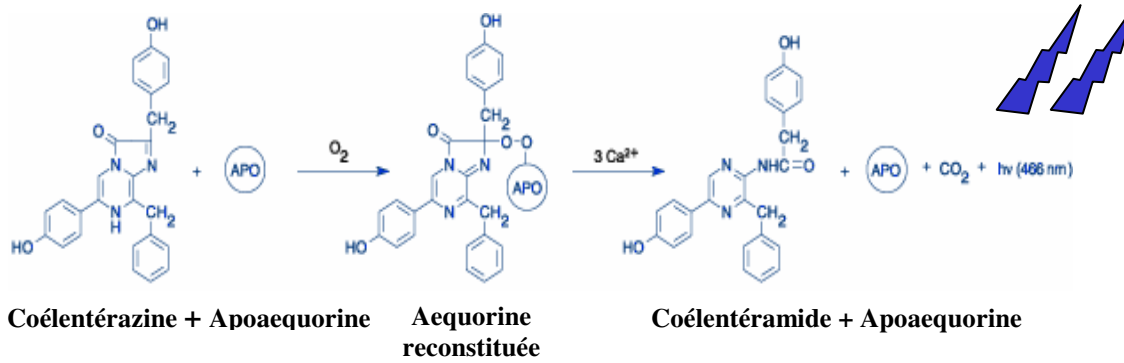


Figure 14 : Reconstitution *in vivo* dans les cellules végétales de l'aequorine fonctionnelle avec le chromophore coelentérazine.

4-2 Contrôle de la transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* par PCR

L'intégration du vecteur pBIN19 35S-apoaequorine dans les colonies d'*Agrobacterium tumefaciens* est contrôlée par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) après extraction des plasmides provenant de bactéries sélectionnées sur milieu LB gélosé en présence d'antibiotiques.

4-2-1 Mini-préparation de plasmides

Des mini-préparations de plasmides pBIN19 contenant la construction sont effectuées à partir des suspensions bactériennes (5 mL) obtenues après repiquage des colonies sur milieu LB gélosé contenant les antibiotiques de sélection (rifampycine et kanamycine). L'extraction des plasmides est réalisée en utilisant la méthode de lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989). Après 36 h de culture à 28°C et à l'obscurité, les bactéries sont centrifugées 15 min à 4000 g puis reprises par 200 µL de tampon I (Glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0) puis lysées par addition de 400 µL de tampon II (NaOH 0,2 M, SDS 1%, p/v). Après 5 min d'incubation à température ambiante, les plasmides sont précipités par addition de 500 µL de tampon III (acétate de potassium 5M, acide acétique glacial 11,5%, v/v), incubation 5 min sur de la glace et centrifugation 15 min à 10000 g. Les protéines sont éliminées par traitements successifs au phénol/chloroforme (v/v) puis au chloroforme à raison d'un volume par volume de phase aqueuse. Puis, les plasmides sont précipités par addition de 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3M et 0,8 volume d'isopropanol, incubation 30 min à 4°C et centrifugation 30 min à 12000 g. Les culots sont lavés avec un volume d'éthanol 75% glacial (v/v), séchés à l'air et finalement repris par 20 µL d'eau ultra pure. La quantification des plasmides est réalisée par dosage spectrophotométrique à 260 nm (DU 640, Beckman). La qualité des plasmides est estimée par électrophorèse sur gel d'agarose (1%, p/v) d'une aliquote de chaque échantillon et visualisation sous UV après coloration au bromure d'éthidium.

4-2-2 Conditions de PCR

La PCR est réalisée sur 100 ng d'ADN dans un volume réactionnel de 50 µL contenant 1 µM de chacune des deux amorces, 200 µM de dNTP, 1 unité de Taq polymérase (Promega) et 5

μL de tampon d'amplification 10X (Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 0,1%, v/v et SAB 2 mg/mL). L'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur programmable (Eppendorf, Mastercycler). Les opérations programmées sont les suivantes : 1 cycle de 5 min à 94°C ; 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 60 °C et 1 min à 72°C ; 1 cycle de 15 min à 72°C. Les échantillons amplifiés sont ensuite analysés sur gel d'agarose à 1% (p/v).

L'amplification est réalisée à l'aide des amorces oligonucléotidiques correspondant aux deux extrémités du gène codant l'apoeaquinone. Les amorces suivantes ont été utilisées :

amorce sens : 5' TGACCAGCGAACAATACTCAGTCA 3'

amorce antisens : 5' CGTAGAGCTTTTCGCAAGCAGGA 3'

La taille du fragment attendu est de 650 pb.

4-3 Transformation de cellules de vigne et sélection des cals transformés

4-3-1 Transformation de cellules de vigne

Quatre mL d'une suspension cellulaire de vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay) âgée de 8 jours sont incubés avec 100 μL d'une pré-culture d'*Agrobacterium tumefaciens* transformé ($A_{660} = 0,1$). Après 48 h de co-incubation à 25°C et à l'obscurité, les cellules sont lavées trois fois avec 50 mL de milieu Nitsch-Nitsch, centrifugées 5 min à 500 g et le surnageant est éliminé. Les cellules sont ensuite transférées sur milieu Nitsch-Nitsch gélosé contenant les antibiotiques de sélection.

4-3-2 Sélection des cals transformés par utilisation d'antibiotiques

La sélection des cellules de vigne transformées est réalisée par l'utilisation de concentrations croissantes de l'antibiotique dont le gène de résistance est porté par l'ADN-T normalement intégré au génome des cellules végétales. A l'issue de la transformation, les cellules de vigne sont cultivées sur un premier milieu Nitsch-Nitsch contenant deux antibiotiques : la céfotaxime (300 μg/mL) pour éliminer les agrobactéries et la paromomycine (10 μg/mL) qui permet le développement spécifique des cellules transformées. Après trois

semaines de culture à 25°C et lumière constante, les cals apparus sont transférés sur un second milieu de sélection (Nitsch-Nitsch additionné de paromomycine 50 µg/mL) où ils sont cultivés indépendamment pendant un mois à 25°C et lumière permanente. Au terme de cette deuxième étape de sélection, les cals sont fragmentés en trois et repiqués sur le même milieu additionné de paromomycine à 100 µg/mL. Après un mois de culture dans les conditions précédentes, un cal est conservé pour la multiplication, le second est mis en culture en milieu liquide (Nitsch-Nitsch additionné de paromomycine 100 µg/mL) afin d'obtenir une suspension cellulaire et le troisième est utilisé pour réaliser une vérification par PCR sur ADN génomique (ADNg).

4-3-3 *Vérification de la transformation par PCR sur ADNg*

L'ADN génomique des cals de vigne est obtenu de la façon suivante : environ 0,3 g de cal est broyé dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Le broyat est transféré dans un tube puis 0,6 mL de tampon de lyse (NaCl 0,35 M, Tris-HCl 1 mM pH 7,6, EDTA 50 mM, urée 7 M, sarkosyl 2%, p/v) sont ajoutés avant chauffage à 42°C pendant 15 s. Les tubes sont agités pendant 10 min à 37°C. Cinq mL d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (100/100/1, v/v/v) sont ajoutés et les tubes sont agités au vortex. L'ensemble est transféré en microtubes pour une centrifugation de 5 min à 12000 g. La phase aqueuse est récupérée, l'ADN est précipité par l'ajout de 50 µL d'acétate de sodium 3M pH 5,0 et 600 µL d'isopropanol. Le tout est mélangé par inversion puis centrifugé 1 min à 12000 g. Le surnageant est récupéré et 500 µL d'éthanol 70% (v/v) sont ajoutés. Le mélange est centrifugé 30 s à 12000 g. Le surnageant est écarté et le culot d'ADN est repris dans 100 µL de H₂O stérile. La vérification par PCR est réalisée sur l'ADNg obtenu (voir § 4-2-2).

4-4 **Contrôle de l'expression fonctionnelle du transgène**

Pour vérifier l'expression fonctionnelle de l'apoeaequorine dans une lignée de cellules de vigne transformées, l'aequorine est reconstituée pendant 3 h (§ 5-1-2) puis les cellules sont lysées avec un tampon contenant 10 mM de calcium (composition § 5-1-2). Une forte émission de luminescence témoigne de l'aequorine fonctionnelle.

5 Réponses de cellules de vigne à différents éliciteurs

5-1 Mesure de l'influx de calcium

5-1-1 Mesure de l'incorporation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

L'influx de calcium en réponse aux différents traitements est mesuré suivant un protocole mis au point au laboratoire (Tavernier *et al.*, 1995), adapté aux suspensions cellulaires de vigne. Après équilibration dans le tampon M2, 0,033 MBq de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /g de poids frais de cellules (Pharmacia Biosciences) sont ajoutés 5 min avant le traitement. A différents temps d'incubation, 3 prélèvements de 1,5 mL de suspension cellulaire sont déposés sur des filtres GF/A (Whatman). Le milieu d'incubation est éliminé par filtration sous vide partiel. Les cellules sont lavées pendant 1 min avec 10 mL, puis 30 s avec 10 mL et enfin 30s avec 5 mL de tampon M2 sans calcium contenant du LaCl_3 5 mM. Les cellules sont ensuite prélevées et déposées dans des pots à scintillation, lesquels sont placés à l'étuve à 70°C pendant 6 h. Après pesée du poids sec de cellules, 10 mL de liquide scintillant (Ready Safe, Beckman) sont ajoutés et la radioactivité est mesurée avec un compteur à scintillation (Tri-Carb 2000, Packard).

5-1-2 Mesure de la concentration cytosolique en calcium libre dans des cellules exprimant l'apoequorine

L'aequorine est reconstituée *in vivo* par addition de coelentérazine à des suspensions cellulaires de vigne transformées qui expriment constitutivement l'apoequorine (protéine non fonctionnelle, Figure 14). Pour une reconstitution complète de l'aequorine, les cellules sont équilibrées 3 h à l'obscurité, en milieu M2 (§ 1-1-1) contenant de la coelentérazine 3 μM (Calbiochem). Après reconstitution, 250 μL de cellules sont prélevés et transférés dans un tube contenant déjà le traitement désiré. L'addition des cellules constitue le temps zéro; le tube est immédiatement placé dans la chambre du luminomètre (Lumat LB9507, Berthold). La luminescence est enregistrée en continu avec des intervalles d'une seconde (mesures exprimées en unités relatives de luminescence (RLU) /s) puis immédiatement transférées à un ordinateur.

L'utilisation du logiciel Win Term (Berthold) permet de suivre graphiquement sur Excel 5.0 (Microsoft) les mesures. Après l'enregistrement des données, ces valeurs de luminescence sont transformées en concentrations de Ca^{2+} libre dans le cytosol ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$), grâce à l'équation ci-dessous établie par Allen et *al.* (1977). Cette équation prend en compte la luminescence émise lors de l'expérience, mais aussi la luminescence totale susceptible d'être émise par l'échantillon si toute l'aequorine reconstituée est mobilisée par le Ca^{2+} . Par conséquent, à la fin de chaque expérience, l'aequorine fonctionnelle non consommée pendant l'expérience est quantifiée par addition d'une concentration saturante en calcium à des cellules lysées (ajout de 300 μL de tampon de lyse : CaCl_2 10 mM, Nonidet P40 2%, v/v, éthanol 20%, v/v). La luminescence émise est enregistrée pendant 1 min. Aucune luminescence significative n'est détectée après 1 min ce qui signifie que la totalité de l'aequorine reconstituée a été utilisée.

L'équation établie par Allen et *al.* (1977) est alors applicable :

$$[\text{Ca}^{2+}] = \{(\text{L}_0/\text{L}_{\text{max}})^{1/3} + 55(\text{L}_0/\text{L}_{\text{max}})^{1/3} - 1\} / \{2 \times 10^6 - 2 \times 10^6(\text{L}_0/\text{L}_{\text{max}})^{1/3}\}$$

L_0 correspond à chaque valeur de RLU obtenue pendant l'expérience soit 3600 valeurs de RLU (donc 3600 L_0) enregistrées pendant 1 h d'expérience.

L_{max} représente la quantité totale de luminescence émise par 250 μL de cellules (pendant l'expérience et le déchargement) soit : $\text{L}_{\text{max}} = \Sigma \text{L}_0 + \Sigma \text{L}_r$

L_r correspond à chaque valeur de RLU obtenue pendant le déchargement (avec les cellules lysées en présence de 10 mM de calcium) de l'aequorine résiduelle soit 60 valeurs de RLU (donc 60 L_r) en 1 min.

5-2 Mesure de l'efflux de nitrate

La concentration en nitrate extra-cellulaire est déterminée dans 80 μL du filtrat de 1 mL de suspension cellulaire (filtre GF/A) à l'aide du kit Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay (Cayman Chemicals) selon les instructions du fabricant. Le principe du dosage est la réduction du nitrate en nitrite par la nitrate réductase, puis l'addition des réactifs de Griess R1 et R2 conduit à la formation d'un produit coloré dont l'absorbance à 540 nm est directement proportionnelle à la quantité de nitrate puisque le nitrite ne provient que de la transformation du nitrate. Une gamme

étalon est réalisée en parallèle pour exprimer les résultats obtenus en nmoles de nitrate par gramme de poids frais de cellules (PFC).

5-3 Mesure de la production de FAO

La production de FAO a été déterminée par une méthode de chimioluminescence, utilisant le luminol, un dérivé qui réagit avec H_2O_2 en présence de peroxydase (Thorpe et Kricka, 1986). Des aliquotes (250 μ L) de suspensions cellulaires sont mélangées à 300 μ L de tampon Hepes 50 mM, pH 8,5, mannitol 175 mM, $CaCl_2$ 5 mM, K_2SO_4 0,5 mM et 50 μ L de luminol 0,3 mM. La luminescence, mesurée sur une période de 10 s avec un luminomètre (Lumat LB 9507, Berthold) est intégrée et exprimée en nanomoles d' H_2O_2 par gramme de PFC grâce à une gamme étalon établie par addition de concentrations croissantes en H_2O_2 dans les suspensions cellulaires.

5-4 Analyse de l'activation de protéines kinases

5-4-1 Extraction des protéines à partir de suspensions cellulaires

Les extraits protéiques sont obtenus par broyage des cellules (0,2 g) dans l'azote liquide puis par transfert des broyats dans 350 μ L de tampon d'extraction (Hepes 50 mM, pH 7,5, EGTA 10 mM, EDTA 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, β -glycéro-phosphate 50 mM, NaF 10 mM, leupeptine 5 mg.L⁻¹, antipaine 5 mg.L⁻¹, DTT 5 mM et PMSF 1 mM). Après centrifugation 15 min à 10000 g, des aliquotes de surnageant sont prélevées pour quantifier les protéines selon la méthode de Bradford (voir § 2-4-1).

5-4-2 Détermination de l'activité kinase en gel

Les protéines sont dénaturées par addition de tampon de dénaturation et chauffage 4 min à 100°C (Laemmli, 1970). Quinze μ g de protéines totales par puits ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% en condition dénaturante (SDS-PAGE). La protéine basique de myéline (MBP), substrat spécifique des MAP kinases, est incluse dans le gel (0,1 mg/mL). Dénaturation, renaturation et réaction enzymatique avec le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ont été réalisées comme décrit par Lebrun-Garcia *et al.* (1998). Brièvement, après électrophorèse, le

SDS est éliminé du gel par un premier lavage pendant 1 h dans le tampon A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, 2-propanol 20%, v/v), puis un second lavage pendant 1 h dans le tampon B (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, β -mercaptoéthanol 5 mM). La dénaturation totale des protéines est achevée par une incubation de 1 h dans le tampon C (guanidine-HCl 6 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, β -mercaptoéthanol 5 mM). Les protéines sont ensuite renaturées par 5 lavages successifs à 4°C pendant 16 h avec le tampon D (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, β -mercaptoéthanol 5 mM et Tween 40 0,04%, v/v). Les gels sont ensuite équilibrés pendant 30 min à température ambiante dans le tampon de réaction enzymatique (HEPES-KOH 40 mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 25 mM et DTT 2 mM, EGTA 1 mM) puis 1 h 30 avec ce même tampon additionné d'ATP 25 μ M et de 15 μ Ci [γ - 32 P]-ATP (NEN). La réaction de phosphorylation est arrêtée par lavage extensif du gel dans une solution contenant 5% (p/v) d'acide trichloroacétique et 1% (p/v) de pyrophosphate de potassium. Les gels sont alors séchés 1 h à 80°C et les activités kinases sont révélées par exposition au contact d'un écran PhosphorImager (Molecular Dynamics) ou par autoradiographie du gel sur film Biomax (Kodak). Des marqueurs pré colorés (Bio-Rad) permettent d'estimer la masse moléculaire apparente des kinases phosphorylant le substrat (MBP).

5-4-3 Immuno-détection de MAPK par western blot

Après séparation des protéines (10 μ g) par électrophorèse SDS-PAGE (§ 2-4-2) et transfert sur membrane de nitrocellulose (§ 2-5-2), les sites de fixation des protéines non spécifiques sont bloqués durant 1 h à température ambiante sous agitation douce, dans un tampon TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, v/v) additionné de SAB 1% (p/v). La membrane est ensuite incubée pendant la nuit à 4°C et sous agitation, en présence de l'anticorps primaire (anticorps anti ERK1/2 totales, Cell Signalling n° 9101 ou anti ERK1/2 phosphorylées, Cell signalling n° 9102) dilué au 1/1000^{ème} dans le tampon TBST. Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois pendant 10 min dans du TBST afin d'éliminer l'excès d'anticorps primaire. Cette étape est suivie d'une incubation de la membrane pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire : anticorps anti-souris couplés à la peroxydase (Sigma) dilué au 1/5000^{ème}

dans le tampon TBST. Après 3 lavages pendant 10 min avec le tampon TBST, la révélation du Western-blot est réalisée à l'aide du kit de détection ECL (Pharmacia Biosciences).

5-5 Analyse de l'accumulation de transcrits

5-5-1 Extraction des ARN totaux

Deux mL de cellules (0,2 g) traitées ou non sont prélevées, filtrées puis congelées dans l'azote liquide. Les ARN totaux sont extraits par addition de 1 mL de Trizol (Gibco, BRL) aux cellules préalablement décongelées et broyées. L'addition de 200 μ L de chloroforme suivie d'une agitation pendant 1 min et d'une centrifugation de 15 min à 12000 g (4°C) permet de séparer les ARN des débris cellulaires et d'une partie des protéines. La phase aqueuse supérieure est prélevée et les ARN sont précipités en présence de 500 μ L d'isopropanol (10 min, température ambiante). Après centrifugation 10 min à 14000 g (4°C), les culots sont lavés avec de l'éthanol 70% (v/v) puis le culot d'ARN est repris dans 15 μ L d'eau traitée au DEPC. La concentration en ARN totaux est déterminée par spectrophotométrie à 260 nm (DU 640, Beckman).

5-5-2 Northern blot

Les ARN totaux (10 μ g) sont séparés sur gel d'agarose 1,2% (p/v) en présence de formaldéhyde 1,1% (v/v) puis transférés sur membrane de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences) en présence d'une solution de SSC 20X (Sambrook *et al.*, 1989). Après transfert, les ARN sont fixés aux UV pendant 4 min. Les sondes ont été marquées avec du [α -³²P]-CTP à l'aide du kit de marquage aléatoire 'Ready-to-Go' (Pharmacia Biosciences). Toutes les sondes de vigne utilisées : phénylalanine ammonia lyase (*PAL1*), stilbène synthase (*VST1*), glutathion-S-transférase (*GST*), glucanase (*GLU1*), lipoxigénase 3 (*LOX3*) et protéine inhibitrice de polygalacturonase (*PGIP*) ont été préparées à partir d'ADNc obtenus par « Differential Display » sur des feuilles de vigne infectées ou non par *Botrytis cinerea*. Ces sondes ont été fournies par le Dr. F. Baillieul (Laboratoire Biologie et Physiologie Végétales, Reims). Les membranes sont traitées par le tampon d'hybridation (NaH₂PO₄ 0,5 M, SDS 7%, p/v, SAB 10

mg/mL, EDTA 1 mM) pendant 1 h à 65°C, puis hybridées avec les sondes radio-marquées pendant une nuit à 65°C. Après hybridation, les membranes sont lavées deux fois 5 min à température ambiante dans du SSC 2X, puis une fois 30 min à 65°C dans du SSC 2X, SDS 0,1% (p/v) et enfin 5 min à température ambiante dans du SSC 0,1X pour éliminer le SDS. Les membranes sont ensuite analysées par autoradiographie ou exposées au Phosphorimager (Storm 860).

5-5-3 PCR quantitative en temps réel

Les ARN totaux obtenus après l'extraction (§ 5-5-1) sont soumis à un traitement à l'ADNase afin d'éliminer d'éventuelles contaminations par l'ADNg. Dix µg d'ARN totaux sont incubés 30 min à 37°C avec 2 µL d'ADNase en présence du tampon de l'enzyme (Promega). Après digestion, les protéines sont éliminées par une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25-24-1, v/v/v) ajouté volume à volume à chaque échantillon. A l'issue de la centrifugation (5 min, 10000 g, 4°C), la phase aqueuse subit une nouvelle extraction au chloroforme-alcool isoamylique (24-1, v/v) volume à volume. Après centrifugation (5 min, 10000 g, 4°C), les ARN présents dans la phase aqueuse (un volume) sont précipités par addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M (pH 5,2) et d'un volume d'isopropanol puis centrifugés (15 min, 7000 g, 4°C). Le culot d'ARN est lavé par de l'éthanol 70%, séché puis repris par 15 µL d'eau ultrapure traitée DEPC.

La présence éventuelle d'ADNg est vérifiée par PCR avec un couple d'amorces du gène de l'actine (fourni par le Dr. F. Baillieul, Reims). Après PCR (5 min 94°C ; 30 cycles : 30 s 94°C, 30 s 60°C, 2 min 68°C ; 68°C 7 min) et séparation des produits d'amplification par électrophorèse (gel d'agarose 1,2%, p/v), l'absence d'une bande à la taille attendue de 318 pb permet de conclure que les échantillons d'ARN totaux ne sont pas contaminés par de l'ADNg.

L'obtention d'ADNc à partir des ARNm présents dans chaque échantillon est réalisée par transcription inverse à l'aide du kit « Advantage RT-for-PCR » de Clontech. Pour la réaction, 2 µg d'ARN totaux sont mélangés à 20 pmoles d'amorces oligo(dT)₁₈ avant d'être dénaturés par chauffage à 70°C pendant 2 min puis refroidissement immédiat dans la glace. L'addition de dNTP 0,5 mM, de la reverse transcriptase (400 unités) et du tampon (Tris-HCl 50 mM pH 5,3,

KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM) permet la synthèse des ADNc pendant la réaction à 42°C pendant 1 h. La vérification de la synthèse des ADNc s'effectue par PCR avec les amorces du gène de l'actine (voir ci-dessus) où cette fois-ci, un produit d'amplification de 318 pb doit être identifiable dans tous les échantillons puisque l'actine est un gène constitutif.

Le taux d'induction de différents gènes est ensuite mesuré par PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq, Gene Amp 5700 sequence detector, Applied Biosystem) grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques fournies par le Dr F. Baillieul (Université de Reims). Dans un puits de microplaque, 5 µL de matrice diluée au 1/100^{ème} (produit de reverse transcription) sont mélangés à 12,5 µL de réactif de PCR « SYBR green PCR master mix » (Applied Biosystem), 2,4 µL d'amorces et 5,1 µL d'eau ultrapure stérile. Pour chaque échantillon, 3 dépôts sont réalisés pour le gène d'intérêt en parallèle des trois dépôts effectués pour le gène de l'actine (contrôle interne). L'amplification par RT-PCRq (95°C 10 min puis 40 cycles : 15 s 95°C, 1 min 60°C) est suivie en temps réel par la fluorescence émise par le SYBR lors de son incorporation à l'ADN double brins. A la fin de la réaction, l'analyse des T_m des produits d'amplification permet de vérifier la présence d'un seul amplifiat spécifique dans chaque puits excepté pour les puits dépourvus de matrice d'ADN (contrôle négatif). La mesure du cycle seuil moyen (Ct : cycle à partir duquel l'amplification devient exponentielle) obtenu pour chaque échantillon permet de calculer la quantité d'ADNc présents grâce à des droites d'étalonnage préalablement établies pour chaque gène étudié. Pour un gène, le taux d'ADNc est corrigé par rapport à celui de l'actine puis la valeur 1 est attribuée à l'échantillon prélevé au temps 0 de la cinétique du témoin. Les résultats sont finalement exprimés en multiples du taux d'ADNc présents dans l'échantillon témoin prélevé au temps 0 : T_{0h}.

5-6 Mesure de la production de phytoalexines

5-6-1 Extraction des phytoalexines

Deux mL de suspensions cellulaires sont prélevés à différents temps puis filtrés (GF/A). Les filtrats contenant le milieu extra-cellulaire sont immédiatement congelés à -80°C. Les cellules sont éventuellement congelées dans l'azote liquide avant d'être broyées au Potter dans 10 mL de

méthanol 80% afin d'en extraire les phytoalexines. Après centrifugation 10 min à 8000 g, les surnageants sont récupérés et l'extraction au méthanol 80% est répétée sur les culots. A l'issue de la seconde centrifugation, les surnageants sont regroupés et évaporés à 35°C sous vide et à l'obscurité. Les phytoalexines sont reprises par 1 mL de méthanol 80% avant d'être analysées par chromatographie liquide hautes performances (HPLC).

5-6-2 Dosage et identification des phytoalexines par HPLC

Les phytoalexines sont analysées à l'aide d'un système HPLC (Waters) comprenant un contrôleur de gradient W 600, un injecteur automatique W 717, un détecteur UV-visible à barrette de diodes W 966 et un fluorimètre W474. Vingt μ L de chaque échantillon sont injectés sur une colonne de phase inverse (colonne C18, Merck, 250 mm x 4 mm, 5 μ m) et les phytoalexines sont séparées par un gradient linéaire d'acétonitrile/eau passant de 10% à 85% d'acétonitrile. La détection des stilbènes est réalisée par les absorbances à 285 et 308 nm (λ max d'absorption ; Jeandet, 1997) d'une part, et par la fluorescence mesurée à 374 nm (λ_{exc} : 330 nm) d'autre part. La quantification des différentes phytoalexines est réalisée grâce aux gammes étalons établies en mesurant l'aire des pics correspondant à des quantités connues de chaque produit pur.

5-7 Mesure de la mort cellulaire

La mort cellulaire est mesurée en utilisant le rouge neutre ; un colorant vital qui permet de visualiser la vacuole en rouge dans les cellules dont l'intégrité membranaire est conservée. Les cellules dont la vacuole est incolore sont considérées comme mortes (Naton *et al.*, 1996). Après coloration au rouge neutre 0,01% (p/v) à pH 7,0, la mort cellulaire est évaluée par comptage de 500 cellules par essai, au microscope optique.

6 Tests de protection sur cellules isolées

Des aliquotes de suspensions cellulaires (2 mL) ont été mises en contact avec différents éliciteurs pendant 1h (agitation 150 rpm, 25°C) puis déposées sur milieu Nitsch-Nitsch et agar

15 g.L⁻¹ en boîtes de Pétri. La culture a été réalisée à 25°C en lumière permanente jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire homogène, puis 20 µL d'une suspension à 10⁴ conidies/mL ont été inoculés au centre de la culture cellulaire. Le développement du champignon a été évalué en mesurant son diamètre au cours du temps.

III. RESULTATS

CHAPITRE 1. IDENTIFICATION D'UN ELICITEUR DE *BOTRYTIS* *CINEREA* ET REACTIONS DE DEFENSE DE LA VIGNE

1 Comparaison de la pathogénie de différentes souches de *Botrytis cinerea* sur vitro-plants de vigne

L'objectif de cette expérience a été de comparer la pathogénie de différentes souches de *Botrytis cinerea* (V940, K1 et T4 respectivement prélevées sur vigne, kiwi et tomate), en observant le développement de conidies sur des feuilles de vitro-plants de vigne *Vitis rupestris*. Notre hypothèse était qu'une souche faiblement pathogène pouvait produire un éliciteur de réactions de défense.

Les souches V940 et K1 se développent en créant une zone de macération au niveau de la feuille infectée, et le mycélium occupe la partie centrale de la zone d'infection, avec production de conidies (Figure 15). Le développement est rapide puisque visible dès 48 h après l'inoculation, pour atteindre un diamètre du mycélium d'environ 1 cm, 5 jours plus tard. Le développement de la souche T4 est radicalement différent, aucune zone de macération n'est observée jusqu'à 6 jours après l'infection, et le mycélium n'est visible que 72 h après l'inoculation, avec des petites zones nécrotiques de 1 mm de diamètre sur la face supérieure de la feuille. De plus, aucune conidie n'est produite par la souche T4 dans ces conditions.

Selon notre hypothèse, le faible développement de la souche T4 pouvait s'expliquer par la production d'éliciteurs activant les réactions de défense de la vigne. D'autant que, inoculée sur feuilles de vigne, elle induit la synthèse de protéines PR et de phytoalexines (Derckel *et al.*, 1999). Cette souche a été retenue pour notre recherche d'éliciteurs.

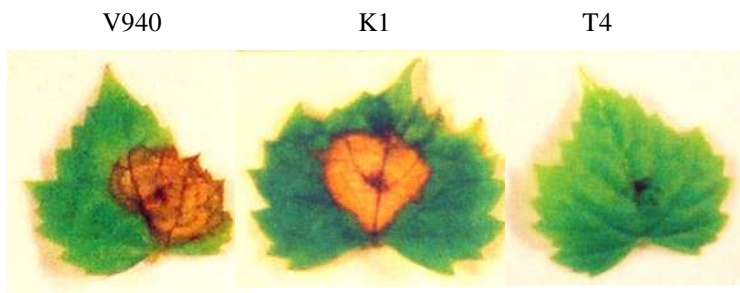


Figure 15 : Test de pathogénie de trois souches de *Botrytis cinerea* sur vitro-plants de vigne.

L'infection des vitro-plants de vigne *Vitis rupestris* a été réalisée en déposant 20 μL d'une suspension à 10^4 conidies/mL de *Botrytis cinerea* au centre de deux feuilles par plant. Les feuilles infectées ont été prélevées 6 jours après l'inoculation pour être photographiées. Ces images sont représentatives des résultats obtenus avec 8 feuilles provenant de 4 plants indépendants.

2 Etude comparative de la capacité des filtrats de culture de différentes souches de *Botrytis cinerea* à activer des réponses de défense chez la vigne

2-1 Obtention de suspensions cellulaires de vigne

Des suspensions cellulaires ont été initiées au laboratoire à partir de cals de vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay). Les cellules, cultivées dans un milieu Nitsch-Nitsch, ont une croissance régulière qui dépend de la densité de la suspension de départ (Figure 16). Lorsque la densité de la suspension est faible (10 mL/100mL), une phase de latence de 3 jours précède une phase exponentielle de 6 jours à 11 jours, durant laquelle le temps de doublement est estimé à 3 jours. Huit jours après le début de cette phase exponentielle, la croissance de la suspension cellulaire ralentit avant d'arriver à saturation 6 jours plus tard. Lorsque le milieu de culture estensemencé avec une densité plus élevée d'inoculum (30 mL/100 mL), la croissance de la suspension cellulaire est immédiatement proportionnelle au temps et ce pendant 8 jours, avant de ralentir progressivement à partir du 9^{ème} jour. Ces données nous ont conduits à repiquer les suspensions cellulaires de vigne tous les 7 jours en inoculant 70 mL de milieu neuf avec 30 mL de la culture précédente.

2-2 Activation des réactions de défense de cellules de vigne en suspension par des filtrats pré-purifiés de *Botrytis cinerea*

Cette expérimentation a été menée sur des suspensions cellulaires de vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay) traitées par les filtrats de culture des trois souches de *Botrytis cinerea* âgés de trois semaines. Les suspensions cellulaires se sont révélées être d'excellents outils pour l'étude des réactions de défense des plantes (Xie *et al.*, 1998 ; Romeis, 2001). En général, toutes les réactions identifiées dans des suspensions cellulaires sont retrouvées dans la plante entière. Pour étudier les effets d'un éliciteur, la suspension cellulaire présente de nombreux avantages : matériel disponible toute l'année, homogénéité du matériel, pénétration du produit, possibilité d'étudier les flux d'ions entre le milieu extra-cellulaire et intra-cellulaire, analyser des événements très rapides (de l'ordre de la minute)... Nous avons choisi d'étudier les réactions de

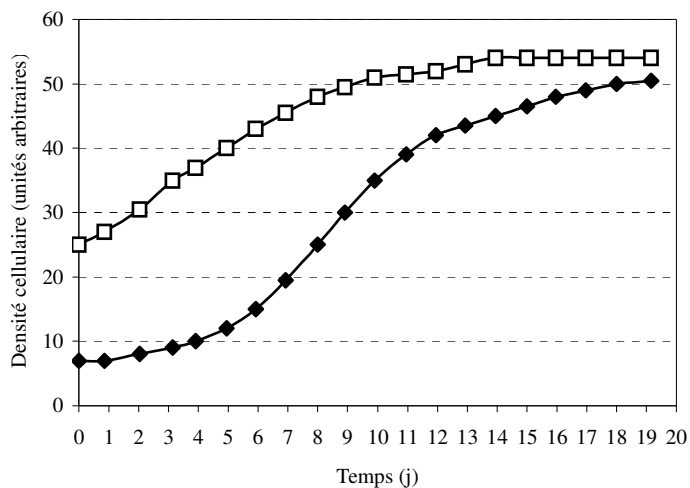


Figure 16 : Croissance des suspensions cellulaires de vigne en fonction de la densité initiale de la suspension.

Le milieu de culture Nitsch-Nitsch (1969) a étéensemencé avec des cellules de vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay) à faible (◆) ou à forte (□) densité et la croissance a été mesurée par décantation des cellules dans une fiole graduée. La densité cellulaire représente le nombre de cellules par rapport à un volume donné.

défenses les plus caractéristiques d'un traitement éliciteur et plus particulièrement, la production de FAO, l'activation de MAPK, l'efflux d'anions et la mort cellulaire.

2-2-1 Production de formes actives de l'oxygène

Le traitement de cellules de vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay) par les filtrats des trois souches de *B. cinerea* à raison de 5 µg de protéines/g PFC induit une production transitoire de FAO (Figure 17 A). Les trois filtrats provoquent une forte production de FAO dès les premières minutes de traitement. Le maximum de production (200-250 nmoles/g PFC) est atteint à 15 min et le niveau baisse rapidement après 45 min de traitement. Dès lors, la réponse des cellules est différente selon le filtrat utilisé : K1 induit une production constante d'environ 70 nmoles/g PFC jusqu'à 90 min, puis la production s'annule à partir de 2 h. Le filtrat de la souche V940 induit un second pic de production de FAO à 90 min, qui s'annule à 2 h. Avec le filtrat T4, la production de FAO augmente constamment pendant les 4 h suivantes.

2-2-2 Efflux de nitrate

Les filtrats V940 et K1 (5 µg de protéines/g PFC) ne provoquent aucun efflux de nitrate. La concentration en nitrate dans les milieux d'équilibration est constante, d'environ 400 nmoles/g PFC (Figure 17 B). Avec le filtrat T4 (5 µg de protéines/g PFC), une augmentation de la concentration extra-cellulaire en nitrate est décelable après 30 min de traitement et sa valeur atteint 1600 nmoles de NO₃⁻/g PFC à 150 min.

2-2-3 Activation de protéines kinases

Les cellules de vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay) ont été traitées par les filtrats de culture pré-purifiés des différentes souches de *Botrytis cinerea* à une concentration de 5 µg de protéines/g PFC, les cellules témoins ont été traitées par une concentration équivalente de SAB. L'activité des protéines kinases a été mesurée 5, 20, 40 et 60 min après le début du traitement. Dès 5 min, le niveau maximal d'activation des protéines kinases est atteint et celui-ci décroît avec le temps (Figure 17 C). A quantité égale de protéines, c'est le filtrat T4 qui donne la plus forte activation des protéines kinases (Figure 17 C).

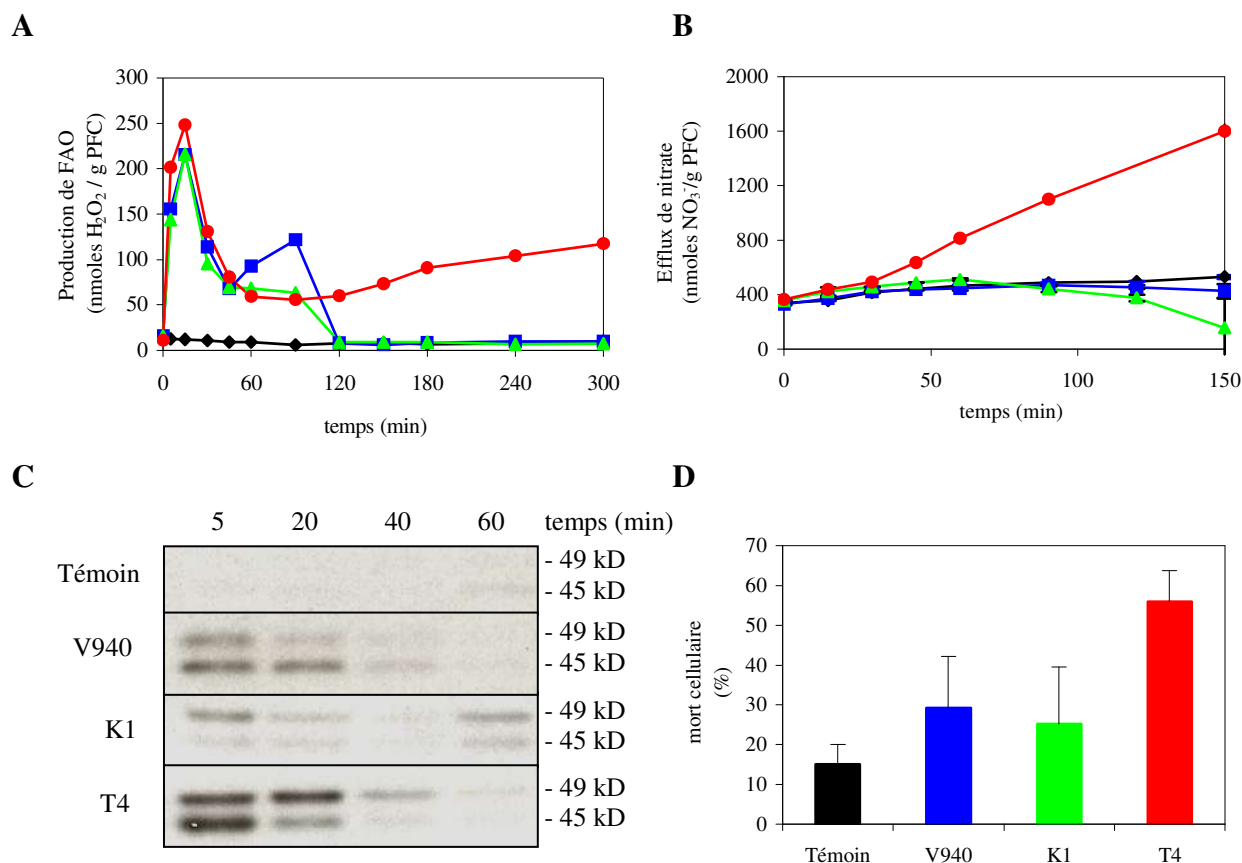


Figure 17 : Activation des réactions de défense de cellules de vigne *Vitis vinifera* traitées par des filtres de culture de trois souches de *Botrytis cinerea* V940 (■), K1 (▲) et T4 (●) à 5 µg de protéines/g PFC ou non traitées (témoin ; ◆).

A, Cinétique de production de FAO. Le dosage de H₂O₂ est réalisé avec des aliquotes de 250 µL des suspensions cellulaires. Les résultats sont représentatifs de 4 expériences distinctes. **B**, Efflux de nitrate. Le dosage du nitrate est réalisé sur 80 µL de surnageant. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences distinctes. **C**, Activation de protéines kinases. Les cellules ont été broyées après différents temps de traitement et les protéines extraites ont été séparées par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (12 %) contenant 0,1 mg/mL de MBP, substrat phosphorylable. Après dénaturation, renaturation et réaction enzymatique en présence de [α -³²P]-ATP, les activités protéines kinases ont été visualisées par autoradiographie. **D**, Comparaison de l'effet des filtres de culture de différentes souches de *Botrytis cinerea* sur la mort cellulaire après 24 h de traitement. Le pourcentage de mort cellulaire a été déterminé par comptage au microscope optique de 300 cellules colorées au rouge neutre (0,01 % à pH 7,0). Les résultats sont représentatifs de trois expériences distinctes.

2-2-4 Induction de la mort cellulaire

Dans les suspensions, la mort cellulaire induite par un éliciteur pourrait correspondre à la réaction hypersensible de la plante. La mort cellulaire, mesurée après 24 h de traitement par les filtrats de culture de *Botrytis cinerea*, correspond au pourcentage moyen de cellules mortes par rapport aux cellules vivantes (Figure 17 D). Par rapport à des suspensions témoins, dans lesquelles le taux de mort cellulaire est de l'ordre de 10 % après 24 h d'essai, les filtrats V940 et K1 (5 µg de protéines/g PFC) provoquent la mort d'environ 20% des cellules, tandis que T4, à la même concentration, induit la mort de 50% des cellules. Comme pour les autres effets mesurés, le filtrat T4 est le plus actif.

Ces résultats nous permettent de conclure que *Botrytis cinerea* produit des éliciteurs et que le filtrat de culture de la souche T4 (utilisé à la même concentration en protéines que le filtrat de K1 ou V940) est celui qui a la plus forte capacité à activer les réactions de défenses de cellules de vigne en suspension. Nous avons donc retenu la souche T4 comme source d'éliciteur(s) et avons commencé par en optimiser la production.

2-3 Optimisation de la production d'éliciteurs par la souche T4 de *Botrytis cinerea*

2-3-1 Etude de la production d'éliciteurs en fonction du milieu de culture

Partant de l'observation que *Botrytis cinerea* est principalement présent au vignoble sur les grappes de raisin mûr, nous avons émis l'hypothèse que la production d'éliciteurs par *Botrytis cinerea* pourrait être induite ou réprimée par la présence d'un composé présent dans le jus de raisin. C'est pourquoi notre étude a porté sur la production d'éliciteurs par *Botrytis cinerea* cultivé *in vitro*, pendant 21 jours, sur 3 milieux comprenant ou non du jus de raisin et le milieu de culture des cellules de vigne (Nitsch-Nitsch).

Le meilleur développement de *Botrytis cinerea* fut obtenu sur milieu Nitsch-Nitsch puis sur extraits de malt, « potato dextrose » et extraits de levure. L'addition de jus de raisin à ces milieux ralentit le développement de *Botrytis cinerea* avec, en particulier, l'apparition d'une phase de latence d'environ 7 jours.

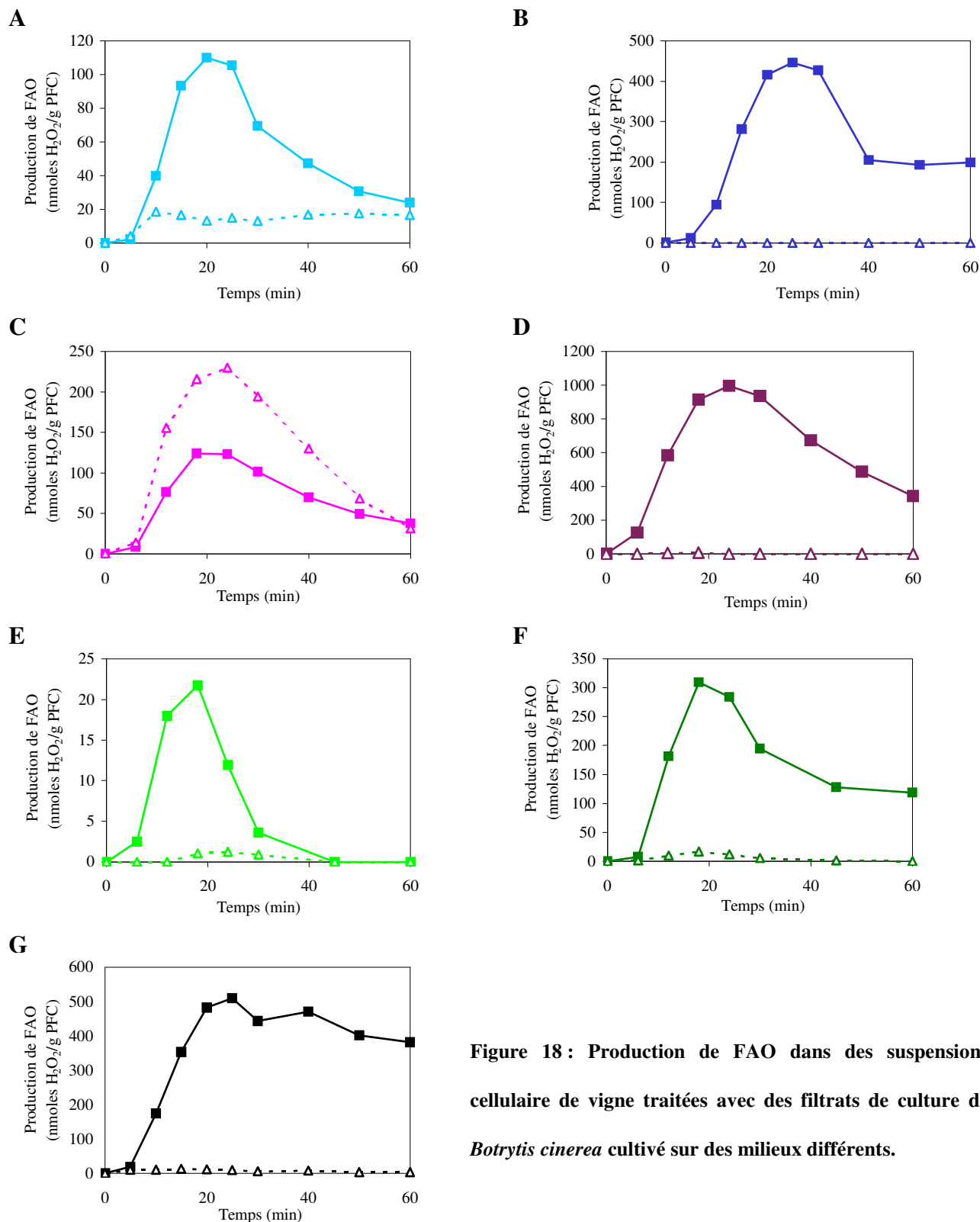


Figure 18 : Production de FAO dans des suspensions cellulaire de vigne traitées avec des filtrats de culture de *Botrytis cinerea* cultivé sur des milieux différents.

La production d' H_2O_2 est mesurée pendant 1 h après traitement de 10 mL de suspension cellulaire de vigne par 100 μ L de chacun des filtrats de culture de *Botrytis cinerea* (T4) cultivé sur différents milieux : extraits de malt (; **A**), extraits de malt et jus de raisin (■ ; **B**), extraits de levure (■ ; **C**), extraits de levure et jus de raisin (■ ; **D**), « potato dextrose » (; **E**), « potato dextrose » et jus de raisin (■ ; **F**), milieu Nitsch-Nitsch (■ ; **G**). Le symbole triangulaire représente le milieu de culture correspondant non ensemencé (témoin).

La synthèse des résultats obtenus avec les 7 filtrats de culture est présentée en Figure 18. Quel que soit le milieu utilisé, tous les filtrats de culture contiennent des composés capables d'induire la production de FAO dans des suspensions cellulaires de vigne (Figure 18 A-G). Cependant, selon le milieu de culture et, pour un même volume de filtrat, la production de FAO est différente d'un point de vue quantitatif et cinétique. Ainsi, la plus forte production est obtenue avec le filtrat de culture du milieu extraits de levure et jus de raisin (1000 nmoles d' H_2O_2 /g PFC ; Figure 18 D) et la plus faible avec le filtrat obtenu sur milieu « potato dextrose » (22 nmoles d' H_2O_2 /g PFC ; Figure 18 E). La production d' H_2O_2 qui se maintient le plus longtemps est obtenue dans les suspensions cellulaires traitées par le filtrat de culture du milieu Nitsch-Nitsch (environ 450 nmoles d' H_2O_2 /g PFC de 20 à 60 min ; Figure 18 G). Enfin, il est à noter que les milieux de culture témoins composés d'extraits de levure ou d'extraits de malt contiennent des éliciteurs en absence de *Botrytis cinerea* (Figure 18 A et C).

L'ensemble de ces résultats nous a conduits à sélectionner le milieu Nitsch-Nitsch, sans jus de raisin, pour la production et la purification d'éliciteurs de *Botrytis cinerea*. Ce milieu présente différents avantages : il permet une culture rapide de *Botrytis* avec une bonne production d'éliciteurs, il est entièrement synthétique et c'est le milieu de culture des cellules de vigne en suspension.

2-3-2 Etude de la production d'éliciteurs en fonction du temps de culture

Après avoir choisi la souche de *Botrytis cinerea* et le milieu de culture, nous avons déterminé la durée de culture pour laquelle la production d'éliciteurs est la plus élevée.

Cette étude a été menée en mesurant la production de FAO dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par 1 μg de protéines/g PFC des filtrats obtenus après des durées de culture variant de 0 à 30 jours. Les résultats de la Figure 19 mettent en évidence que la concentration en éliciteur(s) efficace(s) (par rapport aux protéines totales) augmente régulièrement de 0 à 12 jours, est maximale après 14 jours, puis redescend entre 15 et 30 jours de culture.

La purification du (des) composé(s) actif(s) produit(s) par *Botrytis cinerea* a donc été entreprise à partir des filtrats de culture de la souche T4 obtenus sur milieu Nitsch-Nitsch, 14 jours après ensemencement des conidies.

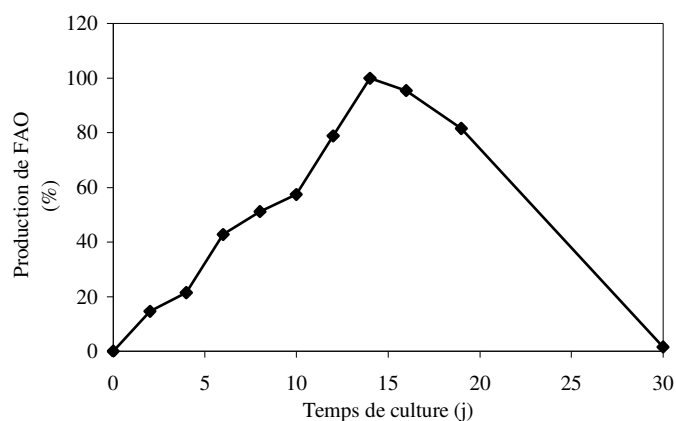


Figure 19 : Activité élicitrice du filtrat de culture de la souche T4 en fonction du temps de culture du champignon.

Botrytis cinerea (T4) a été cultivé sur milieu Nitsch-Nitsch à 25°C avec une photopériode 16/8 h (jour/nuit). Aux temps indiqués, la culture est prélevée et le filtrat de culture est concentré par dialyse. La concentration en protéines est déterminée, puis l'activité élicitrice est mesurée par la production d'H₂O₂ induite dans des suspensions cellulaires de vigne, 20 min après addition d'une aliquote de chaque filtrat à une concentration de 1 µg de protéines par g PFC.

3 Purification et caractérisation de l'éliciteur à partir du filtrat de culture de la souche T4 de *Botrytis cinerea*

3-1 L'éliciteur est une protéine possédant des ponts disulfures

Etant donné que les éliciteurs actuellement connus sont de natures chimiques variées (lipides, sucres, protéines...), une série de tests a été réalisée afin de définir la nature chimique du (des) composé(s) actif(s) présent(s) dans le filtrat de culture de *Botrytis cinerea*.

Lors de la préparation de filtrats de culture pré-purifiés (Matériels et méthodes § 2-1-2), l'étape de dessalage par chromatographie sur gel (G-25) a permis de conclure que l'éliciteur était une macro-molécule puisque son élution se faisait avec le volume mort de la colonne. Cette information a été confirmée par des essais d'ultrafiltration où le(s) composé(s) actifs(s) étai(en)t retenu(s) par une membrane avec un seuil de coupure de 30 kD. De plus, des essais positifs de concentration de l'éliciteur par précipitation au sulfate d'ammonium 80% nous ont amenés à penser que la molécule active devait être de nature protéique. Pour vérifier cette hypothèse, différents traitements physiques et chimiques du filtrat de culture pré-purifié connus pour affecter les protéines ont été réalisés avant de mesurer la production de FAO induite dans des suspensions cellulaires de vigne.

3-1-1 L'éliciteur est une protéine

La digestion du filtrat de culture par des protéases (8 h à 42°C) montre une forte réduction (d'environ 70%) de l'activité élicitrice (Figure 20). L'oxydation des sucres par le métapériodate (12 h à 4°C) réduit cette activité d'environ 35%. Par ailleurs un traitement par la chaleur (5 min à 100°C) ne modifie pas l'activité élicitrice du filtrat de culture de *Botrytis cinerea*.

Ces résultats nous donnent donc les informations suivantes : l'activité élicitrice est thermostable et elle est portée soit par une glycoprotéine soit par un sucre et une protéine. La plupart des éliciteurs de nature protéique présents dans les milieux extra-cellulaires sont des protéines thermostables dont la structure est maintenue par des ponts disulfures (Ricci *et al.*,

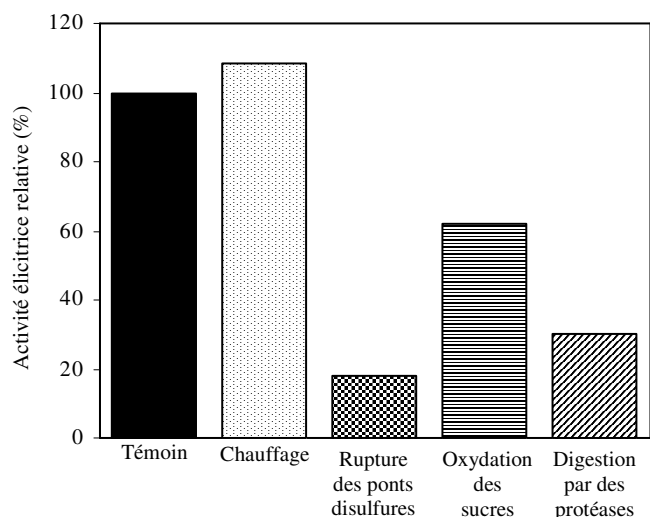


Figure 20 : Caractérisation biochimique de l'activité élicitrice présente dans les filtrats de culture de *Botrytis cinerea* T4.

L'activité élicitrice est déterminée par la production de FAO dans des suspensions cellulaires de vigne, 20 min après addition d'une aliquote de filtrat de culture (5 µg/g PFC) ayant subi divers traitements : digestion par des protéases (pronase 1 mg/mL pendant 8 h à 42°C), réduction et alkylation des ponts disulfures (DTT 500 µM, 1 h à 37°C puis IAEDENS 5 mM, 1 h à 37°C), oxydation des sucres (NaIO₄ 5 mM, 12 h à 4°C) et chauffage (10 min à 100°C). Les résultats sont exprimés en activité élicitrice relative. 100% correspondant à la production d'H₂O₂ induite par un filtrat témoin.

1993). La présence et l'implication de ce type de liaison dans la protéine élicitrice ont donc été étudiées.

3-1-2 Les ponts disulfures de la protéine ont un rôle majeur dans son activité élicitrice

La réduction des ponts disulfures (DTT 500 μ M pendant 1 h à 37°C) suivie de leur alkylation (IAEDENS 5 mM pendant 1 h à 37°C) provoque une forte diminution (d'environ 80%) de l'activité élicitrice du filtrat de culture pré-purifié (Figure 20).

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette série d'expériences nous a permis de confirmer l'implication d'au moins une (glyco-)protéine dans l'activité élicitrice du filtrat de culture de la souche T4 de *Botrytis cinerea*. Sa purification a été réalisée par des étapes de chromatographie sur gel.

3-2 Purification de la glycoprotéine élicitrice par chromatographie

Après de nombreux essais, il nous est apparu que la purification de protéines provenant d'un filtrat de culture de *Botrytis cinerea* était fortement perturbée par la présence d'un glucane de masse moléculaire importante pouvant correspondre à celui préalablement décrit comme le cinerean (Stahmann *et al.*, 1995). Une étape préalable de congélation, décongélation et filtration a permis d'éliminer une grande partie de ce polymère osidique qui reste insoluble après décongélation.

Par ailleurs, la purification nécessitait la mise au point préalable d'un test rapide pour détecter l'activité élicitrice dans toutes les fractions issues d'une étape de chromatographie. Le test développé consiste à disposer des aliquotes de cellules de vigne (1 mL) dans des microplaques 24 puits et de les traiter par une aliquote (20 μ L) de chacune des fractions de chromatographie. Vingt minutes après le traitement, 250 μ l de suspension cellulaire sont prélevés pour mesurer la production de FAO dans chaque aliquote de cellules. Ce test simple permet de détecter l'activité élicitrice de 60 fractions en 30 min.

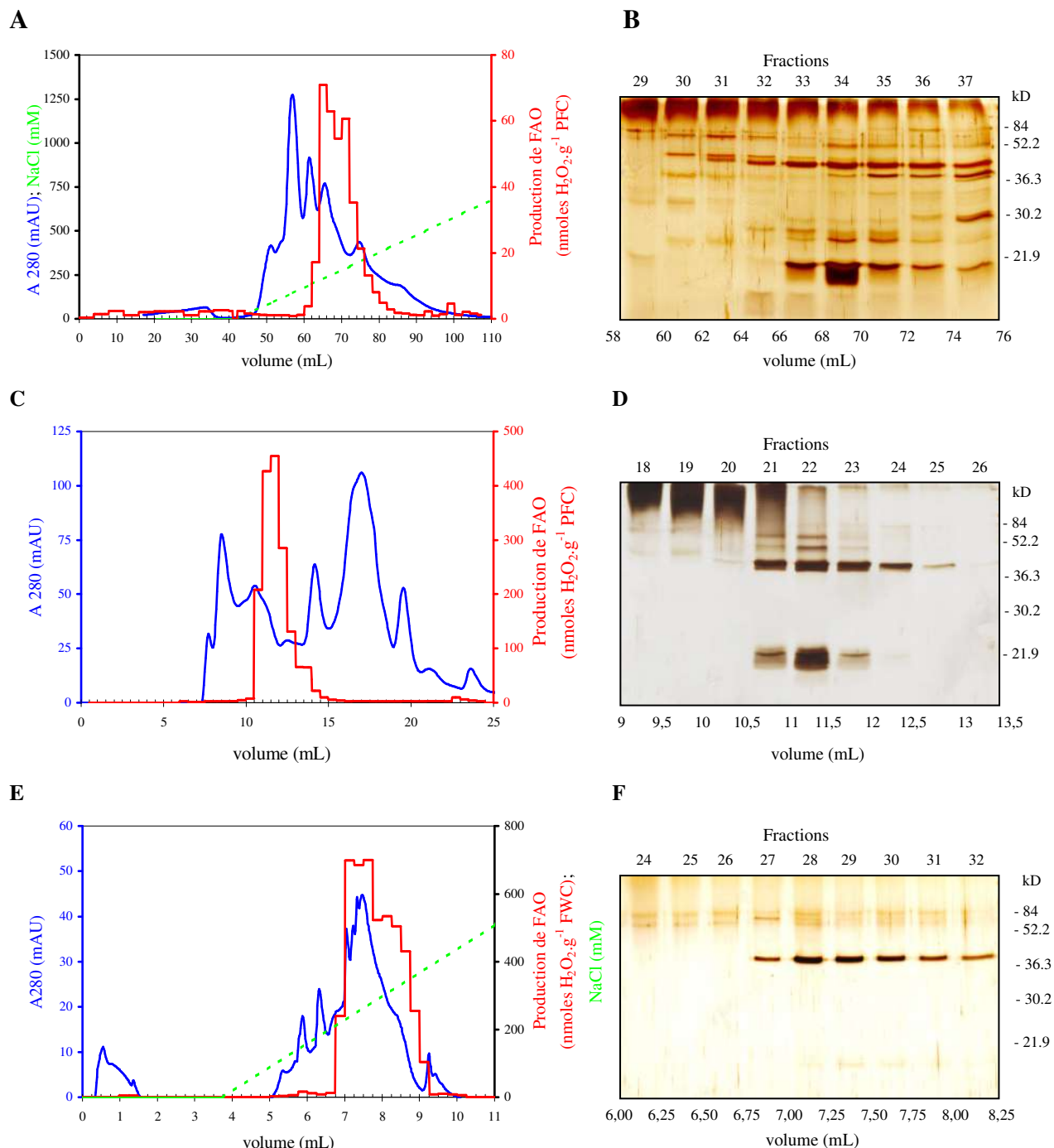


Figure 21 : Purification de l'éliciteur par chromatographies.

A, chromatographie échangeuse d'anions à pH 10,8 du filtrat de culture concentré de *Botrytis cinerea* souche T4 et **B**, analyse des fractions actives par SDS-PAGE et coloration à l'argent. **C**, chromatographie d'exclusion à pH 7 des fractions actives rassemblées, issues de la première étape de purification et **D**, SDS-PAGE des fractions actives. **E**, séparation des fractions actives, obtenues après la seconde étape de purification, par HPLC avec une colonne échangeuse d'anions à pH 10,8 et **F**, SDS-PAGE correspondante. Absorbance à 280 nm (A 280, —) ; production de FAO (—) ; NaCl (.....). La purification de l'éliciteur est suivie par la production d' H_2O_2 dans des suspensions cellulaires de vigne (1 mL), 20 min après traitement par une aliquote (20 μ L) de chaque fraction. Les électrophorèses sont réalisées avec 20 μ L de chaque fraction.

3-2-1 Chromatographie échangeuse d'anions (basse pression)

Après différents essais préliminaires, l'interaction ionique des protéines sur une colonne échangeuse d'anions (Hitrap Q sépharose 5 mL, Pharmacia Biosciences), en présence de glucane dans le filtrat de culture, a été obtenue en tampon alcalin (pH 10.8). Le chromatogramme de cette première étape de purification (Figure 21 A) montre que l'activité élicitrice n'est présente que dans un pic majoritaire élué entre 200 et 400 mM de NaCl. L'analyse SDS-PAGE correspondante (Figure 21 B) permet de visualiser les nombreux peptides présents dans le pic d'activité (élué entre 60 et 80 mL). Les fractions actives ont été rassemblées, concentrées par ultra-filtration (Microsep avec un seuil de coupure de 10 kD) avant d'en séparer les protéines par une seconde étape de purification sur gel d'exclusion.

3-2-2 Chromatographie d'exclusion

La seconde étape de purification de la fraction active, sur gel d'exclusion (Superdex 75 HR 10/30, Pharmacia Biosciences), permet de séparer les protéines en fonction de leur taille à l'état natif. L'analyse du chromatogramme (Figure 21 C) met en évidence un seul pic pour l'activité élicitrice élué entre 10,5 et 15 mL. La calibration de la colonne, avec des protéines de masse moléculaire connue, a permis de déduire une masse moléculaire de la protéine active d'environ 40 kD (Figure 21 C). L'analyse des fractions actives par SDS-PAGE (Figure 21 D) révèle l'élution du glucane non éliciteur (traînée proche des dépôts) dans le premier pic d'absorbance à 280 nm (de 7 à 9,5 mL) puis de deux peptides majoritaires avec des tailles apparentes de 40 et 21 kD dans les fractions élicitrices (de 10,5 à 12,5 mL). Il est à noter que le peptide de 21 kD, issu de la chromatographie d'exclusion et visible après électrophorèse en conditions dénaturantes, doit appartenir à une protéine oligomérique à l'état natif puisqu'un monomère de cette taille devrait être normalement élué entre 13,5 et 14,5 mL. Après avoir rassemblé les fractions actives, une dernière étape de purification a été réalisée par chromatographie échangeuse d'anions à moyenne pression.

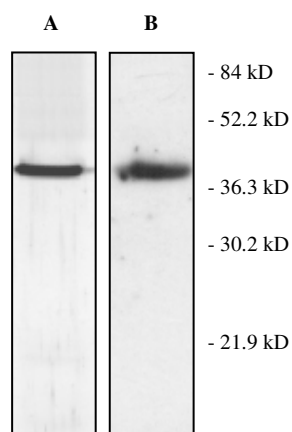


Figure 22 : Détection des glycoprotéines.

Piste **A** : éliciteur purifié (1 µg) obtenu après la dernière purification réalisée en HPLC avec une colonne échangeuse d'anions et soumis à une SDS-PAGE avant coloration à l'argent. Piste **B** : détection des glycoprotéines réalisée sur l'éliciteur purifié. Après migration de l'éliciteur (5 µg) en SDS-PAGE (12%) et transfert sur membrane de nitrocellulose, la détection des glycoprotéines est réalisée en suivant les instructions du fabricant des kits « glycoprotein detection kit » et « ECL detection kit » (Pharmacia Biosciences).

3-2-3 Chromatographie échangeuse d'anions (moyenne pression)

Cette dernière étape de purification (Figure 21 E) permet d'obtenir une forte activité élicitrice (environ 700 nmoles d'H₂O₂/g PFC), éluée dans un pic majoritaire par 200 à 400 mM de NaCl, dont l'absorbance à 280 nm est relativement faible (environ 0,04). L'analyse SDS-PAGE des fractions correspondantes (Figure 21 F) ne révèle plus qu'un peptide de masse moléculaire apparente proche de 40 kD. Ce peptide semble être actif sous forme monomérique puisque la taille apparente en SDS-PAGE correspond à la masse moléculaire préalablement déterminée sur gel d'exclusion (§ 3-2-2).

3-2-4 Détection des glycoprotéines

De nombreux éliciteurs produits par les champignons sont des glycoprotéines (Baillieul *et al.*, 1995 ; Sacks *et al.*, 1995), il était important d'obtenir cette information pour l'éliciteur purifié. Après SDS-PAGE et transfert sur membrane, la protéine active a été soumise à la détection des glycoprotéines réalisée en trois étapes : l'oxydation des sucres, le marquage à la biotine et la révélation par la streptavidine couplée à une peroxydase. L'image du résultat obtenu, présentée en Figure 22, montre clairement la présence d'une bande à 40 kD. Il apparaît donc que la protéine élicitrice contient une partie glucidique.

L'identification de la glycoprotéine pure fut entreprise par analyse en spectrométrie de masse des peptides obtenus à l'issue de sa digestion par la trypsine. Le séquençage par spectrométrie de masse a été réalisé au sein de l'équipe du Dr. J. Garin (laboratoire de chimie des protéines, CEA Grenoble).

3-3 Identification de la protéine élicitrice par spectrométrie de masse

La protéine élicitrice purifiée par HPLC a été soumise à une électrophorèse en conditions dénaturantes (1 µg) avant d'être colorée au bleu de Coomassie. Après décoloration du gel, la bande fut découpée, placée dans l'éthanol 20% puis envoyée à nos collègues grenoblois qui réalisèrent la digestion tryptique et l'analyse des peptides par spectrométrie de masse.

Masse du peptide	Séquence
902,5	C*AGLPSGVK
1413,4	TVSGATGSVSGVTYK
1661,9	PTSGVPITDVTFSNVK
1707,9	SDNTVSDIIESSTVK
2085,9	DITLSGITSYGVVVQQDYK

* acrylamido-cystéine

Tableau III : Masses et séquences en acides aminés des peptides obtenus après digestion trypsique de l'élécteur glycoprotéique respectivement déterminées par analyses MALDI et Q-TOF en spectrométrie de masse.

Peptide signal ↓ Pro-peptide ↓

```

1      MVQLLSMASGLLALSAIVSAAPAPAPTAAPNPAAEALAAIEQRGTACTFSG
51     SGGAAAASKSKASCATIVLSALSVPSGTTDLTGLKSGTQVIFEGTTTFG
101    YEEWSGPLFSVSGTDITVKGASGSKLDGQGAKYWDGKGTNGGKTKPKFFY
151    AHSLKGKSTISGINILNSPVQVFSINGASGLTLSNINIDNSAGDAGSLGH
201    NTDAFDVGSSSDITISGAVVKNQDDCLAINSGTGITFTGGTCSGGHGLSI
251    GSVGGRSDNTVSDIIESSTVKNSANGVRIRKTVSGATGSVSGVTYKDITL
301    SGITSYGVVVQQDYKNGSPTGTPTSGVPITDVTFSNVKGTVASGATNVYV
351    LCAKCSGWSWDVSVSGGKTSSKAGLPSGVKC
  
```

Figure 23 : Séquence en acides aminés de l'endopolygalacturonase 1 de *Botrytis cinerea* (souche SAS56) déduite de la séquence nucléotidique présente dans les bases de données et contenant les cinq peptides séquencés par spectrométrie de masse.

Les acides aminés sont définis par le code international à une lettre. Les séquences peptidiques obtenues par spectrométrie de masse sont soulignées et repérées par une couleur. Les sites de coupures putatifs du peptide signal et du pro-peptide sont indiqués par une flèche. Le site de N-glycosylation putatif sur Asn³¹⁶ est souligné doublement. Les 8 acides aminés strictement conservés dans toutes les polygalacturonases microbiennes sont surlignés en gris.

3-3-1 Micro-séquences de peptides provenant de la protéine élicitrice

La masse de chacun de cinq des peptides obtenus après digestion trypsique de l'éliciteur a été déterminée par MALDI-TOF. L'analyse en Q-TOF a permis d'obtenir les séquences peptidiques correspondantes. Les cinq peptides analysés (Tableau III) ont des masses variant de 902,5 à 2085,9 et des séquences comportant de 9 à 19 amino-acides avec au total, l'identification de 75 acides aminés.

3-3-2 Identification de l'éliciteur par interrogation des bases de données

L'interrogation des bases de données avec les informations obtenues ci-dessus a permis d'identifier sans équivoque une protéine dont la séquence peptidique contenait exactement les cinq peptides identifiés par spectrométrie de masse. Cette protéine est l'endopolygalacturonase 1 de *Botrytis cinerea* (Figure 23). Le gène correspondant (*Bcpg1*) a été séquencé par une équipe hollandaise à partir de la souche SAS56 (Ten Have *et al.*, 1998). La phase codante de ce gène comporte 1146 nucléotides et sa traduction conduit à une protéine prédite de 382 acides aminés contenant un site de clivage putatif du peptide signal entre les résidus alanine (A) 20 et 21 (Figure 23). La présence d'un second site de clivage putatif sur l'arginine (R) 42 pourrait conduire à une protéine mature de 341 acides aminés de masse moléculaire 33,7 kD et avec un pI calculé de 8,07. Cette protéine contient également un site de N-glycosylation en position 316 et les 8 acides aminés conservés dans les polygalacturonases microbiennes (Benen *et al.*, 1999 ; Van Santen *et al.*, 1999). La trypsine utilisée pour identifier l'éliciteur, digère les peptides après la lysine (K) ou l'arginine (R) or, dans la séquence de BcPG1 de la souche SAS56, l'acide aminé qui précède le peptide de masse 1661,9 (en bleu) est une thréonine (T). Il pourrait donc y avoir des mutations ponctuelles entre la séquence de *Bcpg1* de la souche SAS56 et la séquence du gène correspondant à l'endopolygalacturonase 1 de la souche T4 (T4BcPG1) que nous avons purifiée. Cette observation nous a conduits à vérifier l'activité enzymatique de T4BcPG1.

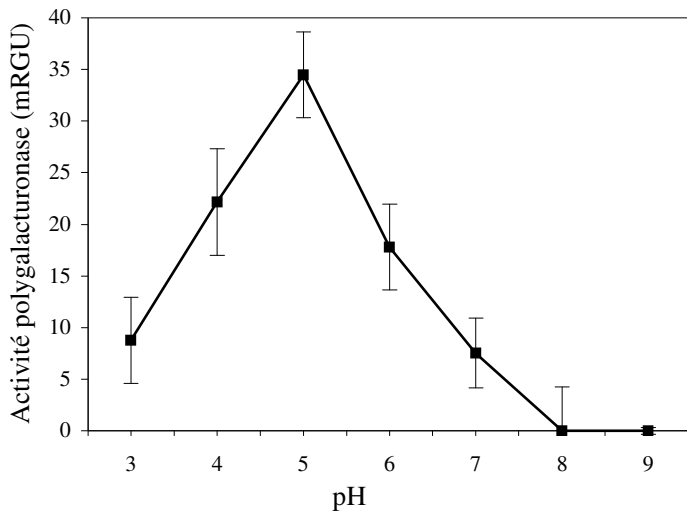
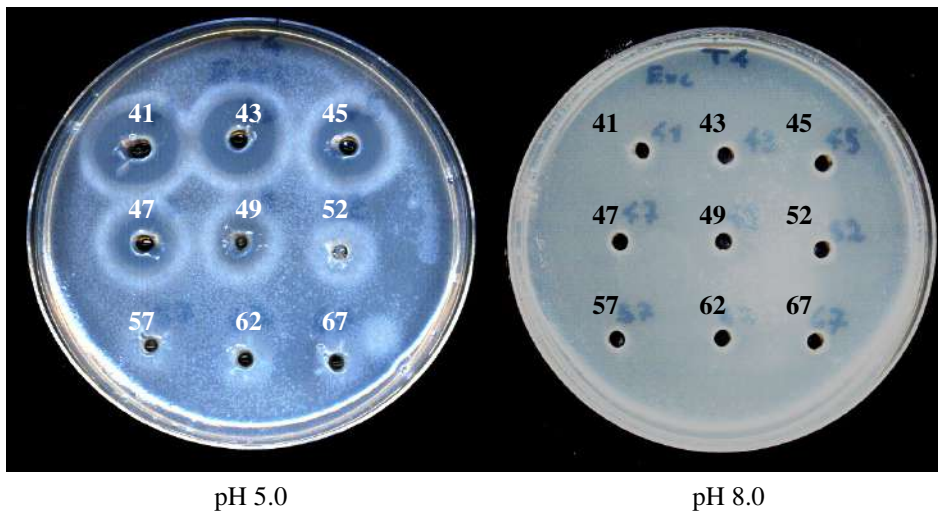
A**B**

Figure 24 : Activité polygalacturonase de l'éléciteur purifié en fonction du pH.

A, L'activité enzymatique est déterminée avec la méthode spectrophotométrique utilisant le 2-cyanoacétamide (Bach et Schollmeyer, 1992) avec l'acide polygalacturonique comme substrat. Une « Reducing Group Unit » (RGU) correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μ mole de sucre réducteur par min à 30°C, en utilisant une gamme étalon établie avec l'acide galacturonique (monomère) comme sucre réducteur. **B**, analyse de l'activité polygalacturonase à pH 5 et 8 des fractions actives (41 à 52) lors de l'étape de purification par gel d'exclusion. Cinquante μ L de chaque fraction sont déposés dans un puits d'un milieu gélosé tamponné au pH indiqué, contenant de l'acide polygalacturonique (0,5%). Après incubation une nuit à 30°C, l'acide polygalacturonique présent dans le milieu est précipité par une solution de CTAB 1%. L'activité polygalacturonase est mise en évidence par la présence d'un halo clair autour des puits car l'acide galacturonique (monomère) n'est pas précipité par le CTAB 1%.

3-3-3 Vérification de l'identité de la protéine élicitrice T4BcPG1 par l'étude de son activité enzymatique

Deux méthodes ont été utilisées pour vérifier l'activité enzymatique de l'éliciteur (T4BcPG1). La première consiste à étudier la capacité de T4BcPG1 à hydrolyser l'acide polygalacturonique en fonction du pH du milieu réactionnel, par la méthode spectrophotométrique utilisant le 2-cyanoacétamide (Bach et Schollmeyer, 1992). Cette méthode permet de quantifier les sucres réducteurs libérés par l'enzyme en utilisant une gamme étalon établie avec l'acide galacturonique. La seconde méthode utilisée permet de visualiser l'activité enzymatique en milieu gélosé. Une aliquote de la fraction protéique est déposée dans un puits d'un milieu gélosé dans lequel le substrat (l'acide polygalacturonique) est incorporé. Après incubation à 30°C, l'acide polygalacturonique non hydrolysé est précipité spécifiquement par le CTAB 1%. L'activité enzymatique est alors détectable par la présence d'un halo clair autour des puits car les produits de l'hydrolyse enzymatique ne sont pas précipités. Cette seconde méthode est donc uniquement qualitative.

Les résultats présentés en Figure 24 A montrent que l'éliciteur purifié possède une activité polygalacturonase dans une large gamme de pH allant de 3 à 7 avec un maximum à 5. Ces résultats sont confirmés par la seconde méthode : l'activité enzymatique de T4BcPG1 est clairement observable à pH 5 alors qu'elle est invisible à pH 8 (Figure 24 B).

3-4 Séquençage nucléotidique de l'ADNc codant la protéine élicitrice T4BcPG1 et polymorphisme de séquences

Les résultats obtenus par l'analyse des bases de données laissent présager l'existence de mutations ponctuelles dans la séquence de BcPG1 entre les souches SAS56 et T4. Afin de vérifier cette hypothèse le séquençage du gène *Bcpgl* de la souche T4 a été réalisé par l'équipe de phytopathologie et méthodologie de la détection du Dr. Y. Brygoo (PMDV, INRA de Versailles). Cette équipe a entrepris le séquençage total du génome de *Botrytis cinerea* en prenant la souche T4 comme référence. Six mille quatre cents étiquettes de séquence d'ADNc ont déjà été obtenues et parmi celles-ci, un ADNc pleine longueur de *T4Bcpgl* a été identifié. Le

1	ATGTTCAACTTCTCTCAATGGCTCCGGC	CTCCTTGCCTGAGCGCAATCGTCTCTGCT	GCTCCAGCACCAGCACCAACCGCAGCTCCA	
1	M V Q L L S M A S G	L L A L S A I V S A	A P A P A P T A A P	T4
1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	SAS56
91	AACCCAGCCGATGCTCTTGCCGCTATCGAG	CAACGTGCTGCCGCTGTACCTTCTCGGGA	TCGGTGGTGTGCGCGCGCTTCCAAGTCC	
31	N P A D A L A A I E	Q R A A A C T F S G	S G G A A A A S K S	T4
31	- - - E - - - - -	- - - G T - - - - -	- - - - - - - - -	SAS56
181	AAGACTTCTGCGCCACCATCGTCTCAGC	GCACTCTCCGTCCTCCGTTACTACCTT	GACTTGACTGGCTCAAGTCCGGCACCCAT	
61	K T S C A T I V L S	A L S V P S G T T L	D L T G L K S G T H	T4
61	- A - - - - -	- - - - -	- - - - - Q	SAS56
271	GTCGTCTTCGAGGGTACCACCACTTCGGC	TACGAAGAATGGTCCGGTCTCTCTCTCC	GTCTCCGGAAGTACATTACTGTACCGGT	
91	V V F E G T T T F G	Y E E W S G P L F S	V S G T D I T V T G	T4
91	- I - - - - -	- - - - -	- - - - - K -	SAS56
361	GCCTCCGCGAGCAAGCTTGATGGCCAAGGA	GCCAAAGTACTGGGATGGAAGGGAACCAAC	GGTGGAAAGACCAAGCCAAAGTTCTTTTAC	
121	A S G S K L D G Q G	A K Y W D G K G T N	G G K T K P K F F Y	T4
121	- - - - -	- - - - -	- - - - -	SAS56
451	GCCCACTCTTGAAGGGTAAATCAACAATC	TCTGGTATCAACATCTTGAACCTCTCCAGTT	CAAGTCTTCTCCATCAACGGTGCTTCCGGT	
151	A H S L K G K S T I	S G I N I L N S P V	Q V F S I N G A S G	T4
151	- - - - -	- - - - -	- - - - -	SAS56
541	CTTACTCTCTCAACATCCACATTGACAAC	TCTGCTGGAGATGCTGGTAAACTTGGCCAC	AACACCGATGCTTTCGATGTTGGTTCCCTCC	
181	L T L S N I H I D N	S A G D A G K L G H	N T D A F D V G S S	T4
181	- - - - - N - - - - -	- - - - - S - - - - -	- - - - - - - - -	SAS56
631	AGCGATATCACCATCTCTGGTGCCAACGTT	CAAAACCAAGATGACTGTCTCGCTATCAAC	TCCGGTACTGGTATTACCTTACCGGTGGA	
211	S D I T I S G A N V	Q N Q D D C L A I N	S G T G I T F T G G	T4
211	- - - - - V - - - - -	- - - - - K - - - - -	- - - - - - - - -	SAS56
721	ACCTGTTCCGGTGGTCACGGTCTCTCTATC	GGATCTGTCGGTGGACGTTCCGACAACT	GTCTCCGATATCATCATGAATCATCTACT	
241	T C S G G H G L S I	G S V G G R	S D N T V S D I I I E S S T	T4
241	- - - - -	- - - - -	- - - - -	SAS56
811	GTCAAGAACTCTGCCAACGGTGTCCGTATC	AAGACTGTCTCCGGTGCCACTGGATCCGTC	TCCGGCGTTACCTACAAGGACATCACCTC	
271	V K N S A N G V R I	K T V S G A T G S V	S G V T Y K D I T L	T4
271	- - - - -	- - - - -	- - - - -	SAS56
901	TCCGGCATTACATCTACGGTGTGTCTGTT	CAACAAGATTACAAGAAGGTTCCCAACC	GGAAAGCCAACCTCCGGTGTCCCATCACT	
301	S G I T S Y G V V V	Q Q D Y K N G S P T	G K P T S G V B I T	T4
301	- - - - -	- - - - -	- - - - - T - - - - -	SAS56
991	GATGTCACCTTCTCAACGTCAAGGGTACC	GTCTCTCCAGTGTACCAACGTCTACGTT	CTTTCGCGCAAGTGTCTGGTGGTCTTGG	
331	D V T F S N V K	G T V S S A T N V Y V	L C A K C S G W S W	T4
331	- - - - -	- A - G - - - - -	- - - - -	SAS56
1081	GATGTCAGTGTAGCGGTGGTAAGACCTCC	AGCAAGTGTGCTGGTCTCCCATCTGGTGTG	AAGTGTAA	
361	D V S V S G G K T S	S K C A G L P S G V	K C *	T4
361	- - - - -	- - - - -	- - *	SAS56

Figure 25 : séquence nucléotidique de l'éliciteur de *Botrytis cinerea* souche T4 (*T4Bcp1*) et comparaison des séquences peptidiques correspondantes pour les souches T4 et SAS56.

Les nucléotides et les acides aminés sont définis par le code international à une lettre. Les séquences peptidiques obtenues par spectrométrie de masse sont soulignées et repérées par une couleur. Première ligne : séquence nucléotidique de l'ADNc de *T4Bcp1*. Seconde ligne : séquence peptidique de la protéine correspondante (T4BcPG1) après traduction. Surligné gris : acides aminés qui diffèrent entre la souche T4 et la souche SAS56 (l'acide aminé correspondant dans la protéine de la souche SAS56 est indiqué sur la troisième ligne). - : acide aminé identique entre les séquences des deux souches. * : codon stop.

Dr. C. Levis (PMDV, INRA de Versailles) a réalisé deux fois le séquençage de *T4Bcpgl* dans les deux sens et nous a donné le clone correspondant ainsi que les séquences brutes.

3-4-1 Séquence nucléotidique de l'ADNc codant *T4BcPGI* et séquence peptidique correspondante

La séquence de l'ADNc de l'éliciteur (*T4Bcpgl*) est présentée en Figure 25. La phase codante comporte 1146 nucléotides. La traduction de cette séquence révèle une séquence peptidique de 382 acides aminés dans laquelle sont retrouvées les séquences des 5 peptides obtenus par spectrométrie de masse. La comparaison des séquences peptidiques de BcPGI obtenues pour les souches T4 et SAS56 fait apparaître 14 mutations. La thréonine (T322) de la séquence SAS56BcPGI est remplacée par une lysine dans la séquence T4BcPGI (K322), ce qui explique la libération par la trypsine du peptide de masse 1661,9. Mais les 8 acides aminés strictement conservés dans les séquences des polygalacturonases microbiennes sont présents.

Afin de vérifier que ces 14 mutations identifiées *in silico* n'étaient pas dues à des erreurs de séquençage, nous avons entrepris de vérifier cette séquence nucléotidique en établissant la carte de restriction du plasmide contenant l'ADNc de *T4Bcpgl*.

3-4-2 Vérification de la carte de restriction du plasmide contenant l'ADNc de *T4Bcpgl*

Grâce aux données du séquençage et à l'utilisation du logiciel Vector NTI, la carte de restriction théorique du plasmide a été établie (Figure 26 A). L'analyse de cette carte montre la présence de 6 sites de restriction d'enzymes courantes dans la séquence de *T4Bcpgl* : 2 sites *Kpn* I, 2 sites *Eco* RV, 1 site *Hind* III et 1 site *Bam* HI. Le plasmide portant l'ADNc de *T4Bcpgl* a donc été soumis à la digestion par ces enzymes de restriction afin de vérifier que les fragments libérés avaient bien les tailles prédites par la carte théorique. La Figure 26 B présente les résultats obtenus à l'issue de ces digestions. Les résultats expérimentaux sont en adéquation avec les données bio-informatiques puisque tous les fragments sont détectés aux tailles attendues (*Kpn* I : 380 pb, 732 pb, 3215 pb ; *Bam* HI : 4327 pb ; *Eco* RV : 153 pb, 689 pb, 3485 pb ; *Pvu* II : 1827 pb, 2500 pb ; *Hind* III : 434 pb, 3893 pb).

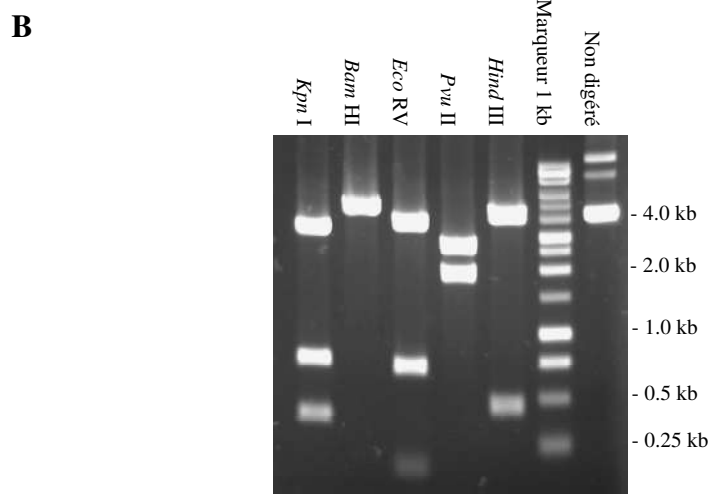
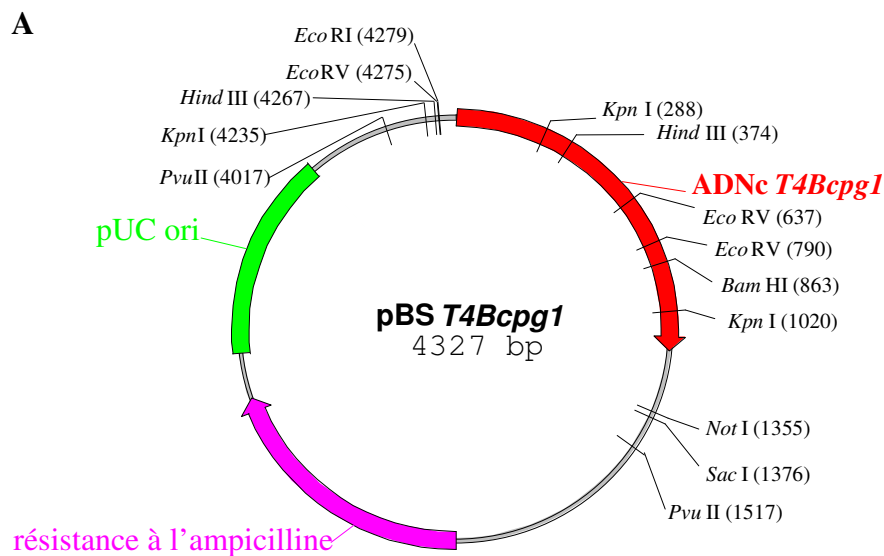


Figure 26 : Vérification de la carte de restriction du plasmide contenant l'ADNc codant la protéine élicitrice T4BcPG1.

A, Carte de restriction théorique du plasmide pBS II KS, contenant l'ADNc *T4Bcpg1* cloné entre les sites *Eco RI* et *Not I*, réalisée à partir de la séquence nucléotidique obtenue par deux réactions de PCR indépendantes, dans les deux sens. Le premier nucléotide de l'ADNc *T4Bcpg1* est numéroté 1.

B, Vérification du plasmide par analyses de restriction. Pistes *Kpn I* à *Hind III* : profil électrophorétique du plasmide pBS *T4Bcpg1* (1µg) digéré par les enzymes de restriction correspondantes pendant 1 h à 37°C. Marqueur 1 kb : marqueur de masses moléculaires. Non digéré : profil électrophorétique du plasmide circulaire. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (1%) avec coloration par le bromure d'éthidium.

Par ailleurs, la comparaison des cartes de restriction de *SAS56Bcpgl* et de *T4Bcpgl* révélait 2 sites *Kpn* I supplémentaires (positions 132 et 966) dans la séquence de la souche SAS56. La perte de ces deux sites est confirmée puisque l'enzyme de restriction ne libère que trois fragments (380 pb, 732 pb, 3215 pb) correspondant aux deux sites *Kpn* I de *T4Bcpgl* et au site unique *Kpn* I présent dans la séquence du plasmide (Figure 26 A et B).

3-4-3 Analyses bio-informatiques des caractéristiques de la protéine élicitrice

L'analyse bio-informatique réalisée à partir de la séquence peptidique obtenue après traduction de la séquence nucléotidique a permis d'obtenir des informations complémentaires sur la protéine T4BcPG1.

L'utilisation du logiciel Expasy a permis de connaître la masse moléculaire et le pI théoriques de la protéine. Ainsi, sa masse moléculaire relative serait de 37816 pour le peptide entier, de 35858 si le peptide signal est éliminé et de 33749 si la protéine subit une étape de maturation supplémentaire. Selon ces trois hypothèses, le pI théorique serait respectivement de 8,04, 8,10 et 8,36. Son coefficient d'absorbance molaire à 280 nm serait de 32680 M⁻¹cm⁻¹ (ou 1 unité d'A₂₈₀ équivaut à une concentration de 1,16 mg/mL).

Le logiciel Prosite a permis d'identifier certains motifs (Figure 27) dans la séquence de T4BcPG1 comme celui de la super famille 28 des glycosyl hydrolases (score de 0,267.10⁻⁷) et un site putatif de liaison ATP/GTP (score de 0,157.10⁻³).

Enfin l'utilisation des logiciels Net-O-Glyc et NetPhos a conduit à l'identification (Figure 27) de 6 acides aminés susceptibles d'être O-glycosylés (probabilité supérieure à 0,96) et de 5 acides aminés susceptibles d'être phosphorylés (probabilité supérieure à 0,96).

3-4-4 Analyse du polymorphisme de séquences de *Bcpgl* en fonction des souches de *Botrytis cinerea*

Afin de savoir si la protéine BcPG1 de la souche T4 avait des particularités par rapport à celle d'autres souches de *Botrytis cinerea*, l'analyse du polymorphisme de séquences de l'ADNc *Bcpgl* a été réalisée en collaboration avec le Dr. C. Levis (PMDV, INRA Versailles) chez cinq souches du champignon. La comparaison des séquences de *Bcpgl*, présentée Figure 28, met en

1	MVQLLSMASG	LLALSAIVSA	APAPAPTAA	NPADALAAIE	QRAAACTFSG	SGGAAAASKS	60
61	KTSCATIVLS	ALSVPSGTTL	DLTGLKSGTH	VVFEGTTTFG	YEEWSGPLFS	VSGTDITVTG	120
121	AGSKLDGQG	AKYWDGKGTN	GGKTKPKFFY	AHSLKGKSTI	SGINILNSPV	QVFSINGASG	180
181	LTLSNIHIDN	SAGDAGKLGH	NTDAFDVGSS	SDITISGANV	QNQDDCLAIN	SGTGITFTSG	240
241	TCSGGHGLSI	GSVGGRSNT	VSDIIIESST	VKNSANGVRI	KTVSGATGSV	SGVTYKDITL	300
301	SGITSYGVVV	QQDYKNGSPT	GKPTSGVPIT	DVTFSNVKGT	VSSSATNVYV	LCAKCSGWSW	360
361	DVSVSGGKTS	SKCAGLPSGV	KC*				382

Figure 27 : Analyses bio-informatiques de la séquence de T4BcPG1.

Surligné rouge : acides aminés de la séquence consensus ([GSDENKRH]-X(2)-[VMFC]-X(2)-[GS]-H-G-[LIVMAG]-X(1,2)-[LIVM]-G-S) de la super famille 28 des glycosyl hydrolases. Surligné jaune : acides aminés strictement conservés dans les polygalacturonases microbiennes. Surligné bleu : acides aminés compris dans le motif consensus ([AG]-X(4)-G-K-[ST]) du site de liaison de l'ATP ou du GTP. Coloré en rose : sites de O-glycosylation putatifs (probabilité supérieure à 0,96). Coloré en bleu : site de N-glycosylation putatif défini par Ten Have (1998). Coloré en vert : sites de phosphorylation putatifs (probabilité supérieure à 0,96). Souligné en noir : peptides séquencés par spectrométrie de masse.

évidence 58 mutations entre la séquence T4 et la séquence consensus. Ces mutations au niveau nucléotidique provoquent 24 changements d'acides aminés (sur 382) dans T4BcPG1 par rapport à la protéine BcPG1 consensus. Les séquences *Bcpgl* des souches V940, K1 et 1739 sont très homogènes entre-elles puisqu'il n'existe que trois mutations entre ces séquences ; ces dernières mutations pouvant d'ailleurs être attribuées à des erreurs de séquençage puisque celui-ci n'a été réalisé qu'une fois dans chaque sens pour les souches K1, V940 et 1739. Par ailleurs, la séquence *SAS56Bcpgl* possède 37 mutations par rapport à la séquence consensus, qui se situent essentiellement dans la partie 3' de l'ADNc. Dans cette partie de *SAS56Bcpgl*, les mutations sont souvent les mêmes que celles précédemment observées entre *T4bcpgl* et la séquence consensus.

4 Etudes des réactions de défenses de suspensions cellulaires de vigne activées par l'éliciteur purifié

L'influx de calcium, la production de FAO et l'activation de MAPK sont des événements précoces observés en réponse à des éliciteurs (Nürnberger *et al.*, 1994 ; Tavernier *et al.*, 1995 ; Binet *et al.*, 1998 ; Lebrun-Garcia *et al.*, 1998 ; Mithofer *et al.*, 1999 ; Blume *et al.*, 2000 ; Cardinale *et al.*, 2000 ; Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000 ; Nuhse *et al.*, 2000). L'activation de gènes de défense, la production de phytoalexines et parfois la mort cellulaire sont quant à eux, des événements plus tardifs (Baillieux *et al.*, 1995 ; Côté *et al.*, 1995 ; Dangl *et al.*, 1996 ; Jabs *et al.*, 1997 ; Pontier *et al.*, 1998b ; Dorey *et al.*, 1999). Nous avons donc étudié ces événements dans des cellules de vigne en réponse à l'éliciteur purifié (T4BcPG1). La concentration de l'éliciteur (3 µg/g PFC pour l'étude de la production de FAO et 5 µg/g PFC pour les autres événements) a été choisie en fonction des résultats obtenus lors d'études d'effet dose (§ 5-1-1).

4-1 Influx de calcium

Le calcium est un second messenger majeur et ubiquitaire chez les plantes, impliqué dans une multitude de processus physiologiques comme la croissance, la reproduction et dans les

Figure 28 : Analyse du polymorphisme de séquences du gène *Bcpg1* chez cinq souches de *Botrytis cinerea*. Les mutations par rapport à la séquence consensus (rouge) sont repérées par des couleurs différentes pour chaque souche.

réponses aux stress biotiques et abiotiques (Malho *et al.*, 1998 ; Trewavas et Malho, 1998 ; Camacho *et al.*, 2000). Nous avons donc commencé par étudier l'implication de cet ion dans l'activation des réactions de défenses de cellules de vigne traitées par T4BcPG1. Cette investigation fut menée en ajoutant dans le milieu extra-cellulaire du $^{45}\text{Ca}^{2+}$, utilisé comme traceur (Tavernier *et al.*, 1995).

Les résultats présentés Figure 29 indiquent que T4BcPG1 (5 $\mu\text{g/g}$ PFC) induit un influx de calcium rapide et prolongé dans les cellules de vigne. Après 1 h de traitement, cet influx de calcium atteint 420 ($\pm$ 50) nmoles/g PFC. Dans les cellules témoins, aucun influx de calcium n'est détecté pendant la durée de l'expérience.

L'EGTA (3 mM) est un chélateur de cations divalents, non perméant. Sa présence dans le milieu extra-cellulaire, en co-traitement avec T4BcPG1 (5 $\mu\text{g/g}$ PFC), supprime l'influx de calcium dans les cellules de vigne (Figure 29).

4-2 Variation de la concentration cytosolique en calcium libre

L'étude précédente a permis de mettre en évidence, en utilisant le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ comme traceur, un influx important et continu de Ca^{2+} dans les cellules de vigne en réponse à T4BcPG1. Cependant, la technique utilisée ne pouvait pas rendre compte du devenir du Ca^{2+} dans les cellules. Or, le calcium efficace en tant que second messenger est le Ca^{2+} libre, il devenait donc important de connaître la concentration cytosolique en calcium libre ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) au cours du traitement. Pour ce faire, nous avons déterminé les variations de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ induites par T4BcPG1 en utilisant des cellules de vigne exprimant l'apoequorine dans le cytosol. L'expression du gène codant l'apoequorine, une protéine de méduse (*Aequorea victoria*), dans le cytoplasme des cellules végétales a permis la description de nombreuses signatures Ca^{2+} en réponse à différents stress (Knight *et al.*, 1991). Après reconstitution avec la coelentérazine (un luminophore hydrophobe), l'aequorine se comporte comme un indicateur bioluminescent et permet de rendre compte précisément des variations de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. En effet, l'aequorine reconstituée peut fixer, avec une grande spécificité mais une faible affinité, jusqu'à 4 atomes de Ca^{2+} par molécule. L'interaction du Ca^{2+} avec l'aequorine induit alors un changement conformationnel du complexe avec pour conséquence une oxydation de la coelentérazine qui s'accompagne d'une émission de

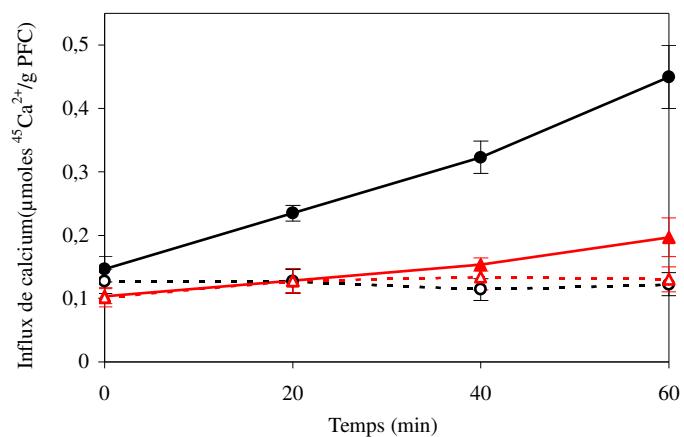


Figure 29 : Influx de calcium induit par T4BcPG1 dans les cellules de vigne.

Cinétique de l'influx de calcium dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1 (5 μg/g PFC ; ●) ou co-traitées par T4BcPG1 (5 μg/g PFC) et l'EGTA 3 mM (▲). Cellules témoins traitées avec le DMSO 0,1% (○), ou l'EGTA 3 mM (△). Pour le co-traitement, l'inhibiteur est ajouté à la suspension cellulaire 5 min avant T4BcPG1. Le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0,033 MBq/g PFC) est ajouté 5 min avant l'éliciteur.

luminescence (Figure 14). L'intensité de bioluminescence émise est proportionnelle à la concentration en Ca^{2+} libre dans le compartiment cellulaire où est localisée l'aequorine (Allen *et al.*, 1977).

Des cellules de vigne exprimant l'apoequorine dans le cytoplasme ont été obtenues au laboratoire par transformation génétique avec *Agrobacterium tumefaciens* en utilisant la construction MAQ 2.4 provenant du Dr. H. Knight et fournie au laboratoire par le Dr. D. Lecourieux. Cette construction MAQ 2.4 a été la première utilisée pour mettre en évidence des variations de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ en réponse à différents *stimuli* chez les plantes (Knight *et al.*, 1991). Avec cette construction apoequorine, Knight *et al.* (1991) ont montré que plus de 97% de l'aequorine reconstituée était contenue dans le cytoplasme des cellules transformées.

Aussi, nous avons commencé par vérifier que les cellules transformées de vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay) en suspension exprimaient une aequorine fonctionnelle avant d'étudier les variations de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ dans ces cellules traitées par l'éliciteur purifié T4BcPG1.

4-2-1 Obtention de cellules de vigne exprimant l'apoequorine

Après la transformation de la souche sauvage EHA 105 d'*Agrobacterium tumefaciens* avec un vecteur binaire (pBIN19) contenant le gène codant pour l'apoequorine cytosolique (Matériels et Méthodes, § 4-1), la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* a été utilisée pour transformer des cellules de vigne *Vitis vinifera* cv Gamay. Après trois cultures sur milieu sélectif (Matériels et méthodes § 4-3), les cals qui se sont développés ont été considérés comme constitués de cellules transformées (Figure 30 A). A l'issue de la dernière étape de sélection, une vingtaine de cals de vigne régénérés a été analysée par PCR en utilisant comme amorces des oligonucléotides des deux extrémités du gène de l'apoequorine (Matériels et méthodes § 4-3-1). Les résultats de cette analyse, présentés Figure 30 B, indiquent d'une part que les oligonucléotides utilisés sont spécifiques car avec l'ADN génomique d'un cal de vigne non transformée aucun produit de PCR n'est détectable (piste NT), et d'autre part que tous les cals régénérés testés contiennent le gène codant l'apoequorine cytosolique puisque, après PCR, une bande est toujours visible à la taille attendue (650 pb). Des suspensions cellulaires de cinq de ces lignées ont alors été initiées. Puis, nous avons commencé par vérifier la fonctionnalité de

A



Transformés

Témoins non transformés

B

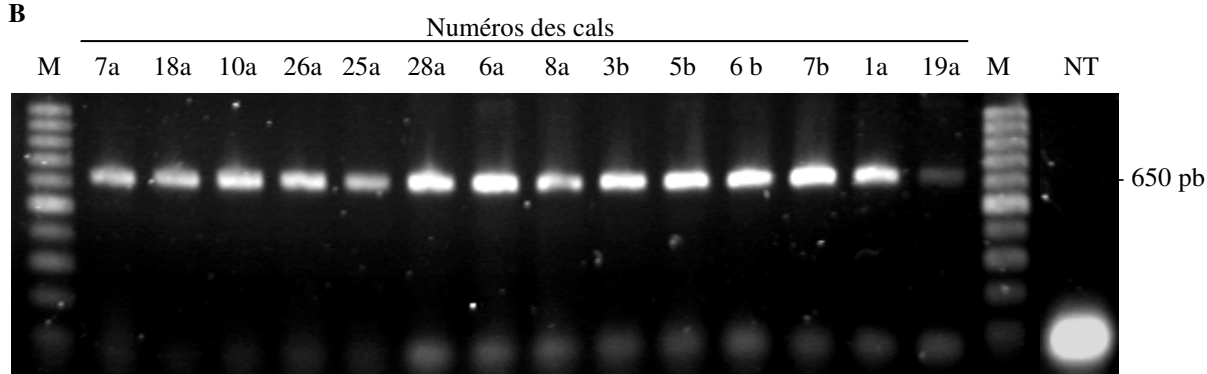


Figure 30 : Obtention de cellules de vigne exprimant le gène codant l'apoeaquorine cytosolique.

A, Sélection des cals transformés sur milieu gélosé Nitsch-Nitsch contenant l'antibiotique de sélection (paromomycine 100 µg/mL). **B**, Criblage des transformants par PCR avec des oligonucléotides de l'apoeaquorine ; la taille du fragment attendu est de 650 pb. M : marqueur de tailles. NT : témoin non transformé.

l'aequorine cytosolique. Après reconstitution en présence de son co-facteur (coelentérazine 3 μM), les cellules ont été lysées en présence d'une concentration saturante en calcium (10 mM). Lors de cette lyse, l'émission immédiate d'une forte bioluminescence pour chacune des cinq lignées a révélé l'existence d'une aequorine fonctionnelle. Quatre de ces lignées (25a, 18a, 10a et 6b) ont émis une bioluminescence d'intensité comparable ($3,7 \cdot 10^6$ rlu/g PFC) alors que la lignée 19a a révélé une luminescence beaucoup plus faible ($58,8 \cdot 10^3$ rlu/g PFC). L'étude des variations de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1 fut alors entreprise.

4-2-2 Variations de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ dans des cellules de vigne en réponse à T4BcPG1

Les mesures de la bioluminescence émise dans les cellules de vigne non traitées révèlent, après calibration, une concentration basale en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ d'environ 100 nM (Figure 31 A). Cette valeur est en accord avec les concentrations en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ décrites dans les cellules végétales (Bush, 1993 ; Bush, 1995 ; Reddy, 2001).

Dans les cellules de vigne traitées par T4BcPG1 (5 $\mu\text{g/g}$ PFC), un temps de latence de 60 à 90 s précède une rapide élévation de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ atteignant 1,3 μM après 5 min de traitement. Cette première élévation est parfois suivie d'un second pic entre 20 et 25 min (1 μM), puis la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ descend progressivement mais sans retrouver la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ basale après 1 h de traitement (Figure 31 A). Néanmoins, il existe toujours une élévation prolongée de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$.

4-2-3 Mobilisation du calcium extra-cellulaire lors de l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ en réponse à T4BcPG1

Les résultats précédemment obtenus en utilisant le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (§ 4-1-1) montrent que T4BcPG1 induit un rapide influx de Ca^{2+} depuis le milieu extra-cellulaire dans les cellules de vigne. Dans de nombreux mécanismes de signalisation, les signatures $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ observées résulteraient d'un influx de Ca^{2+} extra-cellulaire couplé à un efflux de Ca^{2+} des compartiments intra-cellulaires (Knight *et al.*, 1996 ; Knight *et al.*, 1997).

Nous avons ainsi vérifié l'implication du Ca^{2+} extra-cellulaire dans les modifications de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Un pré-traitement des cellules de vigne avec un chélateur de Ca^{2+} , l'EGTA (3 mM), supprime complètement les élévations de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ induites par T4BcPG1 (Figure 31 A). Des

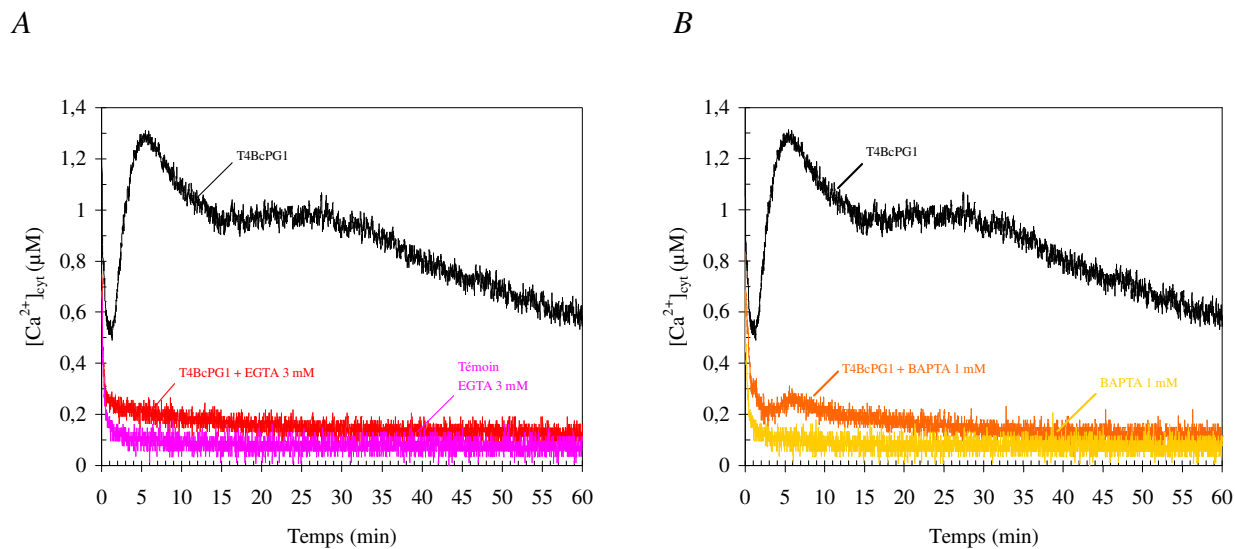


Figure 31 : Variations de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dans les cellules de vigne en réponse à T4BcPG1.

A-B, cinétique des variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dans des cellules de vigne témoin ou traitées par T4BcPG1 (5 $\mu g/g$ PFC), l'EGTA (3 mM), le BAPTA (1 mM), ou co-traitées par T4BcPG1 (5 $\mu g/g$ PFC) et l'EGTA (3 mM) ou T4BcPG1 (5 $\mu g/g$ PFC) et le BAPTA (1 mM).

résultats similaires ont été obtenus avec le BAPTA (1 mM), un autre chélateur de calcium (Figure 31 B). Ces résultats indiquent que l'influx de Ca^{2+} dans les cellules de vigne traitées par T4BcPG1 est en premier lieu à l'origine des variations de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$.

4-3 Production de FAO

Des suspensions cellulaires de vigne traitées par T4BcPG1 (5 $\mu\text{g/g}$ PFC) produisent rapidement de l' H_2O_2 (Figure 32). Cette production dure pendant 90 min, avec un maximum après 20 min de traitement (750 ± 60 nmoles/g PFC).

Le pré-traitement des suspensions cellulaires avec le diphénylène iodonium (DPI, 10 μM) inhibe totalement le burst oxydatif induit par T4BcPG1 pendant les 90 min de l'expérience.

4-4 Activation de MAPK

Les résultats de l'étude des réactions de défense activées dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par des filtrats de culture pré-purifiés de *Botrytis cinerea* avait montré l'activation de deux protéines kinases (§ 2-2-3). Dans un premier temps, nous avons vérifié que ces protéines kinases étaient activées par l'éliciteur purifié avant de les caractériser dans un deuxième temps.

4-4-1 Cinétique d'activation de protéines kinases

La première technique utilisée pour mettre en évidence l'activation de protéines kinases fut l'essai kinase en gel en utilisant la MBP (myelin basic protein) comme protéine substrat phosphorylable.

Les cellules de vigne ont été traitées par T4BcPG1 (5 $\mu\text{g/g}$ PFC) et des extraits de protéines totales ont été obtenus à différents temps de traitement. Les résultats de l'essai kinase en gel révèlent que le traitement par l'éliciteur purifié induit l'activation de deux protéines kinases dans les cellules de vigne, avec des masses moléculaires apparentes de 45 et 49 kD (Figure 33 A). Cette activation est maximale après 5 min de traitement puis décroît progressivement pour revenir au niveau de base des cellules témoins au-delà de 60 min. L'activation de ces deux protéines kinases semble durer plus longtemps dans des cellules traitées par l'éliciteur purifié

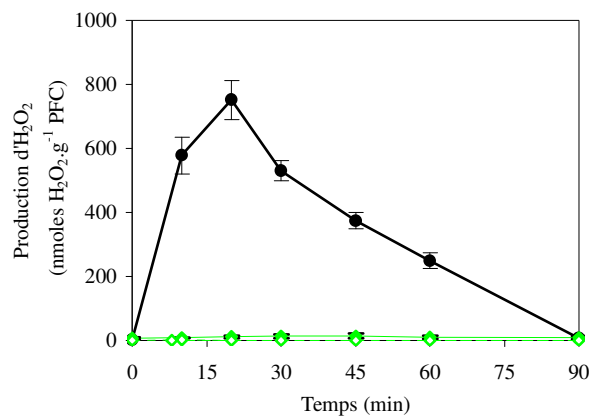


Figure 32 : Production d'H₂O₂ dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par T4BcPG1.

Cinétique de production de H₂O₂ dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1 (3 µg/g PFC ; ●) ou co-traitées par T4BcPG1 (3 µg/g PFC) et le DPI 10 µM (◊). Cellules témoins traitées par le DMSO 0,1% (○), ou le DPI 10 µM (◊). L'inhibiteur est ajouté 5 min avant le traitement par T4BcPG1. La production d'H₂O₂ est déterminée par la mesure de la chimio-luminescence du luminol. La luminescence est mesurée pendant 10 s, intégrée puis convertie en nmoles d'H₂O₂/g PFC grâce à une gamme étalon.

que lorsque les cellules sont traitées par le filtrat de culture pré-purifié de T4 (Figure 17 C). Cette différence est vraisemblablement due à une différence de concentration en éliciteur.

4-4-2 Les protéines kinases activées sont des homologues de ERK1/2

L'identification de ces protéines kinases s'est poursuivie en utilisant un anticorps dirigé contre les 2 MAPK (mitogen activated protein kinase) humaines inactives ERK1/2. La Figure 33 B fait apparaître deux MAPK ayant des masses moléculaires apparentes de 45 et 49 kD. Ces homologues de ERK1/2 chez la vigne, sont présentes à la fois dans les extraits protéiques des cellules témoins et des cellules traitées par T4BcPG1. Leur quantité ne varie pas durant cette première heure d'expérience.

Le même western blot a été réalisé en utilisant un anticorps dirigé contre un peptide synthétique, contenant les résidus Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ phosphorylés des MAPK humaines ERK1/2, révélant donc les MAPK activées. Ce western blot (Figure 33 C) met en évidence la présence des deux homologues de ERK1/2 activés chez la vigne (de masse moléculaire apparente de 45 et 49 kD respectivement), uniquement dans les extraits protéiques provenant de cellules traitées par T4BcPG1. L'activation de ces deux MAPK, dans les cellules traitées par l'éliciteur, est visible dès 5 min de traitement. Elle est maximale après 15 min puis décroît progressivement pour revenir au niveau d'activation des protéines kinases dans les cellules témoins, après 60 min de traitement.

Cependant des différences existent dans la cinétique d'activation des 2 protéines kinases selon que l'activité est révélée par essai kinase en gel (Figure 33 A) ou par western blot (Figure 33 C) puisque le maximum est atteint après 5 ou 15 min de traitement en fonction de la technique utilisée. Ceci laisse à penser que, bien que les tailles apparentes des protéines kinases activées détectées par les deux méthodes soient identiques, il pourrait y avoir, au niveau de chaque bande, plusieurs protéines kinases activées autres que des MAPK ou des MAPK avec des affinités plus ou moins grandes pour l'anticorps.

La staurosporine (2 μ M en co-traitement avec T4BcPG1) inhibe l'activation des deux homologues de ERK1/2 provoquée après 15 min de traitement des cellules de vigne par T4BcPG1 (5 μ g/g PFC ; Figure 33 D).

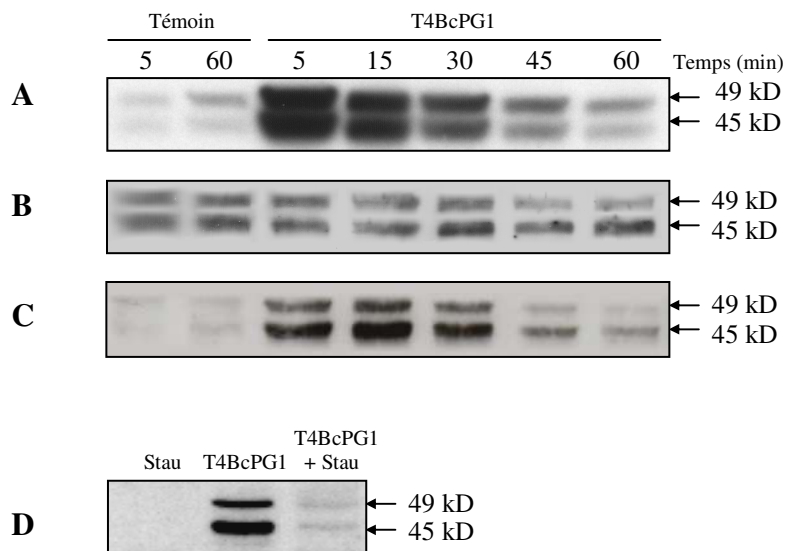


Figure 33 : Activation de deux MAPK dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1.

A-C, cinétique d'activation des MAPK dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1 (5 µg/g PFC). **A**, essai kinase en gel avec la protéine basique de myéline comme substrat. **B**, analyse des MAPK totales par western blot réalisé avec un anticorps dirigé contre les MAPK inactives humaines ERK1/2. **C**, analyse des MAPK activées par western blot avec un anticorps dirigé contre un peptide synthétique comprenant les résidus phosphorylés Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ des MAPK actives humaines ERK1/2. **D**, effets de la staurosporine 2 µM sur l'activation des MAPK de vigne. L'activation des MAPK, 15 min après addition de T4BcPG1 (5µg/g PFC), est analysée par western blot en utilisant l'anticorps dirigé contre les MAPK activées. Les protéines (15 µg) de cellules de vigne sont séparées par SDS-PAGE avant l'analyse par essai kinase en gel ou western blot.

4-5 Relations entre influx de calcium, production de FAO et activation des MAPK

L'investigation des relations existant entre ces divers événements a été réalisée par une approche pharmacologique. Après des essais préliminaires, le choix des inhibiteurs et de leurs concentrations a été établi en fonction de leur spécificité vis à vis d'un événement donné et de leur faible toxicité mesurée après 4 et 24 h de traitement (résultats non présentés). Leur emploi fut volontairement limité à l'étude des événements précoces (pendant la première heure d'expérience) pour éviter d'interférer avec d'autres processus physiologiques de la cellule et limiter les risques de toxicité.

4-5-1 Effets de la phosphorylation de protéines et de la production de FAO sur l'influx de calcium induit par T4BcPG1

L'utilisation de la staurosporine, un inhibiteur de sérine/thréonine protéines kinases, permet de mesurer l'incidence de ce type de protéines kinases sur un autre événement comme l'influx de calcium. Utilisée seule, la staurosporine (2 μ M) n'induit aucun influx de calcium dans les cellules de vigne mais, en co-traitement avec T4BcPG1 (5 μ g/g PFC), elle augmente l'influx de calcium pendant les 40 premières minutes de traitement (Figure 34).

Le DPI (10 μ M), un inhibiteur de la NADPH-oxydase des mammifères impliquée dans la production de FAO chez les neutrophiles (Lamb et Dixon, 1997), ne modifie pas l'influx de calcium provoqué par T4BcPG1 (5 μ g/g PFC ; Figure 34).

L'ensemble de ces résultats montre donc que l'influx de calcium dans les cellules de vigne traitées par T4BcPG1 semble indépendant de la production de FAO. De plus l'activation de MAPK, inhibée par la staurosporine, n'est pas en amont de l'influx de calcium. Par contre, les résultats obtenus en présence de staurosporine suggèrent par exemple une régulation négative de l'influx de calcium par une sérine/thréonine protéine kinase.

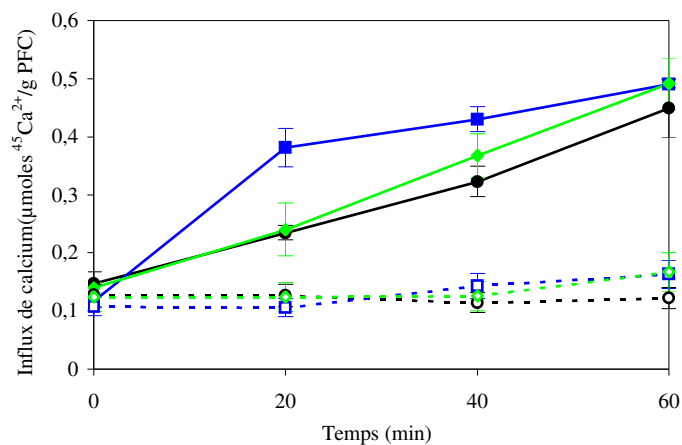


Figure 34 : Effets de la production de FAO et de la phosphorylation de protéines sur l'influx de calcium induit par T4BcPG1 dans les cellules de vigne.

Cinétique de l'influx de calcium dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1 (5 $\mu\text{g/g}$ PFC ;—●—) ou co-traitées par T4BcPG1 (5 $\mu\text{g/g}$ PFC) et, le DPI 10 μM (—◆—) ou la staurosporine 2 μM (—■—). Cellules témoins traitées avec le DMSO 0,1% (---○---), le DPI 10 μM (---◇---) ou la staurosporine 2 μM (---□---). Pour les co-traitements, les inhibiteurs sont ajoutés à la suspension cellulaire 5 min avant T4BcPG1. L'influx de calcium est mesuré par l'incorporation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0,033 MBq/g PFC) ajouté 5 min avant l'éliciteur.

4-5-2 Effets de la production de FAO et de la phosphorylation de protéines sur les variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ induites par T4BcPG1

Utilisé en co-traitement avec T4BcPG1 (5 μ g/g PFC), le DPI (10 μ M) modifie légèrement la signature calcique obtenue avec T4BcPG1 (Figure 35 A). La présence de DPI se traduit par une légère diminution de la première élévation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ entre 1 et 10 min (pic à 1,1 μ M à 3 min) et une légère augmentation de la seconde phase entre 10 et 35 min avant de revenir progressivement à la même variation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ que T4BcPG1 en fin d'expérience (entre 45 et 60 min). Par ailleurs, le DPI (10 μ M), utilisé seul, est sans effet sur la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dans les cellules témoins (Figure 35 A). Bien que l'influx de calcium extra-cellulaire induit par T4BcPG1 ne soit pas affecté par les FAO produites (§ 4-5-1, Figure 29), il semble que celles-ci auraient une légère incidence sur la $[Ca^{2+}]_{cyt}$.

La staurosporine (2 μ M) ajoutée seule à des suspensions cellulaires de vigne provoque une augmentation stable de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ qui passe de 100 nM dans les cellules témoins (Figure 31 A), à 200 - 250 nM dans les cellules traitées (Figure 35 B). Les résultats de la Figure 35 B indiquent également que la staurosporine (2 μ M) modifie la signature calcique induite par T4BcPG1 puisque le premier pic de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (de 1 à 10 min) est diminué (de 1,3 μ M à 1,0 μ M, à 4 min) alors que la seconde phase augmente à la fois en durée et en intensité. Le pic situé entre 20 et 25 min passe de 1,0 μ M à 1,4 μ M. Ici encore, les résultats obtenus pour les concentrations de calcium libre dans le cytosol corroborent ceux obtenus pour l'influx de calcium mesuré par la méthode au $^{45}Ca^{2+}$ puisque l'influx de calcium induit par T4BcPG1 était plus important en présence de staurosporine comparé à T4BcPG1 seule (§ 4-5-1, Figure 34). Ces résultats soulignent le rôle des protéines kinases dans le contrôle de l'homéostasie du calcium cellulaire.

4-5-3 La production de FAO induite par T4BcPG1 dépend d'un influx de calcium et de l'activité de protéines kinases

La staurosporine (2 μ M) et l'EGTA (3 mM) inhibent totalement la production de FAO provoquée par T4BcPG1 (5 μ g/g PFC) pendant les 90 min de l'expérience (résultats non présentés). Ces résultats mettent en évidence l'implication du calcium et de sérine/thréonine

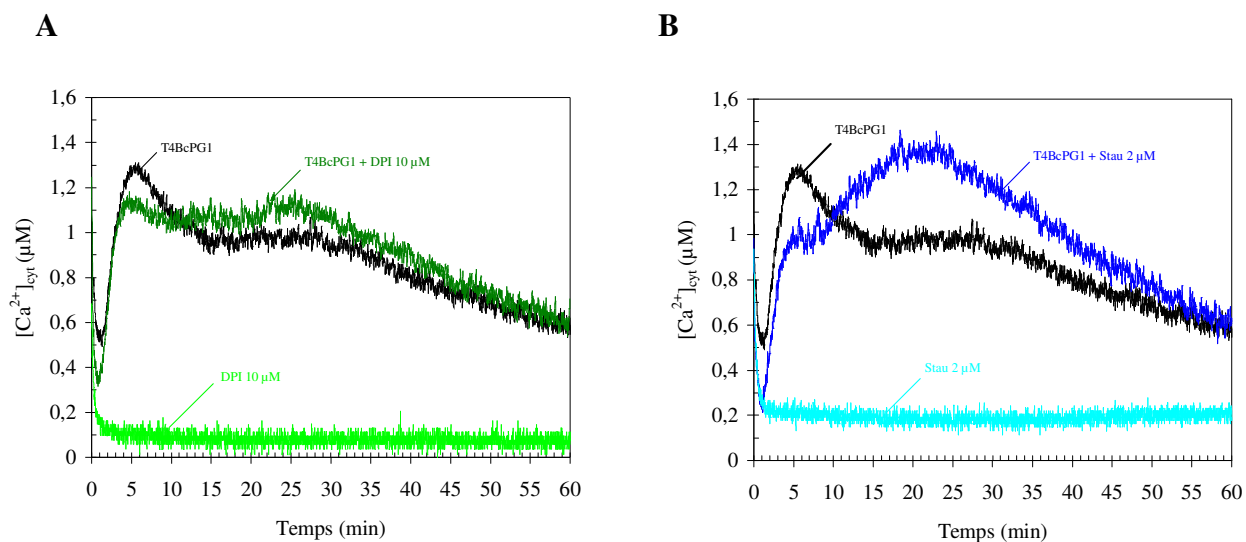


Figure 35 : Effets de la production de FAO et de la phosphorylation de protéines sur les variations de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dans les cellules de vigne traitées par T4BcPG1.

A-B, cinétique des variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1 (5 $\mu g/g$ PFC), le DPI (10 μM) ou la staurosporine (2 μM), ou co-traitées par T4BcPG1 (5 $\mu g/g$ PFC) et, le DPI (10 μM) ou la staurosporine (2 μM). L'aequorine est reconstituée en incubant des cellules de vigne exprimant l'apoequorine dans le cytosol en présence de coelentératine (3 μM).

protéines kinases en amont de la production de FAO dans les cellules de vigne traitées par T4BcPG1. Par contre, ils ne permettent pas de conclure que l'activation des MAPK est en amont de la production de FAO puisqu'il existe des sérine/thréonine protéines kinases indépendantes des modules MAPK.

4-5-4 L'activation des MAPK induite par T4BcPG1 est indépendante de la production de FAO et de l'influx de calcium

Ni la chélation du calcium extra-cellulaire (EGTA 3 mM), ni l'inhibition de la production de FAO (DPI 10 μ M) ne modifient l'activation des deux MAPK induite par T4BcPG1 (Figure 36). Le DMSO, le DPI ou l'EGTA n'activent pas les MAPK dans les cellules témoins.

Ces résultats indiquent que l'activation de ces deux MAPK est indépendante d'un influx de calcium extra-cellulaire et de la production de FAO dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1.

4-6 Cinétique d'expression de gènes de défense

Les cellules de vigne, traitées ou non par T4BcPG1 (5 μ g/g PFC), ont été prélevées à différents temps et les ARNm extraits. L'accumulation des transcrits de gènes de défense a ensuite été analysée par PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq) d'une part, et par northern blots d'autre part. La comparaison des résultats obtenus par ces deux techniques a pour but de valider l'utilisation de la RT-PCRq dans nos conditions expérimentales. Puis, nous avons analysé le taux de transcrits de 7 gènes de défense appartenant, pour la plupart, à des familles différentes. Cette étude, réalisée en collaboration avec les Drs. A. Aziz et F. Baillieul (Université de Reims) a porté sur les gènes dont les produits correspondent à :

- la lipoxgénase (*LOX3*) dont certaines isoformes sont impliquées dans la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique (Weber, 2002),
- la glutathion-S-transférase (*GST*), enzyme ayant des propriétés anti-oxydantes (Levine *et al.*, 1994),
- la stilbène synthase (*VST1*), enzyme produisant la principale phytoalexine de la vigne : le trans-resvératrol (Hain *et al.*, 1993),

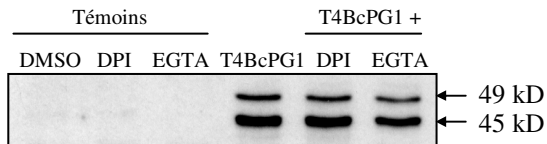


Figure 36 : Effets de la production de FAO et de l'influx de calcium sur l'activation de MAPK dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1.

Effets du DPI (10 μ M) et de l'EGTA (3 mM) sur l'activation des MAPK de vigne, 15 min après addition de T4BcPG1 (5 μ g/g PFC). L'activation des MAPK est analysée par western blot en utilisant l'anticorps dirigé contre les MAPK humaines activées. Les extraits protéiques (15 μ g) sont séparés par SDS PAGE avant transfert sur membrane.

- la protéine inhibitrice de polygalacturonases (*PGIP*), capable, chez *Phaseolus vulgaris*, de bloquer spécifiquement l'activité enzymatique de certaines polygalacturonases microbiennes (De Lorenzo et Ferrari, 2002),
- la β -1,3-glucanase (*GLU1*), protéine PR-2 qui peut hydrolyser les polymères de β -1,3-glucanes notamment présents dans la paroi de certains champignons (Derckel *et al.*, 1998),
- la chitinase 1 basique (*CHIT1b*), protéine PR-3, capable d'hydrolyser la chitine synthétisée par certains micro-organismes (Fritig *et al.*, 1998),
- la chitinase 3 (*CHIT3*), protéine PR-8 possédant une activité lysozyme élevée (Brunner *et al.*, 1998).

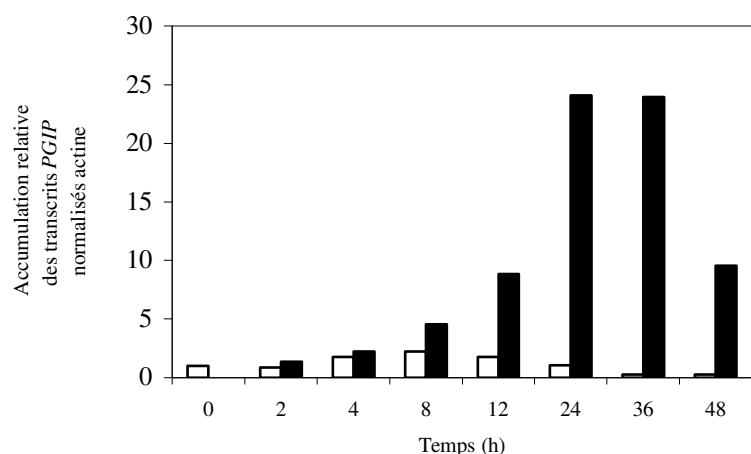
4-6-1 Comparaison des méthodes de RT-PCRq et de northern blot pour analyser l'accumulation de transcrits des gènes de défense

L'analyse de l'expression du gène *PGIP* par RT-PCRq (Figure 37 A) dans les cellules de vigne traitées par T4BcPG1 (5 μ g/g PFC) met en évidence une accumulation des transcrits qui augmente progressivement à partir de 8 h de traitement, atteint un maximum entre 24 h et 36 h (le rapport ADNc *PGIP* / ADNc *Actine* dans les cellules traitées à 36 h, est 24 fois plus élevé que ce même rapport, arbitrairement fixé à 1, dans les cellules témoins à 0 h : T_{0h}), puis décroît entre 36 h et 48 h. Dans les cellules témoins, l'accumulation des transcrits *PGIP* reste quasiment constante, à un très faible niveau, durant toute la cinétique. Une légère augmentation (d'environ 2 fois le rapport existant dans les cellules T_{0h}) est cependant mesurable à 4 h et 8 h après le début de l'expérience.

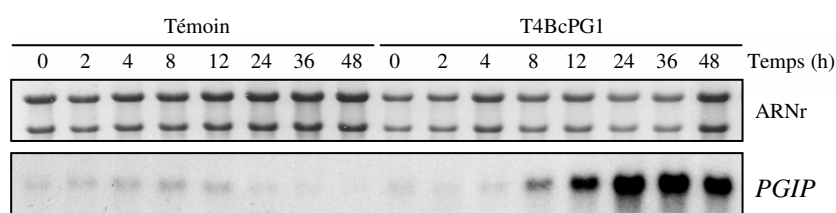
Cette même analyse réalisée par northern blot est présentée Figure 37 B. Les ARNm du gène *PGIP* s'accumulent dans les cellules de vigne traitées par T4BcPG1 (5 μ g/g PFC), dès 8 h de traitement, parviennent à un maximum entre 24 h et 36 h, puis diminuent entre 36 h et 48 h. Dans les cellules témoins, une faible accumulation des ARNm est visible entre 4 h et 12 h après le début de l'expérience.

La comparaison des données obtenues par ces deux méthodes met en évidence une bonne adéquation des résultats. De plus, l'étude de l'expression d'un autre gène de défense (*VST1*) par ces deux techniques a également montré que la RT-PCRq et l'analyse par northern blot

A



B



C

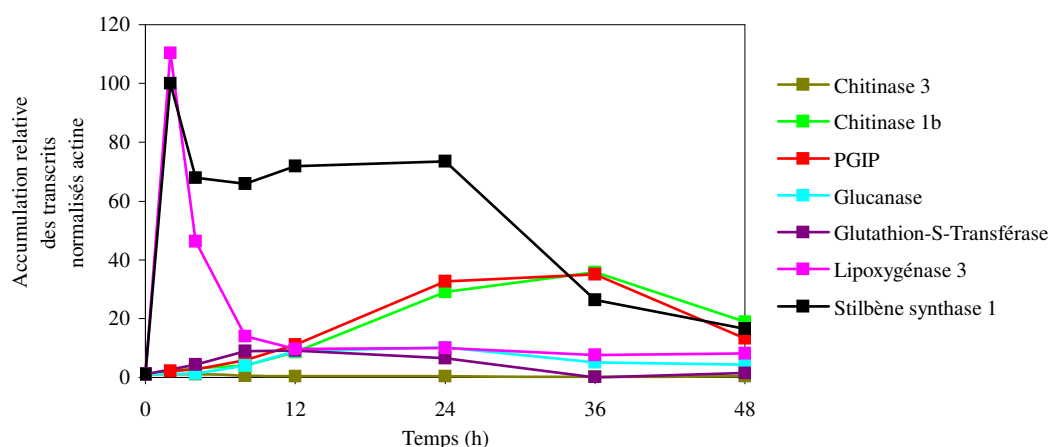


Figure 37 : Cinétique de l'expression de gènes de défense dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1.

A-B, comparaison des résultats obtenus par RT-PCR quantitative (**A**) et northern blot (**B**) pour le gène *PGIP*. **A**, cinétique d'accumulation des transcrits du gène *PGIP* dans des cellules de vigne témoins (□) ou traitées (■) par T4BcPG1 (5 µg/g PFC). Pour chaque échantillon, la quantité d'ADNc du gène *PGIP* est rapportée à celle du gène de l'actine puis ce rapport est exprimé en fonction de celui existant dans les cellules témoins au temps 0 (T_{0h}), taux dont la valeur est arbitrairement fixée à 1. **B**, aux temps indiqués, les ARN ont été extraits et analysés par northern blot en utilisant comme sonde l'ADNc *PGIP*. Les ARNr sont indiqués comme témoin de charge pour chaque piste. **C**, analyse de la cinétique d'expression de divers gènes de défense par RT-PCR quantitative dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1 (5 µg/g PFC). Pour chaque échantillon, la quantité d'ADNc d'un gène de défense est rapportée à celle de l'actine puis ce rapport est exprimé en fonction de celui existant dans les cellules témoins au temps 0 (T_{0h}) et dont la valeur est arbitrairement fixée à 1.

permettent d'obtenir des résultats identiques (Figures 37 C et 41 A). Par conséquent, l'utilisation de la RT-PCRq est validée pour notre modèle d'étude.

4-6-2 Analyse de l'expression de gènes de défenses par RT-PCRq

L'étude de l'expression de 7 gènes de défense par RT-PCRq a été réalisée à l'Université de Reims. Cette analyse a porté sur 8 temps de traitement des cellules par T4BcPG1 mais seulement sur trois temps pour les cellules témoins (0 h, 24 h et 48 h). Les résultats présentés Figure 37 C concernent uniquement les cellules traitées par l'éliciteur purifié. L'analyse de l'expression des 7 gènes de défense dans les cellules témoins a toujours révélé une stabilité du taux de transcrits aux temps 0 h, 24 h et 48 h et un niveau bas.

T4BcPG1 (5 µg/g PFC) induit l'expression de six des sept gènes de défense étudiés (Figure 37 C). Seuls les transcrits de la Chitinase 3 restent à leur niveau de base pendant les 48 h de traitement.

Les transcrits *LOX3* et *VST1* s'accumulent fortement (respectivement 110 et 100 fois le taux d'ADNc présents dans les cellules T_{0h}) et rapidement, dès 2 h de traitement. Leur cinétique d'accumulation se différencie au-delà de 4 h de traitement : le taux de transcrits du gène *LOX3* décroît fortement entre 2 h et 8 h puis se stabilise à un faible niveau (~ 8 fois le taux d'ADNc présents dans les cellules T_{0h}) jusqu'à 48 h. Le taux de transcrits du gène *VST1* est stable à un niveau élevé (~ 70 fois le taux d'ADNc présents dans les cellules T_{0h}), entre 4 h et 24 h de traitement, puis diminue progressivement entre 24 h et 48 h.

Le taux de transcrits des gènes *CHIT1b* et *PGIP* s'accroît progressivement entre 8 et 24 h de traitement, se stabilise entre 24 et 36 h à un niveau relativement élevé (~ 30 fois le taux d'ADNc présents dans les cellules T_{0h}), puis décline en fin de cinétique (~ 17 fois le taux d'ADNc présents dans les cellules T_{0h}), à 48 h.

L'accumulation des transcrits *GST* augmente progressivement entre 2 et 8 h de traitement, s'équilibre entre 8 et 12 h à un taux peu élevé (10 fois le taux d'ADNc présents dans les cellules T_{0h}), diminue de 12 à 36 h de traitement, avant de revenir au niveau basal entre 36 et 48 h.

Enfin, le taux de transcrits du gène codant la β-1,3-glucanase (*GLU1*), s'amplifie entre 4 et 12 h de traitement, atteint un plateau de 12 à 24 h après le début de l'expérience (10 fois le taux

d'ADNc présents dans les cellules T_{0h}), puis s'atténue progressivement jusqu'à la fin de la cinétique.

Mis en commun, ces résultats prouvent que T4BcPG1 induit, dans les cellules de vigne en suspension, l'expression de 6 gènes de défense appartenant à des classes différentes.

4-7 Production de phytoalexines

La synthèse des phytoalexines est une réaction de défense caractéristique des plantes. Les phytoalexines de la vigne appartiennent à la famille des stilbènes. Ce sont des phénylpropanoïdes qui dérivent tous du trans-resvératrol, première phytoalexine de la vigne identifiée (Langcake et Pryce, 1976). Il nous est apparu important de vérifier si la surexpression de la stilbène synthase se traduisait par la synthèse de ces métabolites dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par T4BcPG1.

Des aliquotes de suspensions cellulaires de vigne ont été prélevées durant les 48 h suivant le traitement par T4BcPG1 (5 $\mu\text{g/g}$ PFC). Les cellules ont été séparées du milieu de culture par filtration sous vide, puis l'extraction des phytoalexines a été réalisée sur la fraction cellulaire et sur le surnageant. Finalement, les phytoalexines ont été quantifiées par HPLC, en collaboration avec le Dr. M. Adrian (IUVV, Dijon). Par cette méthode, le resvératrol, l' ϵ -viniférine, le ptérostilbène et le picéide sont quantifiables. Le ptérostilbène et le picéide n'ont jamais été détectés dans aucun des échantillons provenant aussi bien du milieu de culture que des cellules (traitées ou témoins). Il est possible que ces composés ne soient pas synthétisés, soient rapidement métabolisés ou que leur quantité soit insuffisante pour être détectée en HPLC.

Le trans-resvératrol s'accumule dans le milieu de culture des cellules de vigne traitées par T4BcPG1, à partir de 12 h de traitement, atteint un maximum à 24 h ($16,3 \pm 1,3$ $\mu\text{g/g}$ PFC), avant de disparaître progressivement jusqu'à 48 h (Figure 38 A). Il est à noter qu'une très faible quantité de trans-resvératrol ($1,25 \pm 0,25$ $\mu\text{g/g}$ PFC) est également détectée dans le milieu de culture des cellules témoins à 24 h. L' ϵ -viniférine est également détectée en faible quantité dans le milieu de culture de cellules de vigne traitées par T4BcPG1. Cette quantité est maximale 24 h après le début de l'expérience ($2,9 \pm 0,8$ $\mu\text{g/g}$ PFC), avant de décroître lentement jusqu'à 48 h.

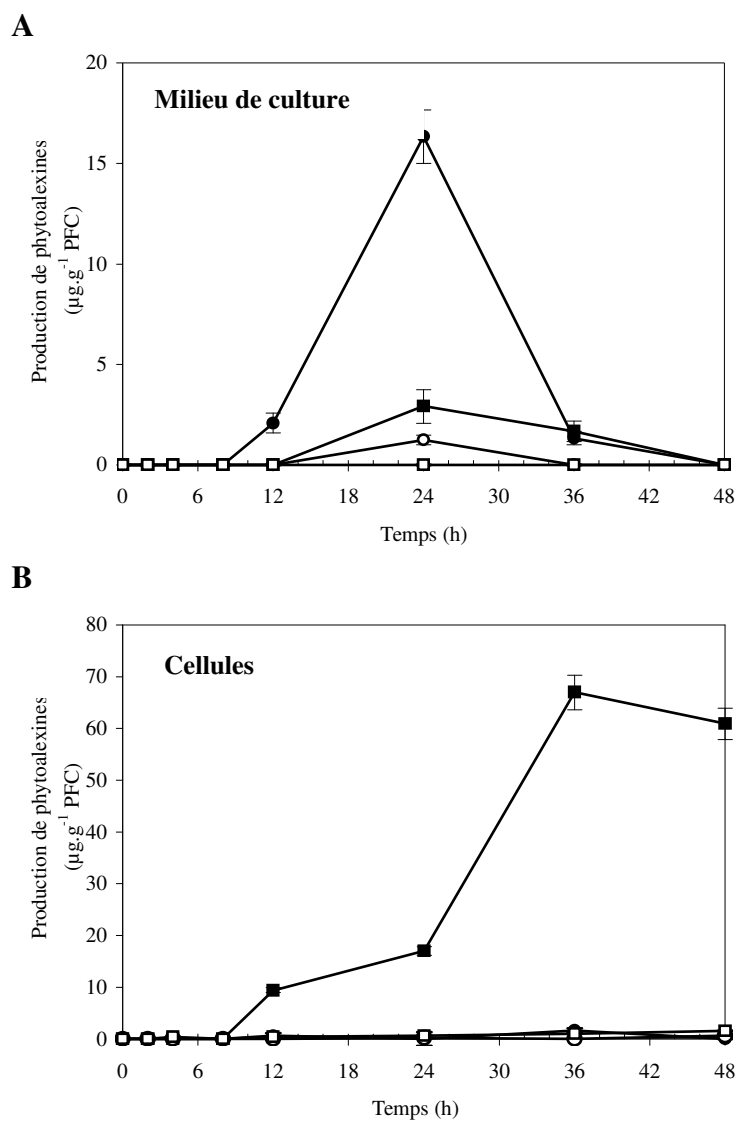


Figure 38 : Cinétique de production des phytoalexines par des cellules de vigne traitées par T4BcPG1.

Quantification du trans-revératrol (● ; ○) et de l'ε-viniférine (■ ; □) dans le milieu extra-cellulaire (A) et dans les cellules (B) de vigne non traitées (blanc) ou traitées par T4BcPG1 (5 µg/g PFC ; noir).

Dans la fraction cellulaire (Figure 38 B), seule l' ϵ -viniférine est détectée. Son accumulation est quantifiable à partir de 12 h de traitement ($9,4 \pm 0,9 \mu\text{g/g PFC}$), augmente peu à peu de 12 à 36 h puis se stabilise de 36 à 48 h après le début de l'expérience (à environ $65 \mu\text{g/g PFC}$).

Les résultats présentés ici confirment ceux de l'analyse de l'expression des gènes de défense puisque les transcrits de *VST1* s'accumulent dès 4 h de traitement par T4BcPG1 et sont stables jusqu'à 36 h avant de diminuer (Figure 37 C). Par ailleurs l'analyse séparée des cellules et du milieu de culture nous a permis de mettre en évidence la présence essentiellement extra-cellulaire du trans-resvératrol alors que l' ϵ -viniférine se concentre dans la fraction cellulaire.

4-8 Induction de la mort cellulaire et de nécroses foliaires

La réaction hypersensible (RH) est la conséquence de l'interaction incompatible entre une plante et certains pathogènes, ou du traitement par un éliciteur. Elle se manifeste généralement par la mort des cellules situées au niveau du site de pénétration du micro-organisme ou d'infiltration de l'éliciteur (Baillieul *et al.*, 1995 ; Morel et Dangl, 1997 ; Perez *et al.*, 1999 ; Yano *et al.*, 1998). Il était intéressant de savoir si T4BcPG1 induisait ou non la mort des cellules végétales même si, dans l'hypothèse d'une réponse positive, il ne serait pas facile d'interpréter les résultats : réaction hypersensible ou digestion des composés pariétaux.

4-8-1 Induction de la mort de cellules en suspension par T4BcPG1

L'étude de la mort cellulaire induite dans des suspensions de cellules de vigne, 24 h après traitement par des concentrations croissantes d'éliciteur, est présentée Figure 39 A. L'analyse de ces résultats met en évidence une mort cellulaire significative, induite par T4BcPG1 à partir d'une concentration de $2,5 \mu\text{g/g PFC}$ ($17,2 \pm 5,2\%$ de cellules mortes). Un seuil de mort cellulaire semble être atteint à partir d'une concentration de T4BcPG1 supérieure à $3 \mu\text{g/g PFC}$ (environ $22 \pm 3\%$ selon les concentrations). Dans les cellules témoins, après 24 h d'incubation dans les conditions de l'expérience, la mort cellulaire est évaluée à $7,8 \pm 2,7\%$. La valeur relativement élevée de cette dernière donnée peut être expliquée par l'emploi d'un milieu minimum pour cette étude (milieu M2 ; § 1-1-1). Nous avons ensuite voulu vérifier si

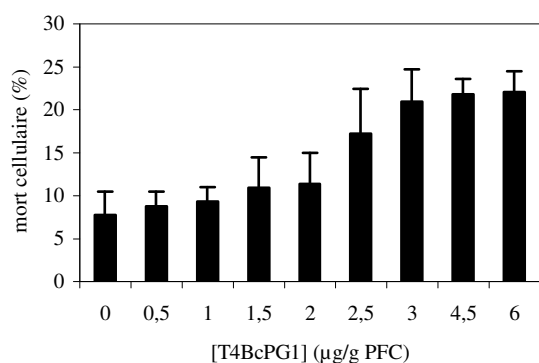
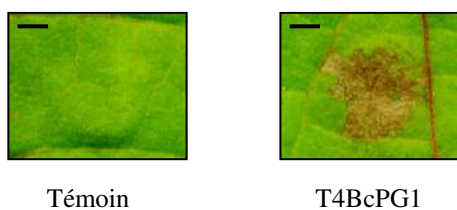
A**B**

Figure 39 : Mort cellulaire induite par T4BcPG1.

A, mort cellulaire dans des suspensions de cellules de vigne 24 h après traitement par des concentrations croissantes de T4BcPG1. La mort cellulaire est estimée par comptage de 500 cellules après coloration au rouge neutre (0,01% pH 7,0). Les moyennes et les écart-types ont été calculés à partir des résultats de trois expériences indépendantes. **B**, nécrose induite par l'infiltration de T4BcPG1 dans des feuilles de vigne (*Vitis vinifera* cv Chardonnay). Les feuilles de plantules âgées de 8 semaines sont infiltrées en face inférieure par une solution de T4BcPG1 (5 μL à 130 mg/L) avec une seringue de 1 mL sans aiguille. Les feuilles témoins sont infiltrées avec le même volume d'eau. Les images, obtenues 24 h après infiltration, sont représentatives des résultats de cinq expériences. Echelle : — = 1 mm.

l'infiltration de T4BcPG1 dans des feuilles de vigne provoquait l'apparition de nécroses foliaires.

4-8-2 Production de nécroses foliaires en réponse à T4BcPG1

L'infiltration de T4BcPG1 (5 μ L à 130 μ g/ μ L) en face inférieure des feuilles de vigne provoque la formation de petites nécroses (diamètre d'environ 3 mm) visibles dès 12 h après l'infiltration (Figure 39 B). Cette petite taille des nécroses provient du fait que l'injection d'une solution dans les feuilles de vigne ne permet pas sa diffusion en dehors de la zone de contact avec la seringue. Cependant, ce résultat ne nous permet pas de conclure quant à l'origine de ces nécroses (macération des tissus par l'activité polygalacturonase ou RH).

5 L'activité élicitrice de T4BcPG1 est indépendante de son activité enzymatique

Par son activité enzymatique, l'endopolygalacturonase est capable de libérer des oligogalacturonates (OG) des parois cellulaires végétales. Or, les OG avec un degré de polymérisation compris entre 10 et 20 (dp 10-20) sont des éliciteurs de réactions de défense qui provoquent un influx de calcium, une production de FAO, une phosphorylation de protéines, et une synthèse de phytoalexines (Nothnagel *et al.*, 1983 ; Mathieu *et al.*, 1991 ; Reymond *et al.*, 1995 ; Mathieu *et al.*, 1996 ; Binet *et al.*, 1998 ; Lebrun-Garcia *et al.*, 1998). L'activité élicitrice de T4BcPG1 pourrait donc provenir des OG libérés par son activité polygalacturonase. Cependant, l'activité élicitrice d'autres hydrolases, comme la pectine lyase ou la xylanase, ne dépend pas de leur activité enzymatique mais de certains motifs protéiques (Rouet-Mayer *et al.*, 1997 ; Enkerli *et al.*, 1999). Prenant en compte l'ensemble de ces données, nous avons voulu déterminer l'origine de l'activité élicitrice de T4BcPG1 : OG libérés par son activité enzymatique ou protéine elle-même.

Pour réaliser cette étude, nous avons d'abord recherché les concentrations saturantes d'OG actifs (OGA purifiés de dp 9-20) et de T4BcPG1 pour différents événements impliqués dans l'activation des réactions de défense de la vigne, avant de comparer, d'un point de vue cinétique

et quantitatif, les réponses induites par une concentration saturante de chacun de ces deux éliciteurs. Nous avons ensuite comparé, sur suspensions cellulaires de vigne, l'activité élicitrice de deux endopolygalacturonases (de *Botrytis cinerea* et d'*Aspergillus japonicus*), utilisées à la même activité enzymatique. Puis, la désensibilisation, phénomène selon lequel une suspension cellulaire est incapable d'être activée deux fois de suite par le même éliciteur (Felix *et al.*, 1993 ; Binet *et al.*, 1998), a été utilisée pour analyser la réponse de cellules de vigne à des traitements successifs par les OGA et T4BcPG1 (et inversement). Ceci dans le but de savoir si l'activité élicitrice de T4BcPG1 pouvait être due à la libération d'OGA. Enfin, nous avons réalisé plusieurs traitements physiques et chimiques sur T4BcPG1 pour essayer de séparer l'activité élicitrice de l'activité enzymatique.

5-1 Comparaison de l'activité élicitrice de T4BcPG1 et des oligogalacturonates

La recherche de la concentration saturante pour T4BcPG1 et les OGA purifiés (dp 9-20) a été réalisée pour les événements suivants : variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$, production de FAO et efflux de nitrate puisque l'implication de ce dernier événement dans la mort cellulaire et l'activation de certains gènes de défense a été récemment démontrée au laboratoire (Wendehenne *et al.*, 2002).

5-1-1 Effets de la concentration en T4BcPG1 et en OGA sur l'activation d'événements précoces dans des suspensions cellulaires de vigne

Variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$

Les résultats montrent que, si pour les OGA la réponse est maximale pour une concentration supérieure à 1 mg/g PFC, elle ne l'est pas pour T4BcPG1 utilisée jusqu'à 10 µg/g PFC (Figure 40 A). De plus l'élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ induite par les OGA ne dépasse jamais le seuil de 800 nM, alors que pour T4BcPG1 cette élévation peut atteindre 2 µM pour une concentration non saturante (10 µg/g PFC).

Les variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ diffèrent nettement entre les cellules de vigne traitées par chacun des deux éliciteurs : T4BcPG1 (5 µg/g PFC) ou les OGA (2 mg/g PFC ; Figure 40 B). Tout d'abord, l'élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ induite par T4BcPG1 est globalement plus forte que celle induite par les OGA. La $[Ca^{2+}]_{cyt}$ la plus élevée mesurée est de 800 nM après 3 min de traitement

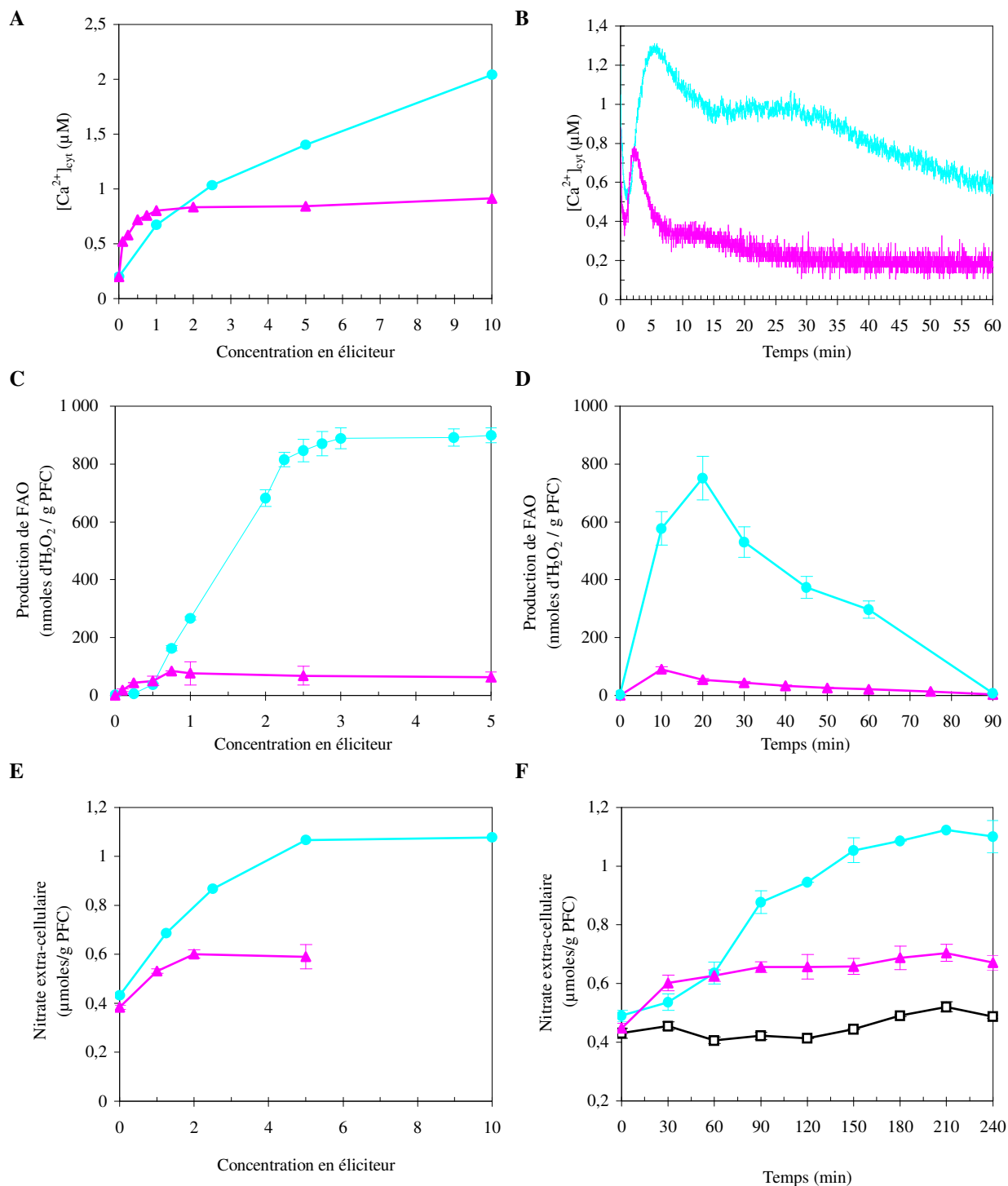


Figure 40 : Comparaison des évènements précoces activés dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par des OGA (dp 9-20) ou T4BcPG1.

A,C,E : Effets dose-réponse des OGA (▲ ; mg/g PFC) et de T4BcPG1 (● ; μg/g PFC) sur la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (A) après 3 min (OGA) ou 5 min (T4BcPG1) de traitement, la production d' H_2O_2 (C) à 10 min (OGA) ou 20 min (T4BcPG1), et l'efflux de nitrate à 180 min (E) de cellules de vigne traitées par des concentrations croissantes de chaque éliciteur.

B,D,F : Etude cinétique des variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (B), de la production d' H_2O_2 (D) et de l'efflux de nitrate (F) dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par une concentration saturante d'OGA (▲ ; 2 mg/g PFC), de T4BcPG1 (● ; 5 μg/g PFC) ou témoins (□).

par les OGA alors qu'elle est de 1,3 μM , 5 min après traitement des cellules de vigne par T4BcPG1. De plus, si la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ revient à un faible niveau (200 nM) 30 min après le traitement par les OGA, elle atteint toujours 650 nM après 60 min dans les cellules traitées par T4BcPG1. Une concentration saturante d'OGA (2 mg/g PFC) est donc incapable de provoquer l'importante élévation de calcium cytosolique induite par T4BcPG1, utilisé à une dose non saturante (Figure 40 A).

Production de FAO

Cette même étude réalisée sur la production d' H_2O_2 (Figure 40 C), mesurée au pic de production (10 min pour les OGA et 20 min pour T4BcPG1 : Figure 40 D), indique également que T4BcPG1 (dès 0,75 $\mu\text{g/g}$ PFC) induit toujours une réponse plus forte (de 180 à 850 nmoles d' $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ PFC en fonction de la concentration) que celle provoquée par les OGA, utilisés à une concentration saturante (environ 75 nmoles d' $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ PFC pour une concentration de 1 mg/g PFC). Dans cette expérience, une concentration saturante peut être déterminée pour chacun des deux éliciteurs. Ainsi, pour T4BcPG1 la production maximale de FAO est obtenue à partir de 2,5 $\mu\text{g/g}$ PFC soit environ $70 \cdot 10^{-12}$ moles/g PFC, c'est à dire 7 nM dans une suspension cellulaire à 0,1g PFC/mL. Pour ce calcul nous avons considéré la masse moléculaire de T4BcPG1 égal à 35858 g/mole en supposant que le peptide signal de la protéine ait été éliminé (§ 3-4-3). Pour les OGA, la concentration saturante est de 0,75 mg/g PFC soit environ $275 \cdot 10^{-9}$ moles/g PFC, c'est à dire 27,5 μM dans une suspension de cellules à 0,1g PFC/mL. Nous avons considéré que les OGA ont un dp moyen de 14 soit une masse moléculaire moyenne d'environ 2740 g/mole (l'acide galacturonique a une masse moléculaire de 212,2 g/mole et l'eau de 18 g/mole).

La cinétique de production d' H_2O_2 induite par les OGA est très différente de celle induite par T4BcPG1 (Figure 40 D). Avec les OGA, le pic de production de FAO est obtenu 10 min après le début du traitement alors qu'avec T4BcPG1, il est détecté après 20 min. La quantité d' H_2O_2 produite en réponse à chacun des éliciteurs est très différente puisqu'elle atteint un maximum d'environ 800 nmoles/g PFC pour les cellules traitées par T4BcPG1 alors qu'elle n'est que de 75 nmoles/g PFC dans les suspensions cellulaires traitées par les OGA. Le fait que

l'effet des OGA se manifeste plus tôt que celui induit par T4BcPG1 pourrait signifier que l'activité élicitrice de T4BcPG1 provient des OG libérés, mais l'intensité de la réponse obtenue avec T4BcPG1 ne peut pas s'expliquer par les seuls OG. La différence de taille entre les deux éliciteurs, et donc la plus grande facilité des OGA à atteindre leur cible pourraient expliquer l'effet plus rapide des OGA.

Efflux de nitrate

La recherche de la dose d'éliciteur qui provoque l'efflux de nitrate maximum après 180 min de traitement est exposée Figure 40 E. Là aussi, une concentration saturante peut être définie pour chacun des éliciteurs. Elle se situe à environ 5 µg/g PFC pour T4BcPG1 et 2 mg/g PFC pour les OGA.

L'analyse de l'efflux de nitrate induit dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par chaque éliciteur à une concentration saturante (Figure 40 F) donne des résultats similaires aux précédents : l'efflux de nitrate provoqué par les OGA est faible et transitoire (maximum d'environ 600 nmoles NO₃⁻/g PFC ; durée de 30 min) tandis que celui induit par T4BcPG1 est élevé et long (maximum d'environ 1,1 µmole NO₃⁻/g PFC ; durée de 150 min).

Il faut noter que la dose nécessaire de chaque éliciteur pour induire un efflux de nitrate maximum semble deux fois plus élevée que celle provoquant la production optimale de FAO. En effet, pour T4BcPG1, la concentration induisant la réponse FAO optimale est estimée à 2,5 µg/g PFC alors qu'elle est de 5 µg/g PFC pour l'efflux de nitrate. Pour les OGA, cette dose saturante est évaluée à 0,75 mg/g PFC pour la production de FAO et à 2 mg/g PFC pour l'efflux de nitrate.

Ces résultats mettent en évidence que, pour les trois événements précoces étudiés, les réponses induites par une concentration saturante d'OGA sont toujours plus faibles et plus transitoires que celles induites par T4BcPG1. Ils suggèrent que les effets de T4BcPG1 ne sont pas dus aux seuls OG libérés par l'enzyme. A ce stade, la comparaison des effets de T4BcPG1 et des OGA sur l'expression des gènes de défense et la production de métabolites impliqués dans les réactions de défense, comme les phytoalexines, peut aussi nous permettre de confirmer que l'activité élicitrice de T4BcPG1 n'est pas le fait des OG libérés par l'enzyme.

5-1-2 Expression des gènes de défenses, production de phytoalexines dans des cellules de vigne traitées par des concentrations saturantes d'OGA et de T4BcPG1

La comparaison de l'expression de six gènes de défense dans des cellules de vigne traitées par une concentration saturante d'OGA (2 mg/g PFC) ou de T4BcPG1 (5 µg/g PFC) est présentée Figure 41 A. Cette analyse par northern blot montre des différences notables entre l'accumulation des transcrits dans des cellules traitées par T4BcPG1 ou les OGA. L'expression du gène *LOX 3* activée par T4BcPG1 ne l'est pas par les OGA. Pour les 5 autres gènes étudiés, les différences sont d'ordre cinétique et quantitatif. L'accumulation de ces transcrits est toujours beaucoup plus faible et plus transitoire en réponse aux OGA qu'à T4BcPG1.

L'accumulation des phytoalexines (Figure 41 B) dans le milieu de culture de cellules de vigne traitées par T4BcPG1 (5 µg/g PFC) ou les OGA (2 mg/g PFC) met également en évidence une réponse différente des suspensions cellulaires en fonction de l'éliciteur utilisé. Ainsi, la production de trans-resvératrol et d'ε-viniférine, 24 h après traitement par l'éliciteur, est plus élevée en réponse à T4BcPG1 qu'aux OGA. Par contre, les deux phytoalexines sont détectables plus tôt dans le milieu des suspensions cellulaires traitées par les OGA (dès 8 h en réponse aux OGA contre 12 h en réponse à T4BcPG1). De plus, le devenir du trans-resvératrol est différent selon l'éliciteur. En effet, la quantité de trans-resvératrol dans le milieu des cellules traitées par les OGA semble constante de 8 h à 48 h, alors que celle produite en réponse à T4BcPG1 augmente fortement et disparaît très rapidement.

Ces résultats qui montrent que des concentrations saturantes en OGA ont des effets beaucoup plus faibles que T4BcPG1 sur l'expression de gènes et la production de trans-resvératrol confirment que l'activité élicitrice de T4BcPG1 n'est pas le fait des OG libérés.

Cependant, cette étude comparative a été réalisée avec des OGA de dp 9-20 sélectionnés pour leur activité élicitrice. Or, il est vraisemblable que les OG éventuellement libérés à partir de la paroi de cellules de vigne par l'activité enzymatique de T4BcPG1 soient très différents d'un point de vue structural (degré de polymérisation et de méthylation) des OGA purifiés utilisés ici. Nous avons donc vérifié si une autre endopolygalacturonase (provenant d'*Aspergillus*

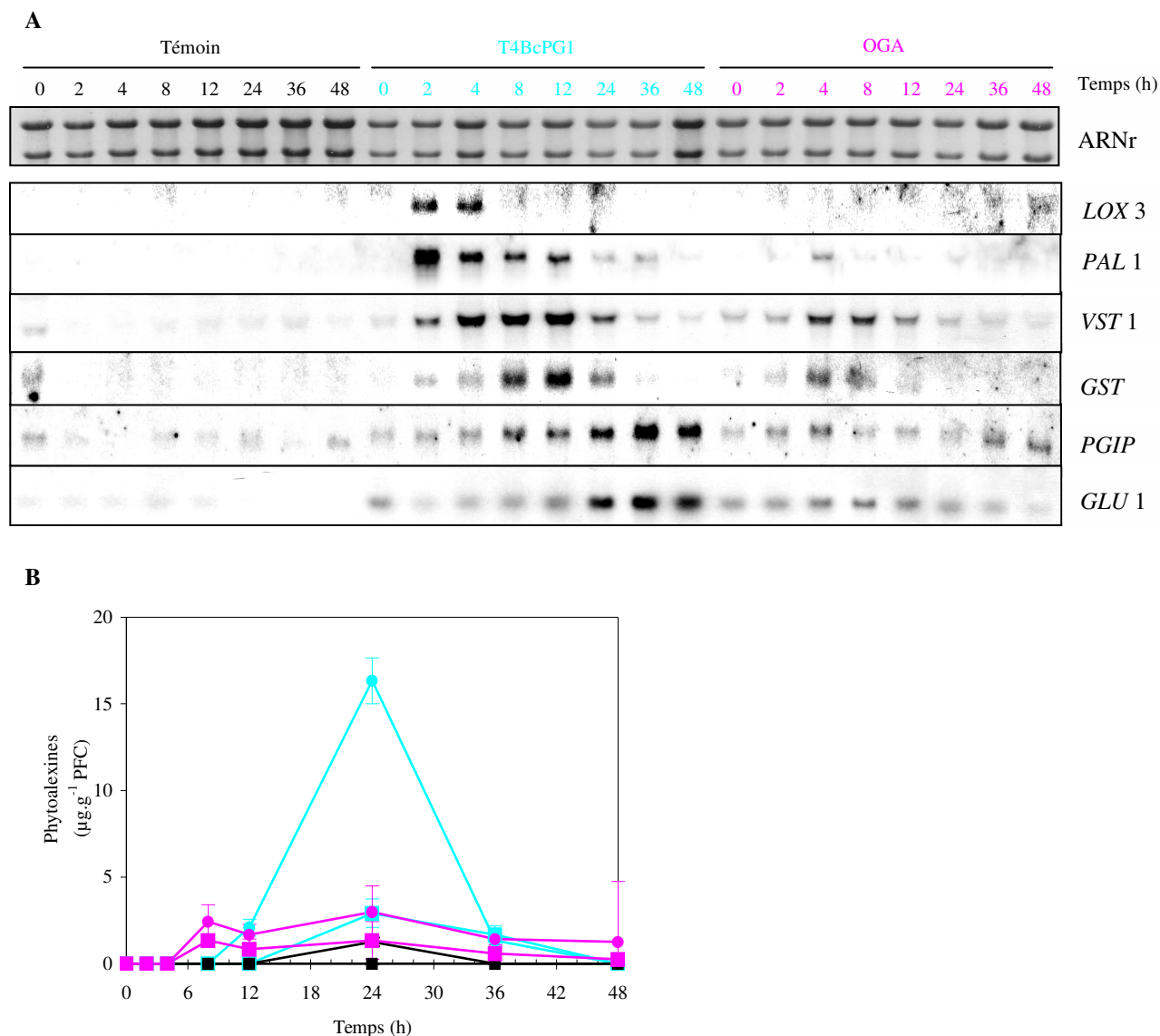


Figure 41 : Cinétique d'accumulation des transcrits de gènes de défense et des phytoalexines dans des cellules de vigne témoins ou traitées par une concentration saturante de T4BcPG1 ou d'OGA.

Les suspensions cellulaires sont traitées par T4BcPG1 (5 μg/g PFC), les OGA (2 mg/g PFC) ou par le même volume d'eau (Témoïn) puis prélevées aux temps indiqués afin d'analyser l'expression de gènes de défense par northern blot (**A**) et l'accumulation des phytoalexines (**B**). **A**, les ARN totaux sont extraits, séparés sur gel, transférés sur membrane avant d'être hybridés avec les sondes ADNc des gènes de vigne *LOX 3*, *PAL 1*, *VST 1*, *GST*, *PGIP*, *GLU 1*. Les ARNr colorés au bromure d'éthidium sont indiqués comme contrôle de charge pour chaque puits. **B**, dosage par HPLC du trans-resvératrol (● ; ■) et de l'ε-viniférine (■ ; ■) dans le milieu de culture des cellules de vigne non traitées (noir), traitées par T4BcPG1 (bleu) ou les OGA (rose).

japonicus ; AjPG), utilisée avec la même activité enzymatique *in vitro* que T4BcPG1, activait aussi les réactions de défense de cellules de vigne.

5-2 Comparaison de l'activité élicitrice de T4BcPG1 et de AjPG utilisées à la même activité enzymatique *in vitro*

Cette nouvelle étude comparative n'a été réalisée que sur deux événements précoces : la production de FAO et les variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$. La principale raison est que nous voulions nous limiter à l'étude d'événements précoces afin d'éviter l'interprétation de résultats qui, pour des temps longs, pourraient être dus à l'hydrolyse progressive de la paroi cellulaire et à ses conséquences.

5-2-1 Variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$

L'analyse des variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Figure 42 A), montre que, pour une même activité enzymatique (11,5 mRGU), l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est beaucoup plus faible dans les cellules traitées par AjPG que dans les cellules traitées par T4BcPG1. Ainsi, la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ maximale atteinte après traitement par AjPG est de 650 nM alors qu'elle est de 1,1 μ M dans les cellules traitées par T4BcPG1 (utilisée à la même activité enzymatique). De plus, la cinétique des variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est très différente. T4BcPG1 induit une élévation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ intense et transitoire (durée de 30 min) avec un retour vers 200 nM après 50 min de traitement, alors que AjPG provoque une première élévation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ faible et transitoire (durée : 1 à 15 min) mais la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est maintenue à un niveau relativement élevé (400 nM) jusqu'à la fin de l'expérience (60 min).

5-2-2 Production de FAO

Pour une même activité polygalacturonase, AjPG et T4BcPG1 induisent une production d' H_2O_2 très différente dans les suspensions cellulaires de vigne (Figure 42 B). Après 20 min de traitement, la production d' H_2O_2 atteint 500 nmoles/g PFC en présence de T4BcPG1 (avec une activité de 45 mRGU), alors qu'elle n'est que de 30 nmoles/g PFC en réponse à AjPG (utilisée à la même activité). De plus, l'étude cinétique a montré que la production de FAO induite par

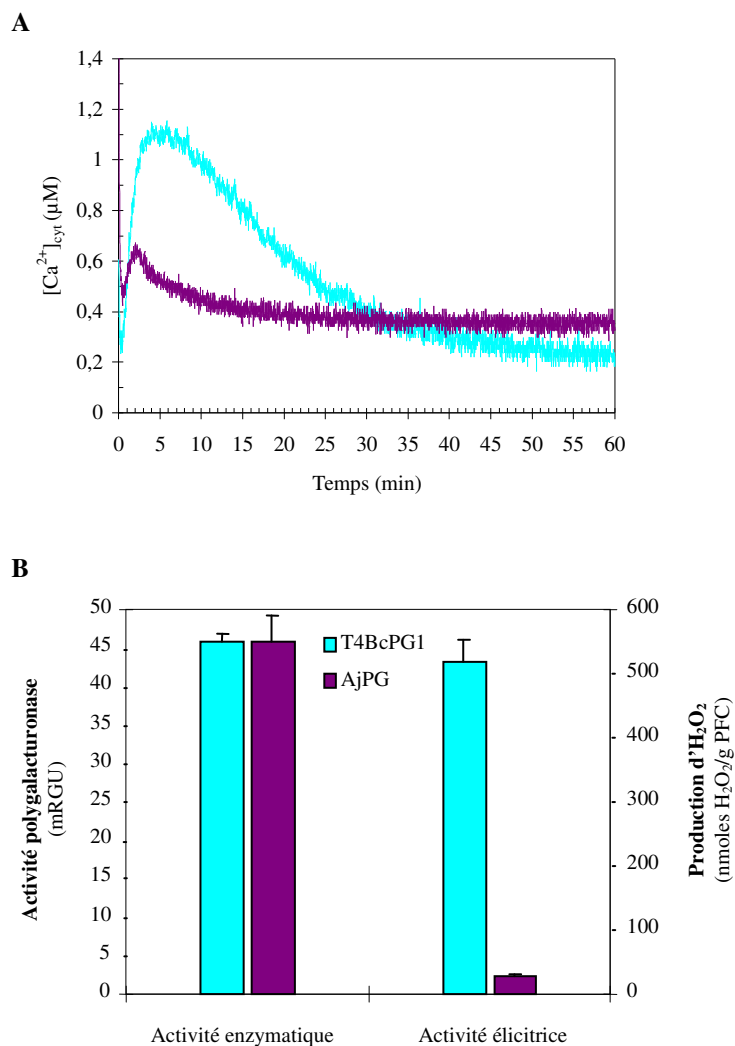


Figure 42 : Comparaison de l'activité élicitrice d'une endopolygalacturonase de *Botrytis cinerea* (T4BcPG1) et d'*Aspergillus japonicus* (AjPG) utilisées à la même activité enzymatique.

A, variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1 (—) ou AjPG (—) utilisées à la même activité enzymatique (11,5 mRGU). L'aequorine est reconstituée par incubation des cellules de vigne exprimant l'apoequorine dans le cytosol en présence de coelentérazine (3 μ M). **B**, production d'H₂O₂ dans des cellules de vigne 20 min après traitement par T4BcPG1 () ou AjPG () utilisées à la même activité enzymatique (45 mRGU).

AjPG augmentait progressivement au cours du temps alors que celle provoquée par T4BcPG1 revenait à un niveau de base après 90 min de traitement (résultats non présentés).

Ces données, mises en commun, indiquent que deux protéines ayant la même activité enzymatique *in vitro* ont des effets très différents sur l'élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et la production de FAO (étudiées pendant la première heure de traitement). Les résultats obtenus lors de ces deux études comparatives, entre T4BcPG1, les OGA et AjPG, nous ont conforté dans l'idée que l'activité élicitrice de T4BcPG1 pouvait être dissociée de son activité enzymatique.

5-3 Discrimination des activités élicitrice et enzymatique de T4BcPG1

D'autres expériences ont été réalisées pour savoir si l'activité élicitrice de T4BcPG1 était due aux OG libérés par son activité enzymatique ou au contraire à sa structure tri-dimensionnelle. La désensibilisation est une expérience de choix pour discriminer l'activité enzymatique de l'activité élicitrice de T4BcPG1 puisque ce phénomène met en évidence l'incapacité d'une suspension cellulaire à répondre deux fois de suite au même éliciteur (Felix *et al.*, 1993 ; Binet *et al.*, 1998). Par ailleurs, des traitements chimiques ou physiques susceptibles de modifier la structure spatiale et/ou l'activité d'une enzyme ont permis de séparer l'activité élicitrice de l'activité enzymatique de T4BcPG1.

5-3-1 Désensibilisation

Quarante cinq minutes après une première élicitation par les OGA (2 mg/g PFC), un second traitement par les OGA (2 mg/g PFC) n'induit pas une deuxième production de FAO dans les suspensions cellulaires de vigne (Figure 43 A). Il y a donc bien établissement d'un état réfractaire dû à la désensibilisation des cellules de vigne, comme cela fut préalablement montré avec des cellules de tabac ou de tomate (Felix *et al.*, 1993 ; Rouet-Mayer *et al.*, 1997 ; Binet *et al.*, 1998 ; Felix *et al.*, 1998). Par contre, l'addition de T4BcPG1 (1 µg/g PFC) à des suspensions cellulaires de vigne préalablement traitées par des OGA (2 mg/g PFC), provoque une forte production de FAO (500 nmoles d'H₂O₂/g PFC). De même, deux traitements successifs par T4BcPG1 provoquent la désensibilisation des cellules de vigne puisque aucune élévation significative de la production d'H₂O₂ n'est détectable après le second traitement (Figure 43 B).

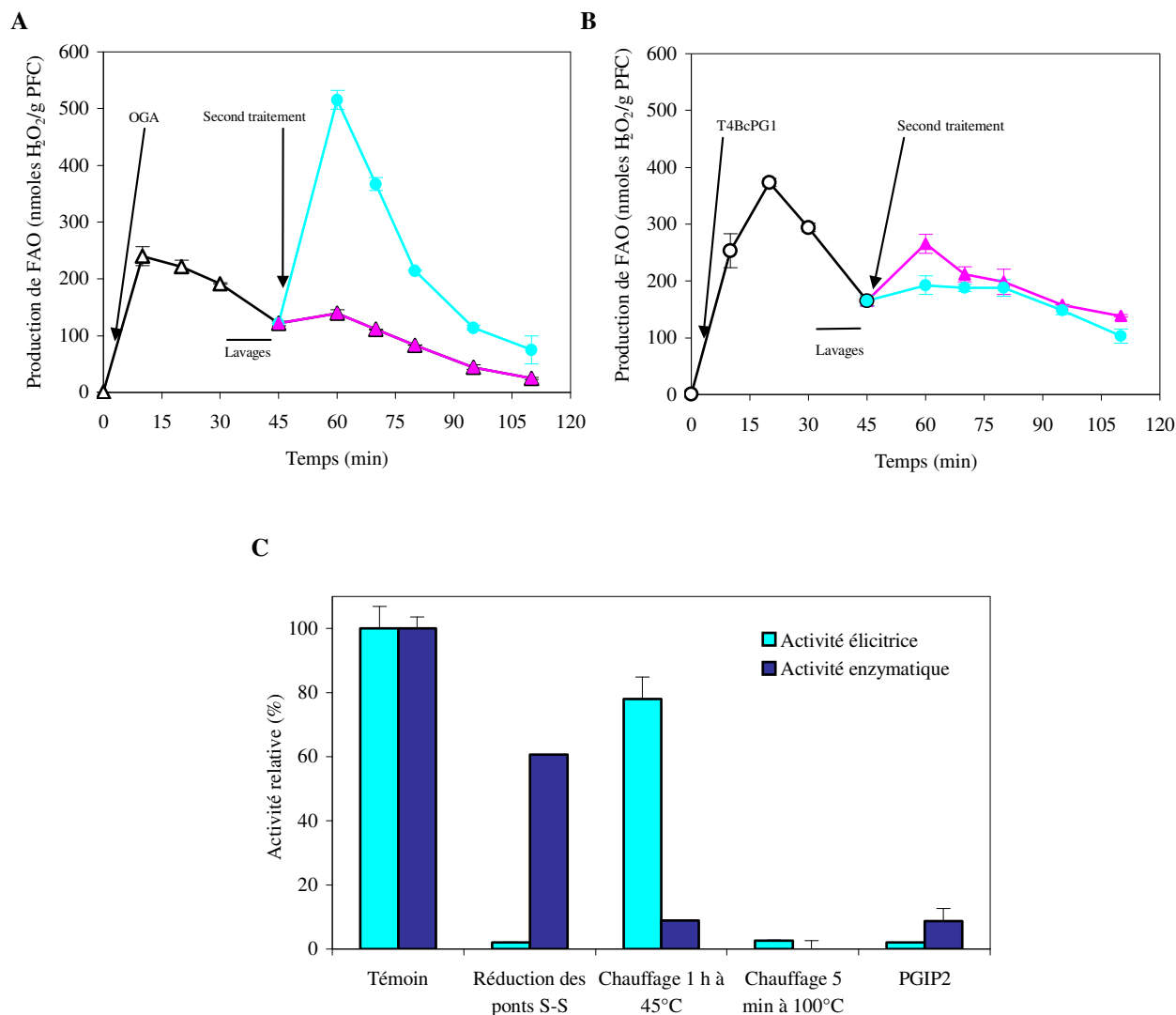


Figure 43 : Discrimination des activités élicitrice et enzymatique de T4BcPG1.

A-B, désensibilisation de cellules de vigne après des traitements successifs par T4BcPG1 et/ou les OGA suivie par la production d' H_2O_2 . **A**, les cellules sont traitées au temps 0 par les OGA (3 mg/g PFC, Δ), lavées 3 fois avec du milieu neuf entre 30 et 45 min, puis traitées par T4BcPG1 (1,5 μ g/g PFC, $\bullet$) ou les OGA (2 mg/g PFC, $\blacktriangle$). **B**, les cellules sont traitées au temps 0 par T4BcPG1 (1,5 μ g/g PFC, $\circ$), lavées 3 fois avec du milieu neuf entre 30 et 45 min, puis traitées par les OGA (2 mg/g PFC, $\blacktriangle$) ou T4BcPG1 (1,5 μ g/g PFC, $\bullet$). **C**, activités enzymatique et élicitrice de T4BcPG1 après traitements physiques ou chimiques. T4BcPG1 (3 μ g) a été soumise à une réduction des ponts disulfures par le DTT (1 mM) suivie de leur alkylation par le IAEDENS (10 mM), chauffée 1 h à 45°C ou 5 min à 100°C, ou incubée avec la PGIP 2 de *Phaseolus vulgaris* (6 μ g). L'activité élicitrice ($\blacksquare$) est mesurée par la production d' H_2O_2 dans des suspensions cellulaires de vigne, 20 min après traitement avec T4BcPG1 modifiée, ou non. L'activité élicitrice relative pour T4BcPG1 modifiée est calculée par rapport à l'activité élicitrice de T4BcPG1 non traitée (100%). L'activité enzymatique ($\blacksquare$) est mesurée par la méthode spectrophotométrique au 2-cyanoacétamide en utilisant l'acide polygalacturonique comme substrat. L'activité enzymatique relative est calculée en rapportant l'activité enzymatique de T4BcPG1 traitée à celle de la protéine non traitée (Témoin 100%).

Mais, l'addition d'OGA (2 mg/g PFC) à des suspensions cellulaires pré-traitées par T4BcPG1 (1 µg/g PFC) provoque bien une augmentation de la production de FAO en réponse au deuxième éliciteur.

Nos résultats montrent que les cellules de vigne, comme les cellules de tabac, sont insensibles à la seconde application d'un même éliciteur. Ainsi, l'efficacité de T4BcPG1 après les OGA, et réciproquement, témoigne que l'activité élicitrice de T4BcPG1 ne peut pas être due à la libération d'OG actifs *via* son activité enzymatique.

5-3-2 Analyse de l'activité élicitrice et enzymatique de T4BcPG1 après traitements physiques ou chimiques de la protéine

La protéine T4BcPG1 a été soumise à divers traitements physiques ou chimiques avant de mesurer son activité enzymatique *in vitro* d'une part, et son activité élicitrice d'autre part. Les résultats de cette expérience, présentés Figure 43 C, indiquent que le chauffage 5 min à 100°C ou l'incubation avec le PGIP2 inhibent à la fois l'activité élicitrice et enzymatique de T4BcPG1. La réduction des ponts disulfures (suivie de leur alkylation) inhibe l'activité élicitrice de T4BcPG1 (de 98%) alors qu'elle ne réduit son activité enzymatique que de 40%. Inversement, un chauffage de la protéine 1 h à 45°C réduit son activité enzymatique de 91% sans diminuer fortement son activité élicitrice (seulement de 22%).

Ces deux dernières expériences montrent qu'il est possible d'inhiber très fortement l'une ou l'autre des activités (enzymatique ou élicitrice) sans affecter l'autre de façon très importante. Ce résultat et les précédents, concernant en particulier la différence d'effets des OGA et de T4BcPG1 à concentrations saturantes sur les réactions de défense, mais aussi concernant les expériences de désensibilisation, permettent d'écarter l'hypothèse de l'intervention des OGA libérés par T4BcPG1.

Le fait que la PGIP2 inhibe à la fois l'activité enzymatique et l'activité élicitrice est probablement dû au recouvrement des deux sites (catalytique et éliciteur) de T4BcPG1 par l'inhibiteur volumineux. Mais nous ne pouvons pas exclure que le site catalytique soit aussi requis pour l'activité élicitrice de T4BcPG1 (voir discussion). Quant au traitement à 100°C, il

doit totalement dénaturer ou précipiter la protéine T4BcPG1 et lui fait perdre toutes ses propriétés biologiques.

CHAPITRE 2. CARACTERISATION D'AUTRES ELICITEURS

ACTIFS SUR LA VIGNE : ACTIVATION DES REACTIONS DE

DEFENSE ET PROTECTION

1 Détection de produits avec une activité élicitrice

L'analyse des réactions de défense de la vigne en réponse à T4BcPG1 nous a permis de mettre en place des tests pour le criblage rapide de molécules efficaces en terme d'activité élicitrice sur la vigne. Ces tests comportent l'analyse de deux événements précoces (la production de FAO et les variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$) et de deux réactions plus tardives (production de phytoalexines et mort cellulaire).

La plupart des molécules testées sont, soit des molécules dont l'activité élicitrice est déjà connue sur d'autres plantes que la vigne comme les OGA ou la laminarine (Mathieu *et al.*, 1991 ; Mathieu *et al.*, 1996 ; Rouet-Mayer *et al.*, 1997 ; Binet *et al.*, 1998 ; Klarzynski *et al.*, 2000), soit des molécules qui nous paraissaient intéressantes du fait de leur structure chimique ou de leur origine biologique.

La synthèse des données (Tableau IV) montre tout d'abord que sur les 22 molécules testées, 16 induisent au moins une des réactions de défense caractérisées sur cellules de vigne en suspension. Parmi ces 16 molécules, 7 provoquent au moins une réponse de forte intensité et les 4 indiqués ci-dessous induisent l'activation de trois des quatre événements étudiés:

- oligogalacturonates de dp 11 (Dr. B. Priem, CNRS, Grenoble)
- laminarine, un polymère linéaire de β -1,3-glucane de dp 25-30 (Dr. P. Potin, CNRS-Goëmar, Roscoff)
- lipo-polysaccharide (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma-Aldrich)
- extraits de levure (Difco)

Produit	Variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$	Production de FAO	Production de phytoalexines à 24 h	% viabilité à 24 h
Cellodextrine dp 6	ND	-	-	87%
Cellodextrine dp 7	ND	-/+	-	89%
Cellodextrine dp 8	ND	+	-	96%
Cellodextrine dp 9	ND	+	-	93%
Pectine	ND	-	-	95%
oligo pectine	ND	++	-	94%
Acide polygalacturonique	ND	-	-	94%
Oligogalacturonides dp 2-15	+	+	-	95%
Oligogalacturonides dp 11	++	++	-/+	94%
oligo alginate	ND	++	-/+	88%
Laminarine	+++	+++	-/+	95%
Chitine	ND	+	-	39%
Chitosan 1	ND	+	-	95%
Chitosan 2	ND	++	-	95%
chitopentaose	+	-	+++	92%
Phycarine	ND	+	-	93%
ergostérol	ND	+	+	90%
LPS <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+++	81%
xylanase	ND	++	-	4%
cryptogéine	ND	-	-	91%
extraits de levure	++	++	+++	92%
Acide β amino -butyrique	-	-	-	94%

- : pas de réponse

+ : réponse faible et transitoire

+++ : réponse intense et prolongée

-/+ : réponse très faible

++ : réponse intermédiaire

ND : non déterminé

Tableau IV : synthèse des résultats de l'activité élicitrice à l'issue d'un criblage réalisé sur vingt-deux produits.

Tous les produits ont été testés à quatre concentrations différentes obtenues par dilutions en cascade au 1/10^{ème} de la concentration la plus élevée (1 mg/mL, excepté pour la cryptogéine : 1 μ M et l'ergostérol : 50 μ M). Les données présentées correspondent aux résultats obtenus avec la concentration la plus active. Les variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ont été étudiées pendant les 20 min suivant le traitement en utilisant les suspensions cellulaires de vigne exprimant l'apoaquorine dans le cytosol. La production d'H₂O₂ a été mesurée 20 min après traitement de 1 mL de suspension cellulaire de vigne avec chacune des quatre concentrations, pour un produit donné. La production des phytoalexines a été déterminée, 24 h après traitement, par observation sous UV de la fluorescence émise par une aliquote de 100 μ L de suspension cellulaire déposée sur un papier filtre. La viabilité cellulaire à 24 h a été mesurée par coloration au rouge neutre 0,01% (pH 7) et comptage de 300 cellules en microscopie optique.

Pour ce qui concerne les effets de la xylanase, la mort cellulaire est peut être due à son activité enzymatique puisque cette enzyme hydrolyse les xylandes des hémicelluloses de la paroi cellulaire végétale. D'autre part, concernant le LPS de *Pseudomonas aeruginosa*, les études cinétiques (FAO et $[Ca^{2+}]_{cyt}$) montrent une réelle différence avec les autres éliciteurs testés. En effet, au lieu de provoquer une réponse rapide, intense et transitoire, le LPS de *Pseudomonas aeruginosa* induit une réponse lente, faible et progressive. Il paraît probable que les réactions de défense de la vigne à cet éliciteur soient maximales à des temps beaucoup plus longs que la première heure de traitement analysée ici.

L'analyse de ces résultats nous a conduits à analyser plus précisément les réactions de défense induites chez la vigne par la laminarine extraite de l'algue brune *Laminaria digitata*.

2 Activité élicitrice de la laminarine

Les effets de la laminarine sur la vigne ont été étudiés en collaboration avec les Drs. A. Aziz (Université de Reims) et M. Adrian (IUVV, Dijon) au sein du Réseau Vigne et Vins Septentrionaux (RVVS). Plusieurs événements ont été analysés : des réponses précoces (influx de calcium, alcalinisation du milieu extra-cellulaire, production de FAO, activation de MAPK), des réactions de défense plus tardives (expression de gènes de défense, activité enzymatique de certaines PR protéines, production de phytoalexines et mort cellulaire) et la protection induite par cet éliciteur.

2-1 Événements précoces

2-1-1 Influx de calcium

La laminarine (10 mg/mL) induit un influx de calcium faible (60 nmoles de $^{45}Ca^{2+}$ /g PFC ; Figure 44 A) mais significatif, qui a lieu pendant les 15 premières minutes de traitement uniquement.

2-1-2 Production de FAO

L'analyse de la production d' H_2O_2 mesurée dans des suspensions cellulaires de vigne, 20 min après traitement par des concentrations croissantes de laminarine montre que la concentration saturante pour cet événement est supérieure à 10 mg/g PFC (plus forte concentration testée ; Figure 44 C). C'est pourquoi nous avons choisi cette dernière concentration pour analyser les autres réactions de défense de la vigne activées par cette molécule. De plus, cette production de FAO semble relativement faible, par rapport à la réponse obtenue avec T4BcPG1, puisqu'elle n'atteint que 120 nmoles d' H_2O_2 /g PFC après 20 min de traitement, contre ~ 800 nmoles d' H_2O_2 /g PFC pour T4BcPG1.

La cinétique de cette production de FAO (Figure 44 D) montre une augmentation rapide de la quantité d' H_2O_2 (100 nmoles d' H_2O_2 /g PFC après 10 min de traitement) qui atteint un maximum à 20 min avant de disparaître rapidement après 45 min de traitement.

2-1-3 Alcalinisation extra-cellulaire

La laminarine à 10 mg/g PFC induit une alcalinisation rapide du milieu de la suspension cellulaire de vigne (ΔpH de 0,15 après 10 de traitement ; Figure 44 B). L'alcalinisation est maximale entre 30 et 45 min après le début du traitement (ΔpH de 0,27 à 45 min), puis se stabilise.

2-1-4 Activation de MAPK

L'analyse des MAPK réalisée par western blot avec un anticorps révélant les MAPK humaines inactives (Figure 44 E) indique que les deux MAPK (de 45 et 49 kD respectivement) sont présentes en quantités égales dans les cellules témoins ou traitées par la laminarine (10 mg/g PFC), au moins pendant les 60 premières minutes de traitement.

Une même étude réalisée avec l'anticorps dirigé contre les MAPK actives révèle que ces deux MAPK sont activées uniquement dans les cellules traitées par la laminarine (Figure 44 F). L'activation de ces deux MAPK est décelable dès 5 min de traitement, augmente progressivement pour atteindre un maximum entre 15 et 30 min, avant de décroître rapidement à 45 min pour finalement revenir au niveau d'activation dans les cellules témoins après 60 min.

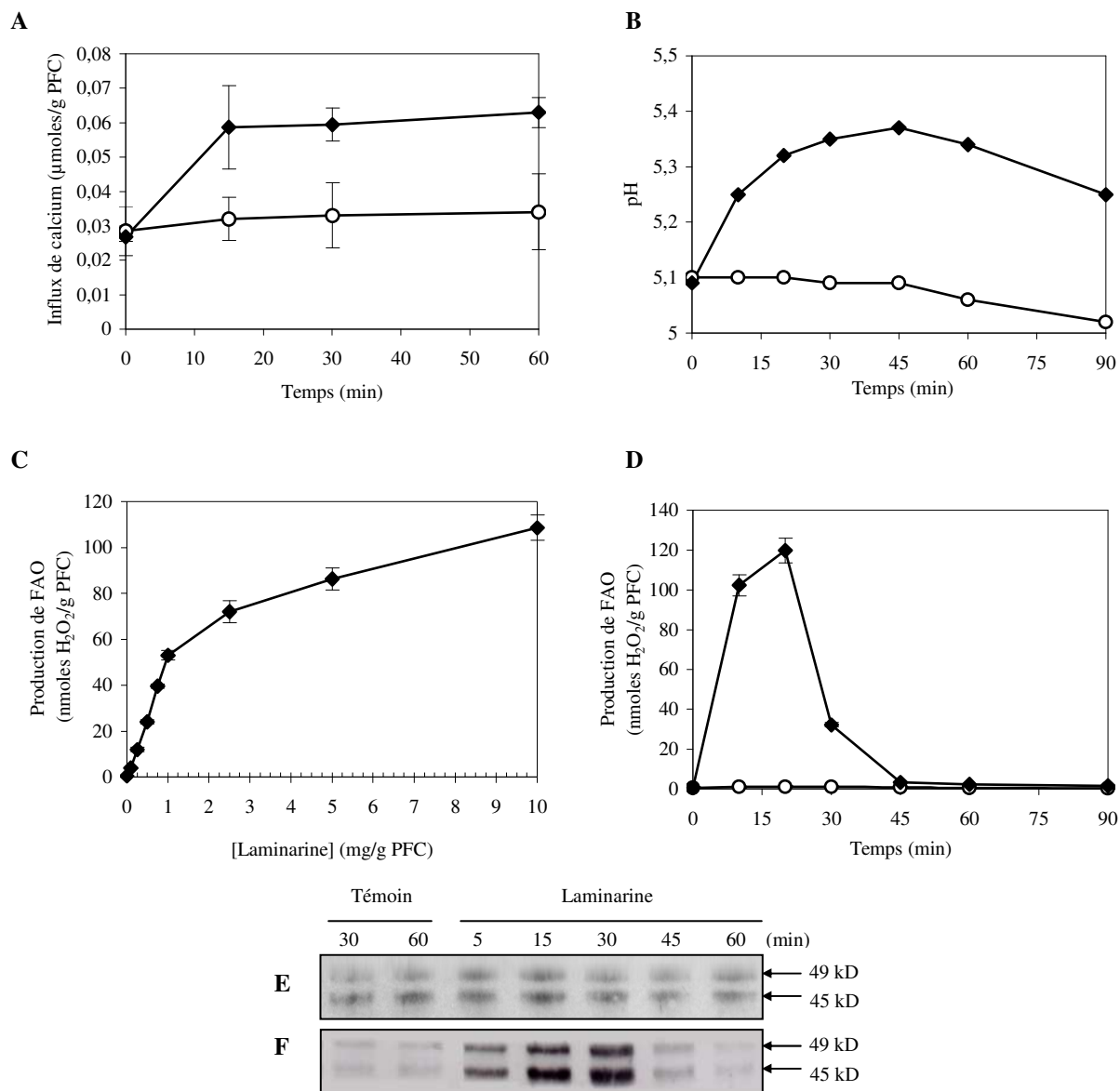


Figure 44 : Activation d'événements précoces des réactions de défense de cellules de vigne par la laminarine.

A, cinétique de l'influx de calcium dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par la laminarine (10 mg/g PFC ; ◆) ou non traitées (○). L'influx de calcium est mesuré par l'incorporation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ajouté 5 min avant traitement (0,033 MBq/g PFC). **B**, Alcalinisation du milieu des suspensions cellulaires de vigne traitées par la laminarine (10 mg/g PFC, ◆) ou non traitées (○). **C**, effet de la concentration en laminarine sur la production de FAO dans des suspensions cellulaires de vigne, 20 min après le traitement (◆). La production d' H_2O_2 est mesurée par la méthode de chimioluminescence du luminol. **D**, cinétique de production des FAO dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par la laminarine (10 mg/g PFC ; ◆) ou témoins (○). **E**, détection de deux MAPK dans des cellules de vigne traitées par la laminarine (10 mg/g PFC) par western blot avec un anticorps anti-MAPK inactives humaines. **F**, cinétique d'activation des deux MAPK détectées avec un anticorps anti-MAPK activées humaines. Les protéines (15 μg) ont été extraites des cellules puis séparées par SDS-PAGE 12% avant d'être transférées sur membrane.

L'ensemble de ces résultats montre donc que la laminarine active tous les événements précoces analysés ici. Cependant, cette activation paraît rapide, transitoire et, à l'exception des MAPK, l'intensité des effets est relativement faible comparée à T4BcPG1. Nos collaborations établies au sein du RVVS nous ont permis d'obtenir des résultats complémentaires concernant l'expression de gènes de défense et la quantification des produits de certains de ces gènes, ou de leur métabolites.

2-2 Expression de gènes de défense et mort cellulaire

Le Dr. A. Aziz (Université de Reims) nous a fourni les résultats concernant l'expression de gènes de défense dans des suspensions cellulaires de vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay, culture provenant de notre laboratoire) traitées par la laminarine (10 mg/g PFC). Quelques-uns de ces résultats sont présentés succinctement ici pour compléter l'étude des réactions de défense induites par la laminarine sur la vigne.

2-2-1 Expression de gènes de défense

L'analyse de l'expression de 5 gènes de défense par RT-PCRq (Figure 45) montre que le taux de transcrits de tous les gènes étudiés (excepté *HSR*) augmente dans les cellules de vigne traitées par la laminarine. Néanmoins, des différences existent quant à la cinétique et au nombre relatif de ces transcrits selon le gène étudié. Ainsi, les transcrits du gène *VST1* (Figure 45 A) s'accumulent dès 1 h de traitement, atteignent un maximum après 5 h (20 fois le taux d'ADNc présents dans les cellules T_{0h}), avant de diminuer progressivement jusqu'à la fin de l'expérience (25 h). Ici aussi, les résultats obtenus par northern blot sont en accord avec ceux de la RT-PCRq (encart Figure 45 A). L'augmentation des transcrits *CHIT1b* (Figure 45 B) dans les cellules de vigne est rapide, intense (le taux d'ADNc présents dans les cellules après 5 h et 10 h de traitement est respectivement de 100 fois et 140 fois le taux d'ADNc présents dans les cellules T_{0h}). Après 25 h de traitement, le taux de transcrits dans les cellules traitées est encore d'environ 60 fois celui des cellules témoins à 0 h. L'expression des gènes *PR-6* (inhibiteur de protéases) et *GLU1* est tardive puisque l'accumulation des transcrits correspondants n'est détectable qu'après 10 h de traitement (Figure 45 C et D). Le taux de ces transcrits est néanmoins très élevé puisqu'il

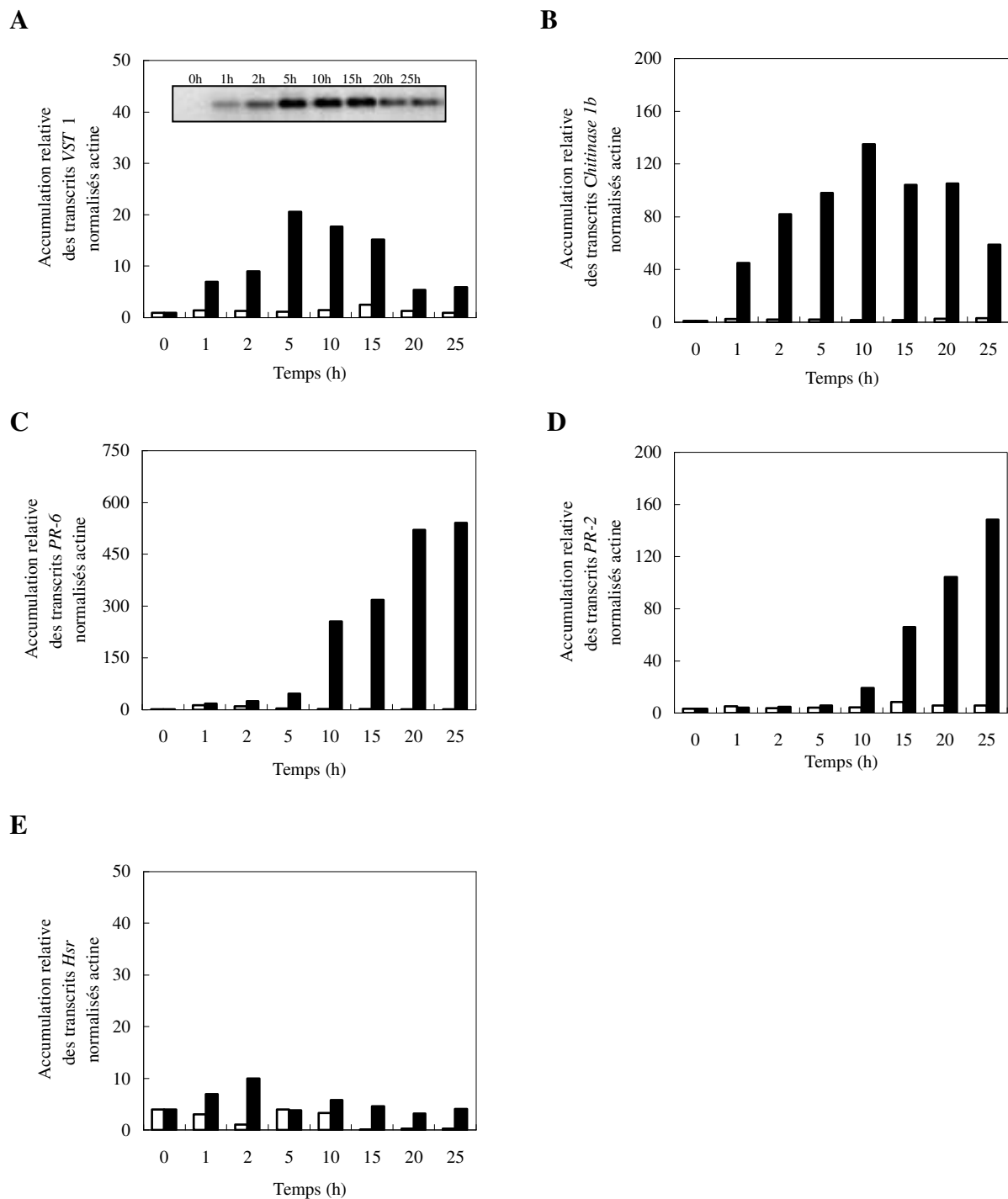


Figure 45 : Analyse de l'expression de gènes de défense dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par la laminarine.

Analyse par RT-PCR quantitative de l'accumulation des transcrits des gènes codant la stilbène synthase (*VST 1* ; **A**), la chitinase 1b (*PR-3* ; **B**), une protéine inhibitrice de protéase à sérine (*PR-6* ; **C**), une β -1,3-glucanase (*PR-2* ; **D**) et HSR (**E**), dans des cellules de vigne traitées par la laminarine (10 mg/g PFC ;■) ou non traitées (□). Pour chaque échantillon, le nombre d'ADNc d'un gène de défense est rapporté à celui de l'actine puis exprimé en fonction du rapport existant dans les cellules témoins au temps 0, arbitrairement fixé à 1.

atteint après 25 h, pour *PR-6* et *GLU1*, respectivement 550 et 150 fois le taux de transcrits dans les cellules témoins au temps 0 h. Des résultats récents obtenus par les Dr. A. Aziz et M. Adrian indiquent que l'expression de gènes en réponse à la laminarine est corrélée à l'apparition des produits correspondants (augmentation du taux de chitinases, de β 1-3 glucanases, production de phytoalexines).

Chez le tabac, *HSR203* est un gène induit pendant la HR pour réprimer la mort cellulaire (Pontier *et al.*, 1998b ; Tronchet *et al.*, 2001). La Figure 45 E montre que les transcrits *HSR* ne s'accumulent quasiment pas dans les cellules traitées par la laminarine. Dans le but de confirmer l'éventuelle relation existant entre l'expression de ce gène et la mort cellulaire chez la vigne, cette dernière a été mesurée après 24 h de traitement sur des suspensions cellulaires de vigne.

2-2-2 Mort cellulaire

La laminarine (10 mg/g PFC) n'induit pas la mort des cellules de vigne, après 24 h de traitement. En effet, la mort des cellules de vigne traitées par la laminarine est de l'ordre de 5% à 24 h, soit un pourcentage équivalent à celui des cellules témoins. Il est donc possible que l'expression de *HSR* soit également corrélée à l'induction de la mort cellulaire chez la vigne.

Globalement, tous les résultats obtenus concernant l'activation des réactions de défense de la vigne en réponse à la laminarine prouvent que ce composé peut être considéré comme un éliciteur n'induisant pas de mort cellulaire. Nous avons voulu vérifier si le traitement de la vigne avec cette molécule induisait une protection vis à vis de pathogènes. Ainsi, au sein du RVVS, plusieurs tests de protection de la vigne ont été initiés en utilisant principalement deux pathogènes de la vigne : *Botrytis cinerea* (Reims) et *Plasmopara viticola*, l'agent du mildiou (Dijon). Le but étant d'une part, de vérifier si les activités élicitrices au niveau cellulaire pouvaient être corrélées à une protection et, d'autre part, dans l'hypothèse d'une protection induite, de transférer les résultats obtenus au laboratoire à des applications au vignoble.

3 Protection induite par l'utilisation d'éliciteurs

Nous avons démontré la capacité de différentes molécules à activer les réactions de défense de cellules de vigne en suspension. Le premier test de protection réalisé fut donc un test de protection sur cellules. Nous voulions effectivement développer un test rapide et limiter au maximum les problèmes liés au changement de matériel végétal (hétérogénéité des résultats obtenus sur plantes, problème de pénétration d'une molécule dans une plante ligneuse). Par la suite, d'autres tests de protection sur feuilles et plantules ont été développés.

3-1 Test de protection sur cellules

Ce test consiste à traiter pendant 1 h des cellules de vigne en suspension avec des molécules élicitrices, avant de les déposer sur milieu nutritif gélosé. Après 15 jours de culture en chambre climatisée, un tapis cellulaire homogène est obtenu. Il est alors inoculé par 200 conidies de *Botrytis cinerea* (souche K1 ou V940) dont le développement est suivi pendant 7 à 15 jours, en fonction des expériences. Ce test a été réalisé avec la laminarine et le filtrat de culture pré-purifié de la souche T4 (§ 2-2). La quantité d'éliciteur nécessaire pour ce test étant importante, il n'a, à ce jour, pas encore été réalisé avec T4BcPG1, éliciteur dont la purification n'aboutit généralement qu'à l'obtention de 50 à 100 µg de protéine pure à partir de 4 L de filtrat.

3-1-1 Filtrats de culture de la souche T4 de *Botrytis cinerea*

Avant d'interpréter des résultats obtenus en présence de cellules de vigne élicitées, nous avons vérifié que le filtrat de culture de la souche T4 n'avait pas d'effet direct sur le développement de *Botrytis cinerea* (souche K1) utilisé pour infecter les cellules, feuilles ou plants de vigne. Une inhibition du développement du champignon par des enzymes, des toxines ou des antibiotiques était à vérifier. Les résultats (Figure 46 A, a et b) montrent que le développement de la souche K1 n'est pas inhibé par le filtrat pré-purifié de la souche T4.

Les résultats du test de protection (Figure 46 A, c-e) réalisé avec des cellules traitées par le filtrat de culture T4 à 50 ng de protéines/g PFC (d) ou 500 ng/g PFC (e) révèlent un développement de *Botrytis cinerea* très limité sur les cellules de vigne préalablement élicitées.

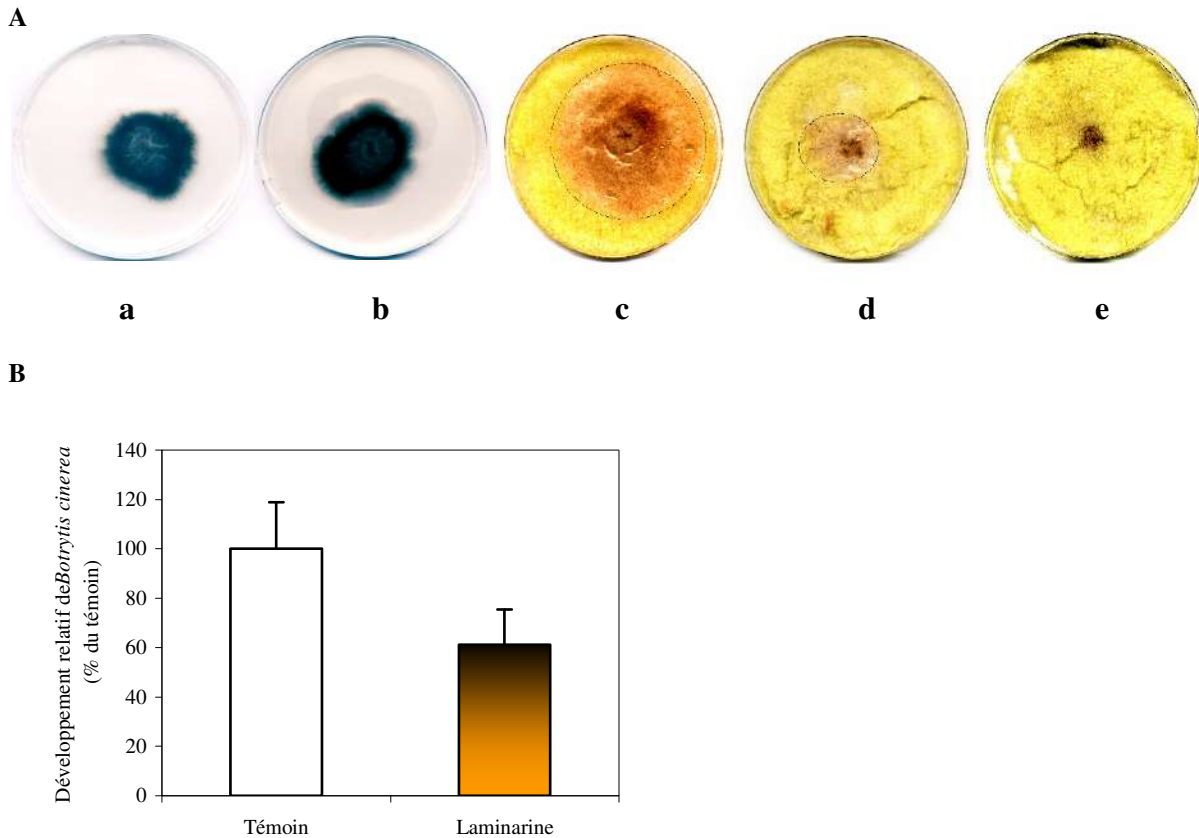


Figure 46 : test de protection sur cellules.

A, test de protection réalisé avec le filtrat de culture pré-purifié de la souche T4.

a-b, effet direct du filtrat de culture de la souche T4 sur le développement de la souche K1 de *Botrytis cinerea*. Deux cents conidies de *Botrytis cinerea* (K1) sont déposées sur le milieu gélosé Nitsch-Nitsch additionné de 2 µg de protéines provenant du filtrat de culture prépurifié de la souche T4 (**b**) ou sur un milieu témoin contenant le même volume de tampon (**a**).

c-e, développement de *Botrytis cinerea* (K1) sur des cellules de vigne préalablement traitées par le filtrat de culture de la souche T4. Les cellules de vigne en suspension sont traitées par des concentrations croissantes de protéines (**c** : 0 ng/g PFC ; **d** : 50 ng/g PFC ; **e** : 500 ng/g PFC) provenant du filtrat de culture de la souche T4, mises en culture pendant 15 jours sur milieu Nitsch-Nitsch gélosé, puis inoculées par 200 conidies de *Botrytis cinerea* souche K1. Les images **a-b** ont été réalisées 6 jours après dépôt des conidies et les images **c-e** représentent le développement de *Botrytis cinerea* (K1) 10 jours après inoculation des conidies. Toutes les images sont représentatives des résultats obtenus sur 4 boîtes et sur deux tests indépendants.

B, test de protection réalisé avec des cellules de vigne traitées par la laminarine (10 mg/g PFC) ou non traitées (Témoin). Les cellules de vigne en suspension sont traitées pendant 1 h, réparties sur 4 boîtes de Pétri contenant le milieu Nitsch-Nitsch gélosé, cultivées pendant 15 jours, puis inoculées par 200 conidies de *Botrytis cinerea* (V940). Après 7 jours de culture, deux mesures du diamètre de développement de *Botrytis cinerea* sont réalisées pour chaque boîte. Les résultats représentent la moyenne du diamètre de développement du champignon sur cellules traitées rapportée au développement moyen sur cellules témoins (en %).

Sur les cellules en culture non traitées (c), le diamètre du mycélium atteint en moyenne 6 cm, 10 jours après inoculation. Par contre, la croissance du champignon est fortement inhibée sur les cellules traitées par le filtrat T4 et cette inhibition est dépendante de la concentration en protéines du filtrat : une concentration de 50 ng de protéines/g PFC réduit le diamètre de développement du mycélium à environ 2,5 cm après un même temps de culture et une concentration de 500 µg de protéines/g PFC réduit le diamètre du mycélium à 1 cm en moyenne.

3-1-2 Laminarine

Ce test de protection sur cellules a aussi été réalisé avec la laminarine, molécule dont nous avons préalablement vérifié les capacités d'induction de réactions de défense sur suspensions cellulaires de vigne (§ 2). Les résultats exposés Figure 46 B montrent que, 7 jours après inoculation des conidies, le diamètre de développement de *Botrytis cinerea* est réduit d'environ 40% sur les cellules traitées par la laminarine (10 mg/g PFC) par rapport aux cellules non traitées.

Ce test sur cellules permet donc de mettre en évidence la protection induite par l'utilisation d'éliciteurs simplement en mesurant le développement d'un pathogène comme *Botrytis cinerea*. Cependant ces effets ne sont observables qu'à une température défavorable au développement de *Botrytis cinerea* (supérieure à 26°C). En effet lorsque ces tests sont réalisés à 20°C, le développement du champignon est très rapide et il n'y plus de différence visible entre les cellules traitées et les cellules témoins. Aussi, d'autres tests de protection sur feuilles ou plants de vigne, qui confirment la protection induite par la laminarine, ont été développés au sein du RVVS. Les résultats obtenus par nos collaborateurs seront abordés dans la discussion.

IV. DISCUSSION

La souche T4 de *Botrytis cinerea* produit un éliciteur des réactions de défense de la vigne : l'endopolygalacturonase 1

L'objectif de ce travail était d'une part, de trouver un (ou des) éliciteur(s) actif(s) sur la vigne, et d'autre part, d'étudier les réactions de défense de cette plante.

L'étude de la pathogénie de différentes souches (V940, K1, T4) de *Botrytis cinerea*, sur feuilles de vitro-plants de vigne, a mis en évidence un développement du champignon très différent en fonction des souches, la souche T4 étant la moins virulente. Ces résultats obtenus sur feuilles de *Vitis rupestris*, une espèce considérée comme relativement résistante, ont été confirmés sur des plants de vigne *Vitis vinifera* cv Chardonnay, un cépage sensible. Il semble donc que la faible virulence de la souche T4 ne soit pas directement liée à l'espèce de vigne utilisée.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Derckel *et al.* (1999) qui ont montré que la virulence réduite de la souche T4 par rapport à la souche T8 (également collectée sur la tomate), sur feuilles de vigne (*Vitis vinifera* cv Chardonnay), est associée à une plus forte accumulation de phytoalexines, d'activités chitinases et β -1,3-glucanases. Cette différence d'effets est aussi observée avec les filtrats de culture des souches correspondantes. Ces observations laissaient supposer que la faible virulence de la souche T4 pouvait être associée à une forte production d'éliciteurs. Dans un premier temps, le but de notre étude fut donc de vérifier si cette souche de *Botrytis cinerea* (T4) produisait bien des éliciteurs capables d'activer fortement les réactions de défense de la vigne.

Ainsi, nous avons comparé les événements précoces des réactions de défense de la vigne induits par les filtrats de culture des trois souches de *Botrytis cinerea* précédemment citées. En particulier, nous avons étudié, dans des suspension cellulaires de vigne, quatre événements

induits par des éliciteurs et bien caractérisés dans d'autres modèles : la production de FAO, l'activation de protéines kinases, l'efflux de nitrate et la mort cellulaire (Nürnberger *et al.*, 1994 ; Pugin *et al.*, 1997 ; Yang *et al.*, 1997 ; Binet *et al.*, 1998 ; Blumwald *et al.*, 1998 ; Lebrun-Garcia *et al.*, 1999 ; Mc Dowell et Dangl, 2000 ; Wendehenne *et al.*, 2002).

Sur suspensions cellulaires de vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay) et pour une même concentration en protéines totales, le filtrat pré-purifié de la souche T4 induit des réponses plus intenses et plus longues que celles provoquées par les filtrats pré-purifiés des deux souches V940 et K1.

Les filtrats de culture V940 et K1 induisent une production de FAO intense et transitoire (qui se termine après 120 min de traitement), alors que celle causée par le filtrat T4 fait apparaître une seconde phase, à partir de 90 min de traitement, qui se prolonge au-delà de trois heures de traitement. L'apparition de cette seconde phase semble spécifiquement induite par des pathogènes avirulents. Par exemple, l'inoculation de cellules de soja avec des souches de *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* virulentes ou avirulentes provoquent toujours une première phase de production de FAO rapide et intense mais seules les souches avirulentes induisent une seconde phase prolongée entre 3 h et 10 h après le début du traitement (Orlandi *et al.*, 1992 ; Baker et Orlandi, 1995). Cette cinétique à deux phases a également été observée dans des suspensions cellulaires de tabac inoculées avec une souche de *Pseudomonas syringae*, non pathogène sur cette plante (Atkinson *et al.*, 1990). Cette seconde phase de production de FAO est liée à l'expression d'un gène *Avr* du micro-organisme puisque le transfert des gènes *Hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) dans la bactérie saprophyte *Pseudomonas fluorescens* provoque l'apparition de cette seconde phase (Glazener *et al.*, 1996). Pour certains auteurs, la première phase du burst oxydatif serait une réponse non spécifique et la seconde dépendrait de la production d'éliciteurs (Lamb et Dixon, 1997).

L'activation de protéines kinases dans des cellules de vigne traitées par chacun des trois filtrats de culture diffère aussi en fonction des souches utilisées. Pour une même quantité de protéines totales, le filtrat de culture pré-purifié de la souche T4 provoque la plus forte activation des deux protéines kinases.

Seul le filtrat T4 induit un efflux de nitrate réponse dans des suspensions cellulaires de vigne. Chez des tabacs traités par la cryptogéine, cet événement est impliqué dans la mort cellulaire de type hypersensible puisque l'inhibition transitoire de cet efflux de nitrate par des inhibiteurs de canaux anioniques retarde l'apparition de la mort cellulaire (Wendehenne *et al.*, 2002). Or, dans notre modèle d'étude, ce sont les suspensions cellulaires de vigne traitées par le filtrats T4 qui présentent le plus fort taux de mort cellulaire à 24 h. Il semble donc que nous ayons également une corrélation entre l'efflux de nitrate et la mort cellulaire. Celle-ci n'a cependant pas pu être démontrée dans notre modèle car tous les inhibiteurs de canaux anioniques testés se sont révélés inefficaces ou toxiques pour les suspensions cellulaires de vigne.

Pour résumer, la production de FAO, l'activation de deux protéines kinases, l'efflux de nitrate et la mort cellulaire induits par le filtrat de la souche T4 dans des suspensions cellulaires de vigne suggèrent que cette souche produit un (des) éliciteur(s) de réactions de défense. La plus forte intensité des effets provoqués par le filtrat T4 indique que les souches V940 et K1 produisent probablement moins d'éliciteurs, ou d'autres moins efficaces. Cette hypothèse pourrait expliquer la différence de virulence de ces souches observée sur feuilles de vigne.

Ces premières observations nous ont amenés à entreprendre la purification d'un éliciteur à partir du filtrat de culture de la souche T4. L'analyse biochimique de l'activité élicitrice présente dans le filtrat de culture de cette souche laissait supposer que cette activité était due à une glycoprotéine. Ce résultat a guidé notre stratégie de purification vers des méthodes de chromatographie sur colonne : échanges d'ions et gel d'exclusion.

Ces étapes de purification nous ont permis de conclure que le filtrat d'une culture de 14 jours ne contenait qu'un seul éliciteur capable d'induire la production de FAO dans les suspensions cellulaires de vigne, différent du polysaccharide de très haute masse moléculaire détecté. Pourtant, des travaux indiquent qu'un glucane et des hétéropolysaccharides produits par *Botrytis cinerea* ont une activité élicitrice (Kamoen, 1984). Nous n'excluons pas que le polysaccharide de T4 soit capable de provoquer la synthèse de phytoalexines mise en évidence chez la laitue, le haricot et le bégonia (Kamoen, 1984). Mais, il se peut aussi que la structure chimique de ces sucres soit différente d'une souche à une autre, d'une condition de culture à une autre, ou que leur activité élicitrice ne se manifeste que sur des espèces végétales bien définies.

		10	20	30	40	50	60	70	
EcPG	> 1	~~~~~SD	SRTVSEPKTP	SSCTTLKADS	STATSTIQKA	LNNCDQ GKAV	RLSAGSTSVF	LSGPLSLPSG	62
BcPG2	> 1	~~~~~	~~~~~	~~~~~MVHITS	LISFLASTAL	VSAAPGSAPA	DLDRRAGCTF	STAATAIASK	46
CpPG	> 1	~~~~~	~~~~~MFSTLL	LAALLPLIQA	APAPAVTPAA	HLEDRAKSC	TFTDAAAVSK	SKASCATITL	56
BcPG5	> 1	~MVKFSACLL	LGGLSALASA	LPAAPAPATA	APDLDKRATT	CTFSGSGGAS	SASKSKTSCS	TIILSALAVP	69
SsPG2	> 1	MVNLSAPLIL	GGLSALASAL	PAAAPAPTAA	PDLAKRATTC	TFSGSSGAAS	ASKSKASCAT	IVLSALAVPS	70
BcPG1	> 1	~~~~~M	VQLLSMASGL	LALSAIVSAA	PAPAPATAAPN	PAEALAAIEQ	RGTACTIONSGS	GGAAAASKSK	61
SsPG1	> 1	~~~~~M	VEILSSALS	LRLGAAVSAA	PAPAPATAAPN	VADALAAVEK	RAGSCTFSGS	SGAAAAIKSK	61
PoPG	> 1	~~~~~	~~~~~MAGSKL	LMGLGFAL	VHALPEPACA	QVTAAPKLEE	RATSCCTFSGS	AGASSASKSK	57
PgPG	> 1	~~~~~	~~~~~MASS	LKLGLIALLG	ATAVNAAPAA	EPVLGTSLLT	SRASCTFSGS	SGAAEAIKSK	54
		80	90	100	110	120	130	140	
EcPG	> 63	VSLLDKGV	LRAVNNAKSF	ENAPSSCGVV	DKNGKGCDAF	ITAVSTTNSG	IYGPGTI~D	GQG~~GVKLQ	128
BcPG2	> 47	TTCSTITLDS	VVVPAGTTLD	LTGLKTGTV	IFQGTATFGY	SEWEGPLISI	SGQDIVV~T	GAS~~GNKID	112
CpPG	> 57	NNIAPVSGTT	LDLTKLNSGT	KVIFAGTTSF	GKKEWEGPLI	SVSGTDIEVT	GASGHI~D	NGN~~A~~~	118
BcPG5	> 70	SGTTLDLTGL	TKGTTVIFEG	ITTFGYEWS	GPLVSVSGTD	ITVTQTTGAY	LDGGGASYWD	EGSGNGGKTK	139
SsPG2	> 71	GTTLDLTGLT	QGTKVSVYQR	VVIFEGITTF	GYEWSGSLV	SVSGTDITVT	QSGSAYL~D	GKG~~A~~~	132
BcPG1	> 62	ASCATIVLSA	LSVPSTGTTLD	LTGLKSGTV	IFEGTTTFGY	EEWSGPLFSV	SGTDITV~K	GAS~~GSKLD	127
SsPG1	> 62	ASCATIVISA	VAVPSGTTLD	LTGLKSGTHV	VFEGTTTFGY	EEWYGTLSV	SGTDITV~T	GTS~~GSVLD	127
PoPG	> 58	TACATIVLSA	VAVPSGTTLD	LTGLNDGTTV	IFEGTTTFGY	KEWSGPLVSV	SGTDITV~K	GAS~~GATLN	123
PgPG	> 55	TSCSTITLSN	VEVPAGTTLD	LTGLKSGTTV	IFEGTTTFGY	KEWEGPLVSV	SGTSITV~Q	GAS~~GAQLN	120
		150	160	170	180	190	200	210	
EcPG	> 129	DKKVSWEW~	AADAKVKKLK	QNT~P~RLIQI	NK~SKN~FTL	YNVSLINSPN	FHVVSFDG~	~~~~DGFTAW	188
BcPG2	> 113	GGGARWWDGL	GSNVSAGKVK	VK~P~KFFSA	HKLTS~SSI	TGLNFLNAPV	QCISIGQS~	~~~~VGLSLI	173
CpPG	> 119	~~~~AWW~	~DGEKSGNGG	KTKP~KMFYA	HS~LKQ~STI	HNLKVNTPV	QFMSINSA~	~~~~TDLNVI	170
BcPG5	> 140	PKFFYAHSL~	ISSTIENLYF	YNP~PVQVMSI	NS~ATD~LTV	SGVT~INA~	~~~~QDG~	~~~~D~~~	187
SsPG2	> 133	~~~~SYW~	~DGEKSGNGG	KTKP~KFFAA	HN~LIS~STI	ENIYILNPPV	QVFSIDNA~	~~~~NGLTIN	184
BcPG1	> 128	GQGAKEYW~	~DGKGTNGG	KTKP~KFFYA	HS~LKGKSTI	SGINILNSPV	QVFSINGA~	~~~~SGLTIS	184
SsPG1	> 128	GNGAKYW~	~DGKGTNGG	KTKP~KFFYA	HS~LKGKSSI	NNVKILNSPV	QVFSINSA~	~~~~SGLTIS	184
PoPG	> 124	GDGSRWW~	~DGKSGNGG	KTKP~KFFYA	HK~MFS~STI	SDIHI~NSPV	Q~VFSINGAT	DLTSLGTTVD	184
PgPG	> 121	GDGARWW~	~DGKGTNGG	KTKP~KFFYA	HS~LTN~SKI	ENIYIKNSPV	QVFSINGA~	~~~~KELTIS	176
		220	230	240	250	260	270	280	
EcPG	> 189	~~~~KTTIK	TP~~~~STA	~~~RNTDGD	PMSSKNITIA	YSNIATGDDN	VAIKAYKGRA	ETRNISILHN	245
BcPG2	> 174	~~~~~NINID	NSAGDAGSLG	~~~HNTDAFD	INLSQNIFFIS	GAIVKNQDDC	VAVNSG~~~~	~TNITFTGG	229
CpPG	> 171	~~~~~DVTMD	NS~~~~AGA	SKGHNTDAFD	VGSSSENIYIS	GAVINNQDDC	LAINSG~~~~	~TNITFTSG	224
BcPG5	> 188	~~~~~SYW~	~DGEKSGNGG	~~~ANTDGD	IGSSTTVTIT	GANVYNQDDC	VAINSG~~~~	~TGITFTSGG	233
SsPG2	> 185	NVTINASAGD	TG~~~~SLG	~~~HNTDGD	IGDSTSVTIT	GANVYNQDDC	VAINSG~~~~	~TGITFTSGG	240
BcPG1	> 185	~~~~~NINID	NSAGDAGSLG	~~~HNTDAFD	VGSSSDITIS	GAVVKNQDDC	LAINSG~~~~	~TGITFTGG	240
SsPG1	> 185	~~~~~GITID	NSA~~~~GNSLG	~~~HNTDAFD	VGSSTDITIS	GANVQNDQDC	LAINSG~~~~	~TGITFTGG	238
PoPG	> 185	~~~~~NRDGD	TD~~~~EGG	~~~HNTDAFD	VGSSTGITIT	GATVYNQDDC	LAVNSG~~~~	~TDITFTGG	235
PgPG	> 177	~~~~~GITVD	TADG~DSNGG	~~~HNTDAFD	VGSSNGVYIT	SPIVHNQDDC	LAVNSG~~~~	~TNVHTFGA	231
		290	300	310	320	330	340	350	
EcPG	> 246	DFGTGHGMSI	GSE~~~~TMG	VYNVTVDDLK	~~~~~MN	GTT~~~~NG	LRIKSDKSAA	GVVNGVRYSN	298
BcPG2	> 230	NCSGGHGLSI	GS~~~~VGG	RSGETANDVK	DVRFLSSTVQ	KST~~~~NG	VRKTVSGAT	GSVSGVTFQD	289
CpPG	> 225	SGTGGHGLSI	GSVGGRSNDT	VKTVSIITNSK	~~~~~II	NSQ~~~~NG	VRKTVYDAT	GSVSDVTYSG	281
BcPG5	> 234	VCSGGHGLSV	GSVGGRRDNI	VETVLFENSE	~~~~~IK	ASQ~~~~NG	IRIKTISGDT	GTVSGITYSG	290
SsPG2	> 241	VCSGGHGLSV	GSVGGRRDNI	VQTVNFENSE	~~~~~IK	NSQ~~~~NG	VRKTVSGDT	GTVSGVTYSG	297
BcPG1	> 241	TCSGGHGLSI	GS~~~~VGG	RSNDTVSDII	~~~~~IE	SSTVKNSANG	VRKTVSGAT	GSVSGVTYKD	297
SsPG1	> 239	TCSGGHGLSI	GSVGGRSNDV	VSDVIESST	~~~~~VK	NSA~~~~NG	VRKTVSGAT	GSVSGVTYKD	295
PoPG	> 236	LCSGGHGLSI	GSVGGRSND	VANVIESNSQ	~~~~~IQ	DST~~~~NG	VRKTVYEAT	GSVKNVITYKD	292
PgPG	> 232	QCTGGHGLSI	GSVGGRSNDT	VDGVTVESCT	~~~~~IK	DSD~~~~NG	VRKTVYGAT	GAVQGVITYKD	288
		360	370	380	390	400	410	420	
EcPG	> 299	VVMKNVAK~P	IVIDTVYEKK	EGSNVPDWS	ITFKDVTSET	KGVVVLNGEN	AKKPIEVTMK	NVKLTSDSTW	367
BcPG2	> 290	ITLIGIT~G	VGIDVQDDYQ	NGSPTGTPTN	GVPTIGLTMN	NVHGNVIGGQ	NTYILCANCS	GWTWNKVAVT	357
CpPG	> 282	ITLSGITNYG	IVIEQDYENG	SPTGTPTTGV	PITGLTVSKV	TGSVASSATD	VYILCGKGSC	SGWKWSGNSV	351
BcPG5	> 291	ITLSGITDYG	ITVNQAYDGT	SGETNGVAI	SKFILENITG	TVESTATNIL	IECGSGSCTD	WTWTDVSVTG	360
SsPG2	> 298	ITLSGITDYG	IIVNQAYNGN	AGSPTNGVAI	SKFILDNVGT	TVESGATNIY	IECGSGSCTN	WTWSGVSVTG	367
BcPG1	> 298	ITLSGITSYG	VVVQDDYKNG	SPTGTPTSGV	PITDVTFSNV	KGTVASGATN	VYVLCACKSG	WSWDVSVSGG	367
SsPG1	> 296	ITLSGITSYG	VVIEQDYENG	SPTGKPTSGV	PITGVTLNV	HGTVSSSATN	VYVLCACKSG	WTWDVNVTTG	365
PoPG	> 293	ITLSGITKYG	IVIEQDYENG	SPTGTPTDGV	PITDLTLDDV	KGTVASSGTN	VYILCAEGAC	SDWTWDGVSV	362
PgPG	> 289	ITLSGIKAYG	IVIEQDYENG	SPTGTPTSGV	PITDLTLNDV	HGTVASSGVD	TYILCAGSAC	SDWSWSGVS	358
		430	440	376					
EcPG	> 368	QIKNVNVKK~	~~~~~	376					
BcPG2	> 358	GGTVKKACAG	IP TGASC~	374					
CpPG	> 352	TGKKSSSCK	NIPSGASC~	369					
BcPG5	> 361	GKTSSSCLNV	PTSGGVSCSL	380					
SsPG2	> 368	GKTSTSCLV	PTSGGVSCSL	387					
BcPG1	> 368	KTSKSCAGLP	SGVKC~	382					
SsPG1	> 366	KTSKSCAGLP	SGVKC~	380					
PoPG	> 363	SGGKTSSACE	NVPSSASC~	380					
PgPG	> 359	TGGQTSKCK	GIPSGASC~	376					

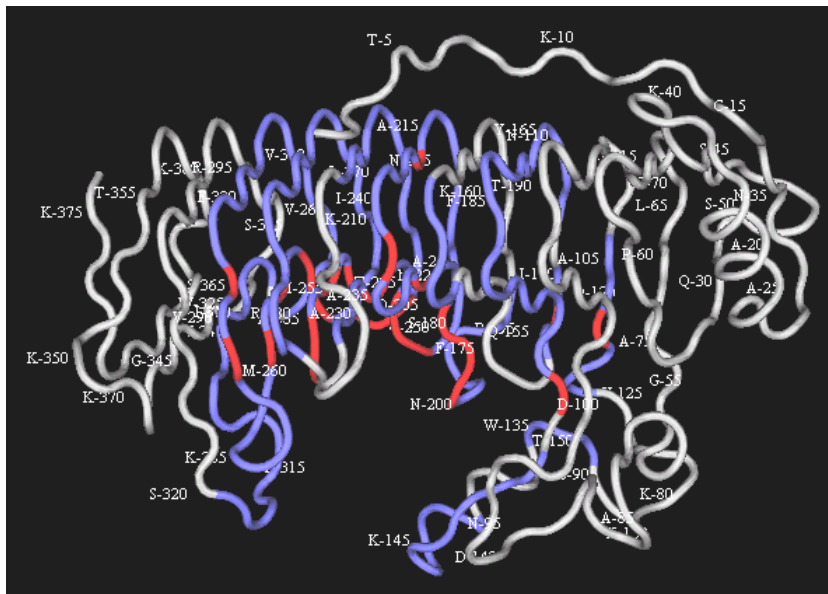
Figure 47 : alignement de la séquence en acides aminés de neuf polygalacturonases microbiennes.

Les acides aminés sont repérés par le code international à une lettre. Les acides aminés conservés dans les 9 séquences sont colorés en rouge. Séquences de polygalacturonases d'*Erwinia carotovora* (EcPG), de *Botrytis cinerea* (BcPG1, BcPG2, BcPG5), de *Cryphonectia parasitica* (CpPG), de *Sclerotinia sclerotiorum* (SsPG1 et SsPG2), de *Penicillium olsonii* (PoPG) et de *Penicillium griseoroseum* (PgPG). ~ : jonction.

L'éléciteur purifié correspond à une glycoprotéine de 40 kD, de pI basique et contenant des ponts disulfures dont nous avons montré l'importance pour l'activité élicitrice. Ce premier résultat est à rapprocher de ceux obtenus avec d'autres éliciteurs (glyco)protéiques. Ainsi, les élicitines sont des petites protéines extra-cellulaires produites par différents *Phytophthora*, contenant des ponts disulfures, et dont les plus actives ont des pI basiques (Ricci *et al.*, 1989 ; Bonnet *et al.*, 1996). Par ailleurs, la mégaspermine, produite par *Phytophthora megasperma*, est aussi une glycoprotéine qui contient des ponts disulfures impliqués dans son activité élicitrice (Baillieul *et al.*, 1995). De la même façon, les ponts disulfures d'Avr9 sont indispensables à son activité élicitrice (Van den Hooven *et al.*, 2001). Pep-13, un peptide éliciteur, est également issu d'une glycoprotéine de 42 kD produite par *Phytophthora megasperma* (Nürnberg *et al.*, 1994). Il semble donc que l'éléciteur que nous avons purifié ait des propriétés physico-chimiques proches d'autres éliciteurs connus.

Les micro-séquences, obtenues à partir de l'analyse Q-TOF en spectrométrie de masse des cinq peptides issus de la digestion trypsique de l'éléciteur, ont permis d'identifier la protéine élicitrice comme l'endopolygalacturonase 1 de *Botrytis cinerea* (BcPG1). Le gène *Bcpgl* a été séquencé par Ten Have et ses collaborateurs (1998). Il compte 1146 nucléotides et code une protéine prédite de 382 acides aminés possédant un peptide signal et dont le pI serait de 8,07 et la masse moléculaire de 33,7 kD, si la protéine subit un processus de maturation. Nous avons ensuite obtenu des informations complémentaires sur les polygalacturonases microbiennes et notamment sur le site catalytique et son mode d'action. Nous avons commencé par réaliser un alignement des séquences peptidiques de 9 polygalacturonases dont BcPG1 (Figure 47). L'analyse de cet alignement multiple met en évidence 24 acides aminés totalement conservés parmi lesquels on retrouve les 8 acides aminés toujours présents dans les polygalacturonases microbiennes (N235, D237, D258, D259, H286, G287, R332 et K334). Lorsque cet alignement est utilisé pour replacer les acides aminés strictement conservés au sein de la structure tridimensionnelle de l'endopolygalacturonase d'*Erwinia carotovora* (Figure 48 A), le site actif de l'enzyme semble se dessiner puisque la quasi totalité de ces 24 amino-acides se retrouve dans une poche au centre de la protéine. La recherche des résidus impliqués dans l'activité enzymatique de l'endopolygalacturonase II d'*Aspergillus niger* a été préalablement réalisée par

A



B

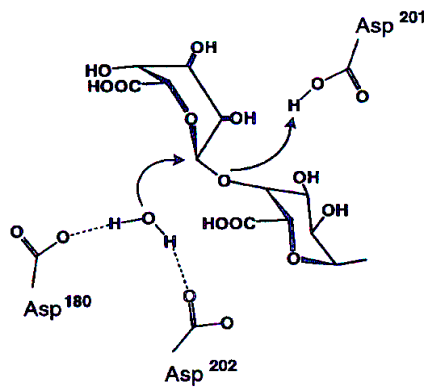


Figure 48 : Structure tri-dimensionnelle et mécanisme catalytique des endopolygalacturonases

A, structure tri-dimensionnelle de l'endopolygalacturonase d'*Erwinia carotovora*. Les acides aminés sont représentés par le code international à une lettre. Les acides aminés colorés en rouge sont strictement conservés dans les 9 séquences présentées Figure 46. En gris, les amino-acides qui diffèrent entre les séquences des 9 polygalacturonases. En bleu, les acides aminés dont les caractéristiques physico-chimiques sont conservées dans les 9 séquences de polygalacturonases. **B**, mécanisme catalytique des endopolygalacturonases proposé par Van Santen *et al.* (1999). Asp²⁰¹ (numérotation de l'endopolygalacturonase d'*Aspergillus niger*) agit comme donneur de proton pendant que Asp¹⁸⁰ et Asp²⁰² activent la molécule d'eau servant à l'hydrolyse de la liaison osidique.

mutagenèse dirigée, sur 6 des 8 acides aminés toujours retrouvés dans les polygalacturonases (les 2 autres ayant des propriétés physico-chimiques qui les empêchent de participer à l'hydrolyse du substrat) (Van Santen *et al.*, 1999). Les résultats de cette étude montrent que seuls trois acides aminés sont impliqués dans le mécanisme catalytique proposé par les auteurs (Figure 48 B), ce sont les trois résidus d'acide aspartique D203, D224 et D225 dans la séquence de BcPG1 (Figure 23). Dans le mécanisme catalytique proposé, le groupe carboxylique de l'aspartate D201 (D224 chez BcPG1) joue le rôle d'un acide, donneur de proton à l'oxygène du pont glycosidique. Les deux autres résidus aspartate D180 et D202 (D203 et D225 de la séquence BcPG1) activent une molécule d'eau pour permettre l'attaque nucléophile sur le carbone anomérique du sucre. Deux autres acides aminés seraient, quant à eux, impliqués dans la fixation du substrat, il s'agit de l'arginine R279 et de la lysine K281 (dans la séquence BcPG1). Ces auteurs ont également montré que les 8 cystéines des endopolygalacturonases d'*Aspergillus niger* formaient toujours 4 ponts disulfures.

Nous avons vérifié que l'éliciteur purifié, identifié comme BcPG1 par analyse des bases de données, possédait bien une activité polygalacturonase. Cependant, il n'était pas exclu que la protéine élicitrice BcPG1 ne possède pas d'activité polygalacturonase puisque les 3 résidus aspartate impliqués dans le site catalytique des endopolygalacturonases n'avaient pas été séquencés en spectrométrie de masse. Dans ce cas, une des hypothèses suggérerait que la faible virulence de la souche T4 pouvait être liée à l'expression d'une BcPG1 inactive. En effet, Ten Have *et al.* (1998) ont montré que le gène *Bcpgl* était nécessaire à la virulence de *Botrytis cinerea* puisque le mutant contenant la délétion $\Delta Bcpgl$ présente une diminution de sa croissance sur feuilles et fruits de tomate (de 14% à 37% selon les tests). Nos résultats ont clairement démontré que T4BcPG1 était capable de dégrader l'acide polygalacturonique en sucres réducteurs dans une gamme de pH compris entre 3 et 7 avec un optimum à 5, infirmant ainsi notre hypothèse sur la faible virulence de la souche T4 mais confirmant l'identité de notre protéine élicitrice. Par la suite, le séquençage nucléotidique de l'ADNc *T4Bcpgl* a révélé que la protéine correspondante possédait bien les 8 acides aminés toujours retrouvés dans les polygalacturonases microbiennes, dont les trois résidus aspartate impliqués dans le site catalytique de l'enzyme.

Pour définitivement s'assurer que l'activité élicitrice était bien due à T4BcPG1 et non à un autre composé co-purifié, nous avons vérifié que la protéine BcPG1, obtenue par l'expression du gène correspondant dans un hôte hétérologue, portait bien cette activité élicitrice. Notre collaboration avec le Pr. F. Cervone (Universita di Roma, Italia) nous a permis d'obtenir une protéine BcPG1 produite par *Pichia pastoris* dont la séquence peptidique est très proche de celle de T4BcPG1 (378 acides aminés identiques sur 382). Nos résultats ont montré que BcPG1 avait les mêmes activités élictrices et enzymatiques qu'elle soit produite par *Pichia pastoris* ou *Botrytis cinerea*. Il ne subsiste donc plus d'ambiguïté quant à l'origine de l'activité élicitrice détectée dans les filtrats de culture de *Botrytis cinerea* souche T4.

Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que *Botrytis cinerea* possède 6 gènes codant des endopolygalacturonases (*Bcpg 1* à *6* ; Wubben *et al.*, 1999). Les protéines correspondantes ont des longueurs variant de 371 (BcPG6) à 515 acides aminés (BcPG3). Deux d'entre-elles auraient un pI basique (BcPG1 et BcPG2) alors que celui des quatre autres serait acide. Les séquences de ces 6 protéines présentent un polymorphisme important puisque les pourcentages d'identité, au niveau peptidique, varient de 35% (entre BcPG2 et BcPG3) à 73% (entre BcPG1 et BcPG5). De plus, l'expression des 6 gènes codant ces protéines semble être régulée par la source de carbone du milieu de culture (Wubben *et al.*, 2000). Ainsi, les ARNm de *Bcpg1*, *Bcpg2* et *Bcpg6* s'accumulent quelle que soit la source de carbone utilisée (glucose, pectine, acide galacturonique ou acide polygalacturonique), avec un taux de transcrits pour *Bcpg2* toujours plus faible que celui de *Bcpg1*. Les transcrits *Bcpg3* et *Bcpg5* s'accumulent uniquement en présence de glucose ou de pectine alors que le taux d'ARNm *Bcpg4* augmente en présence d'acide galacturonique ou polygalacturonique. Lors de purifications ultérieures de l'éliciteur, nous avons donc recherché s'il existait d'autres activités polygalacturonases dans les filtrats qui n'auraient pas été détectées par la production de FAO induite dans des suspensions cellulaires de vigne. Les résultats de cette étude ont montré qu'aucune autre activité polygalacturonase n'était détectable en dehors des fractions contenant l'activité élicitrice de T4BcPG1. Dans nos conditions de culture *in vitro* (saccharose 20g/L, pH initial de 6.0, température de 25°C), il est probable que BcPG1 soit la seule endopolygalacturonase produite par la souche T4.

L'obtention de la séquence nucléotidique de *T4Bcpgl* nous a aussi permis de comparer les séquences peptidiques de T4BcPG1 et SAS56BcPG1 (souche utilisée par l'équipe du Dr. J.A. Van Kan). Cette comparaison a révélé l'existence de mutations concernant 14 acides aminés. Aucune de ces mutations n'affecte un des acides aminés important pour l'activité polygalacturonase de la protéine. Il semble donc qu'il existe non seulement un polymorphisme au niveau des six polygalacturonases de *Botrytis cinerea* mais également entre les séquences d'une même polygalacturonase provenant de deux souches du champignon. Ce polymorphisme pourrait s'expliquer par l'existence de protéines inhibitrices de polygalacturonases (PGIP) produites par les plantes et qui ont pour rôle de prévenir la dégradation de la paroi végétale par les polygalacturonases fongiques (De Lorenzo *et al.*, 1993). Le polymorphisme observé pour les polygalacturonases de *Botrytis cinerea* pourrait avoir comme conséquence d'échapper à l'interaction physique avec les PGIP favorisant ainsi la virulence du champignon. Les PGIP sont des protéines contenant des LRR (leucine-rich repeat), motifs protéiques impliqués dans les interactions protéines-protéines, protéines-ligands et protéines-sucres souvent retrouvés dans les produits de gènes de résistance des plantes comme *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-9* et *Prf* de la tomate, *Xa 21* du riz, *FLS2*, *RPM1*, *RPS2* et *RPP5* d'*Arabidopsis thaliana* (Dangl et Jones, 2001). Les PGIP ont une forte variabilité fonctionnelle et structurale. Ainsi, les PGIP divergent par leur activité inhibitrice : certaines peuvent inhiber les polygalacturonases de différents champignons ou différentes polygalacturonases d'un même pathogène alors que d'autres sont spécifiques d'une seule polygalacturonase (De Lorenzo *et al.*, 2001). Par exemple, les 4 PGIP de haricot, qui diffèrent de 8 à 81 acides aminés, ont des capacités d'inhibition très différentes vis à vis des polygalacturonases de *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gleosporoides*, *Stenocarpella maydis* et *Aspergillus niger* et de *Fusarium moniliforme* (De Lorenzo et Ferrari, 2002). Ainsi, la PGIP2 de haricot est la seule capable d'inhiber les polygalacturonases de *Fusarium moniliforme* et le changement d'un seul acide aminé de la PGIP1 de cette plante lui confère la capacité d'interagir avec les polygalacturonases de ce champignon (Leckie *et al.*, 1999). A l'inverse, le changement d'un seul acide aminé dans la polygalacturonase de *Fusarium moniliforme* diminue voire annihile son affinité pour les PGIP (Federici *et al.*, 2001). En parallèle du polymorphisme observé dans les polygalacturonases, les motifs LRR, notamment présents dans les PGIP,

présentent des régions où apparaissent de fréquentes mutations qui permettraient d'interagir avec de nouveaux ligands apparus au cours de la co-évolution plantes-pathogènes (Dangl et Jones, 2001). Cependant, le polymorphisme de *Bcpg1* observé entre les souches T4 et SAS56 de *Botrytis cinerea* ne semble pas être généralisable puisque le récent séquençage du gène *Bcpg1* chez 12 souches de *Botrytis cinerea* fait apparaître que toutes les souches ont un gène *Bcpg1* identique soit à *T4Bcpg1*, soit à *V940Bcpg1*. Le gène *SAS56Bcpg1*, constituerait une exception puisque c'est un gène chimérique constitué de la partie 5' de *V940Bcpg1* et la partie 3' de *T4Bcpg1* (Dr. C. Levis, INRA Versailles, communication personnelle). Aussi, nous avons décidé de vérifier si l'endopolygalacturonase 1 d'une autre souche de *Botrytis cinerea* (V940) induisait les réactions de défense de la vigne pour essayer d'évaluer l'incidence éventuelle de ce polymorphisme sur l'activité élicitrice de cette protéine. Les résultats préliminaires de cette étude ont montré que V940BcPG1 a la même capacité que T4BcPG1 à induire la production de FAO dans des suspensions cellulaires de vigne. Mais, la souche V940 semble produire, dans nos conditions de culture *in vitro*, environ 10 fois moins de BcPG1 que la souche T4. Il conviendrait donc de vérifier si ces différences de production de BcPG1 entre différentes souches de *Botrytis cinerea* peuvent également être mesurées *in planta* pour éventuellement essayer de relier la production de cette protéine à la pathogénie de *Botrytis cinerea*.

En résumé, à ce stade, *Botrytis cinerea* produit un éliciteur, l'endopolygalacturonase 1 (BcPG1), qui induit la production de FAO chez la vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay) et il existe un polymorphisme au sein des endopolygalacturonases de *Botrytis cinerea* qui laisse présager un rôle important de ces protéines dans la virulence et/ou l'avirulence de ce champignon. En effet, bien que BcPG1 soit considéré comme un facteur de virulence de *Botrytis cinerea* sur la tomate ou la pomme (Ten Have *et al.*, 1998), nos premiers résultats suggèrent que cette protéine active les réactions de défense de la vigne et se comporte ainsi comme un éliciteur, produit d'un gène d'avirulence.

La suite de notre travail a consisté à étudier dans le détail les réactions de défense de la vigne activées par T4BcPG1 purifiée. En parallèle nous avons étudié les effets des OGA, produits de l'activité enzymatique des polygalacturonases pour tenter de connaître l'origine de

l'activité élicitrice de T4BcPG1. Le problème étant de savoir si l'activité élicitrice était due aux OG libérés par l'activité enzymatique ou à la protéine elle-même.

Voies de signalisation et réactions de défense induites par des éliciteurs chez la vigne

Les travaux concernant les réactions de défense activées en réponse à un éliciteur ont mis en évidence l'implication d'événements précoces (fixation à des sites de haute affinité, flux d'ions, dépolarisation de la membrane plasmique, phosphorylation de protéines, production d'H₂O₂ et de NO, dépolymérisation du cytosquelette) et plus tardifs (expression de gènes de défense, production de phytoalexines, de protéines PR, épaississement de parois et dans certains cas, mort cellulaire liée à la RH) (revues : Yang *et al.*, 1997 ; Blumwald *et al.*, 1998 ; Fritig *et al.*, 1998 ; Somssich et Hahlbrock, 1998 ; Lebrun-Garcia *et al.*, 1999 ; Heath, 2000 ; Dangl et Jones, 2001 ; Nürnberger et Scheel, 2001 ; Wendehenne *et al.*, 2001). Dans le cadre de nos connaissances actuelles des réactions de défense chez des plantes modèles, nous traiterons d'abord des événements précoces activés chez la vigne par des éliciteurs et des relations qui existent entre eux. Puis, nous discuterons des réactions de défenses plus tardives.

De nombreuses études récentes indiquent le rôle fondamental du Ca²⁺ dans l'activation des réponses de défense des plantes après traitement par des éliciteurs (Yang *et al.*, 1997 ; Scheel, 1998). Les OGA, la cryptogéine, Pep-13 et Avr5 font partie des éliciteurs de réactions de défense qui induisent un influx de Ca²⁺ dans les cellules végétales (Mathieu *et al.*, 1991 ; Nürnberger *et al.*, 1994 ; Tavernier *et al.*, 1995 ; Gelli *et al.*, 1997 ; Zimmermann *et al.*, 1997 ; Scheel, 1998). Par exemple, la cryptogéine induit très rapidement un influx continu et massif de Ca²⁺ dans les cellules de tabac, influx dont dépendent de nombreux autres événements intervenant dans la voie de signalisation (Tavernier *et al.*, 1995 ; Pugin *et al.*, 1997 ; Binet *et al.*, 2001).

Dans les cellules de vigne, T4BcPG1 induit un influx continu de Ca^{2+} qui atteint environ 300 nmoles/g PFC après 1 h de traitement. Ce résultat est en accord avec les données précédemment obtenues pour les cellules de tabac traitées par la cryptogéine (50 nM) dans lesquelles un influx net de Ca^{2+} d'environ 200 nmoles/g PFC avait été mesuré (Tavernier *et al.*, 1995). L'addition d'EGTA (3 mM) à la suspension cellulaire de vigne bloque bien cet influx de calcium. Par conséquent, cette concentration du chélateur a été utilisée par la suite pour étudier l'implication de l'influx de calcium sur les autres réponses induites dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par T4BcPG1.

En comparaison, l'intensité de l'influx de Ca^{2+} pour deux éliciteurs saccharidiques est différente. En effet, la laminarine (1 mg/g PFC) ou les OGA (2 mg/g PFC) provoquent, dans les cellules de vigne, un influx net de Ca^{2+} plus faible (environ 30 nmoles/g PFC) et transitoire (qui se termine après 15 à 20 min de traitement). De telles différences avaient déjà été observées dans des suspensions cellulaires de tabac traitées par la cryptogéine ou les OGA (Binet *et al.*, 1998 ; Binet *et al.*, 2001). Il semble donc que la nature chimique de l'éliciteur (protéine ou sucre) ait un rôle important dans sa capacité à induire un influx massif et prolongé de calcium.

Pour mieux comprendre le rôle du Ca^{2+} dans les cascades de signalisation activées par ces éliciteurs, il était important de connaître les variations de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ engendrées par l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules de vigne. L'importance et la spécificité des variations spatio-temporelles de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ dans le contrôle des réponses cellulaires (à des chocs de température, des stress mécaniques, des stress osmotiques, à des éliciteurs...) commencent à être établies dans les cellules végétales (Knight *et al.*, 1997 ; Trewavas et Malho, 1998 ; Mithofer *et al.*, 1999 ; Blume *et al.*, 2000 ; Lecourieux *et al.*, 2002). Les variations spatio-temporelles de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ définissent la signature calcique spécifique d'un signal donné. Cette signature se caractérise par l'amplitude, la durée, la fréquence et la localisation des variations de calcium libre. Chaque signature calcique constitue un message qui, décodé par des protéines Ca^{2+} -dépendantes, contribue à la mise en place des réponses physiologiques correspondantes au stimulus initial. L'obtention de suspensions cellulaires de *Vitis vinifera* cv Gamay exprimant l'apoequorine dans le cytosol a permis d'analyser les variations de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ en réponse à des éliciteurs.

T4BcPG1 induit deux élévations successives et transitoires de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dont les intensités respectives dépendent de la concentration en T4BcPG1. Ainsi, la première élévation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ induite, 5 min après traitement par des concentrations croissantes de T4BcPG1, n'atteint pas un maximum même à la plus forte concentration testée (1,3 μ M avec 10 μ g/g PFC). La seconde élévation prolongée (entre 15 et 60 min) atteint une $[Ca^{2+}]_{cyt}$ comprise entre 400 et 800 nM (selon les expériences). L'apparition de cette seconde élévation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$, soutenue dans le temps, a été préalablement décrite dans des cellules de persil traitées par Pep-13 et dans des cellules de tabac traitées avec la cryptogéine (Blume *et al.*, 2000 ; Lecourieux *et al.*, 2002). D'après ces auteurs, le maintien prolongé d'une $[Ca^{2+}]_{cyt}$ élevée pendant la seconde phase est nécessaire pour l'expression du gène *PAL* et d'autres gènes de défense ainsi que pour la synthèse des phytoalexines. Il était donc attendu que les cellules de vigne traitées par T4BcPG1 accumulent des ARNm du gène *PAL* et produisent des phytoalexines.

L'EGTA (3 mM) ou le BAPTA (1 mM) inhibe totalement les variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ induites par T4BcPG1, confirmant ainsi l'implication du calcium extra-cellulaire dans les variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dans les cellules de vigne. Ceci est en accord avec des résultats antérieurs puisque la nécessité d'un influx permanent de calcium extra-cellulaire pour engendrer des variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ a été démontrée dans d'autres modèles cellules végétales/éliciteurs (Blume *et al.*, 2000 ; Lecourieux *et al.*, 2002).

Pour les OGA, l'élévation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est transitoire et restreinte à la première phase. Cette élévation est maximale à 3 min de traitement et se termine après 25 min, bien qu'une concentration saturante d'OGA ait été utilisée. Ces résultats corroborent ceux obtenus sur le tabac puisqu'une seconde élévation prolongée de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ n'était pas non plus déclenchée après traitement par un éliciteur saccharidique, comme les OGA ou la laminarine (Lecourieux *et al.*, 2002).

La comparaison de l'influx de calcium et des variations spatio-temporelles de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ montre que la cellule régule sa $[Ca^{2+}]_{cyt}$ puisque si l'influx de calcium extra-cellulaire induit par T4BcPG1 est intense et continu pendant les 60 premières minutes, la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est néanmoins faible et diminue dès 10 min de traitement. Ces observations démontrent la capacité des cellules à contrôler l'homéostasie du calcium libre cytosolique durant une longue période. Elles sont en

accord avec des études précédentes qui indiquent qu'après injection de Ca^{2+} dans le cytosol de cellules neuronales, seulement 0,1 à 1% du Ca^{2+} injecté est sous sa forme libre (Gorman et Thomas, 1980). Ainsi, la majorité du Ca^{2+} pénétrant dans le cytosol est rapidement fixée par des acides organiques et des protéines ou stockée dans des réservoirs internes comme la vacuole ou le réticulum endoplasmique, ce qui témoigne de l'efficacité des Ca^{2+} -ATPases et des antiports $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (Trewavas and Malho, 1998 ; Lecourieux *et al.*, 2002).

Des efflux d'anions (Cl^- ou NO_3^-) ont déjà été décrits pour des cellules de persil ou de tabac traitées par des éliciteurs (Nürnberger *et al.*, 1994 ; Pugin *et al.*, 1997 ; Zimmermann *et al.*, 1998 ; Wendehenne *et al.*, 2002). Au laboratoire, sur le modèle tabac/cryptogéine, il a été montré que l'efflux d'anions, calcium dépendant, est notamment impliqué dans l'activation de la NADPH-oxydase et dans l'induction de la mort cellulaire de type hypersensible (Wendehenne *et al.*, 2002). T4BcPG1 entraîne une augmentation de la concentration en nitrate dans le milieu d'une suspension cellulaire de vigne dès 30 min de traitement, qui croît progressivement avant d'atteindre un plateau après 150 min. Mesuré à 150 min, l'efflux de nitrate augmente avec la quantité d'éliciteur jusqu'à 5 $\mu\text{g/g}$ PFC, concentration pour laquelle l'efflux maximum est de 1,1 $\mu\text{mole NO}_3^-/\text{g PFC}$. L'efflux de nitrate des cellules de vigne traitées par T4BcPG1 est plus lent et moins élevé que celui mesuré dans des suspensions cellulaires de tabac traitées par la cryptogéine (maximum de 4,5 $\mu\text{moles NO}_3^-/\text{g PFC}$ atteint après 30 min de traitement). Par ailleurs, il serait intéressant de mesurer en parallèle la différence de potentiel au niveau de la membrane plasmique des cellules de vigne pour connaître l'incidence de cet efflux d'anions sur ce paramètre. Dans les cellules de tabac traitées par la cryptogéine, l'efflux d'anions est associé à une forte diminution de cette différence de potentiel (Pugin *et al.*, 1997). Une des fonctions de cet efflux d'anions pourrait être de déclencher ou d'amplifier la dépolarisation membranaire (Ward *et al.*, 1995 ; Pugin *et al.*, 1997).

Dans les suspensions cellulaires de vigne, les OGA induisent une élévation rapide, transitoire (30 min), et faible (0,6 $\mu\text{mole NO}_3^-/\text{g PFC}$) de la concentration en nitrate extra-cellulaire. Une fois encore, les OGA provoquent une réponse plus faible et plus transitoire que celle induite par T4BcPG1. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus avec le tabac où il a

également été montré que les OGA provoquent un efflux d'anions (Cl^-) beaucoup plus faible que celui induit par la cryptogéine ou la pectine lyase (Zimmermann *et al.*, 1998).

Pour essayer de savoir si cette sortie de nitrate était due à l'activation de canaux anioniques et quels étaient les événements associés en aval, nous avons cherché à bloquer cet efflux par l'utilisation d'inhibiteurs de canaux anioniques. Malheureusement, nombre d'entre eux se sont révélés toxiques alors que les autres étaient inefficaces. Nous ne pouvons donc pas conclure quant aux événements contrôlés par l'efflux d'anions.

T4BcPG1 induit une production transitoire d' H_2O_2 dans les cellules de vigne qui atteint un maximum après 20 min de traitement, avant de revenir à un niveau basal, 90 min après le début du traitement. Jusqu'à 2,5 $\mu\text{g/g}$ PFC, cette production d' H_2O_2 dépend de la concentration en T4BcPG1. Au-delà de 3 $\mu\text{g/g}$ PFC, cette production d' H_2O_2 atteint un maximum d'environ 800 nmoles/g PFC, à 20 min de traitement. La production d' H_2O_2 induite par T4BcPG1 (3 $\mu\text{g/g}$ PFC), totalement inhibée par le DPI (10 μM), un inhibiteur de la NADPH-oxydase des neutrophiles, suggère l'intervention d'une NADPH-oxydase chez la vigne. De plus, des protéines homologues de gp91, sous-unité catalytique de la NADPH-oxydase des neutrophiles, ont été identifiés chez le riz, *Arabidopsis thaliana*, le tabac (Groom *et al.*, 1996 ; Torres *et al.*, 1998 ; Simon-Plas *et al.*, 2002), et la vigne (Drs. F. Mazeyrat et F. Baillieul, communication personnelle). Néanmoins, la production de FAO chez des protoplastes de vigne (*Vitis vinifera* cv Sultanina) pourrait provenir d'une NAD(P)H oxydase-peroxydase différente de l'homologue de la NADPH-oxydase présente chez le tabac (Papadakis et Roubelakis-Angelakis, 1999). De plus, la spécificité du DPI a été remise en cause par certains auteurs qui ont montré que cet inhibiteur était aussi capable d'inhiber diverses peroxydases (Bestwick *et al.*, 1999 ; Frahy et Schopfer, 1998 ; Baker *et al.*, 1998). A ce stade, des travaux complémentaires sont nécessaires pour connaître l'origine précise (NAD(P)H-oxydase et/ou peroxydase) de l' H_2O_2 produit par des suspensions cellulaires de vigne traitées par T4BcPG1.

Les deux autres éliciteurs (laminarine et OGA) induisent également une production d' H_2O_2 dans des suspensions cellulaires de vigne. Cependant la production optimale n'atteint qu'environ 100 nmoles/g PFC pour ces deux éliciteurs, utilisés à une concentration saturante. Par ailleurs, la production de FAO induite par les deux éliciteurs saccharidiques est plus transitoire que celle

mesurée après traitement par T4BcPG1. Par comparaison à la quantité d'H₂O₂ produite dans d'autres modèles végétaux en réponse à des OGA, elle est plus faible dans les suspensions cellulaires de vigne que dans le tabac (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi) où la quantité maximale d'H₂O₂ produite atteint 900 à 2000 nmoles/g PFC (Mathieu *et al.*, 1996 ; Binet *et al.*, 1998). Afin de vérifier que ces différences n'étaient pas dues à la nature chimique de la préparation d'OGA purifiés, nous avons analysé la production d'H₂O₂ induite par la même concentration d'OGA dans des suspensions cellulaires de tabac (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi). Les résultats de cette étude ont clairement démontré que la production de FAO était effectivement beaucoup plus élevée dans le tabac que dans la vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay). Pour un même éliciteur, la quantité d'H₂O₂ mesurée semble dépendre de l'espèce végétale utilisée. Il n'est pas exclu que cette différence provienne d'une plus ou moins forte activité catalase.

Chez les plantes, des cascades de signalisation impliquant des MAPK jouent un rôle important dans le développement, la division cellulaire, la réponse aux hormones, la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Hirt, 1997 ; Jonak *et al.*, 1999 ; Meskiene et Hirt, 2000 ; Ligterink et Hirt, 2001). Deux MAPK impliquées dans les réactions de défense des plantes, la SIPK et la WIPK chez le tabac, sont activées en réponse à une infection ou un traitement éliciteur (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 1998 ; Romeis *et al.*, 1999). Les orthologues de ces deux MAPK sont également activés suite à un traitement éliciteur dans des cellules d'alfalfa et d'*Arabidopsis thaliana* (Ligterink *et al.*, 1997 ; Cardinale *et al.*, 2000 ; Nuhse *et al.*, 2000).

Dans les cellules de vigne traitées par T4BcPG1, deux MAPK, de masse moléculaire apparente de 45 kD et 49 kD respectivement, sont activées dès 5 min de traitement, avec un maximum après 5 ou 15 min (selon la technique de détection utilisée), et une durée d'activation de l'ordre de 60 min. La différence du temps optimum d'activation des deux MAPK (5 min pour l'essai kinase en gel et 15 min pour le western blot avec un anticorps anti-MAPK phosphorylée humaine) suggère l'existence de plusieurs MAPK ou MAPK et protéines kinases, plus ou moins activées ou plus ou moins affines pour l'anticorps, au sein d'une bande. Ces hypothèses s'appuient notamment sur des travaux qui ont démontré que trois MAPK de 44 kD étaient différemment activées par des éliciteurs (Cardinale *et al.*, 2000).

La staurosporine (2 μ M), un inhibiteur de sérine/thréonine protéines kinases, inhibe l'activation des deux MAPK dans les cellules de vigne traitées par T4BcPG1. Ce résultat est notamment en accord avec ceux obtenus chez le tabac où il a été montré que la staurosporine bloquait l'activation des deux MAPK (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998). Au sein du module MAPK, il existe deux sérine/thréonine protéines kinases : la MAP3K et la MAPK (Ichimura *et al.*, 2002). Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour essayer de connaître la cible de la staurosporine dans le module MAPK activé par T4BcPG1.

La laminarine induit également l'activation de ces MAPK dans les cellules de vigne. Cette activation, révélée par western blot avec un anticorps anti-MAPK activées humaines, augmente progressivement, atteint un maximum après 30 min de traitement, avant de décroître très rapidement. Des résultats récents obtenus au laboratoire par C. Billerey indiquent que les OGA, à concentration saturante, induisent aussi l'activation de ces deux MAPK de vigne mais seulement pendant 10 min. Cette activation très transitoire des MAPK avait déjà été observée dans des cellules de tabac traitées par les OGA (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998).

Ainsi, au moins deux MAPK sont activées dans la vigne par trois éliciteurs différents. Dans divers modèles, il a été démontré qu'une même MAPK peut être activée sous l'effet de *stimuli* distincts mais également qu'un stimulus n'aboutit pas à l'activation d'une seule MAPK (Nürnberg et Scheel, 2001 ; Lebrun-Garcia *et al.*, 2002). Les diverses voies de signalisation relaient l'information originelle par l'activation d'une combinaison de protéines kinases ; la spécificité du signal au niveau du module MAPK pourrait se situer au niveau des MAP2K (Cardinale *et al.*, 2002), au niveau des MAP3K (Meskiene et Hirt, 2000), mais aussi dépendre de protéines d'échafaudage associées au module MAPK (Tanoue *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, toute une cascade MAPK a été identifiée en aval de la perception de la flagelline par son récepteur putatif FLS2. Asai *et al.* (2002) ont montré que les MAPK AtMPK3 et AtMPK6 sont activées par les MAP2K AtMKK4 et AtMKK5, elles-mêmes activées par la MAP3K AtMEKK1. De plus, il semble que les cibles des deux MAPK activées dans cette voie de signalisation soient deux facteurs de transcription de la famille des protéines WRKY (WRKY22 et WRKY29). Cependant, 20 gènes de MAPK, 10 gènes de MAP2K et 60 gènes de MAP3K ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Ichimura *et al.*, 2002). Dans la vigne, l'analyse des

cascades MAPK activées lors d'interactions plantes-pathogènes ou en réponse à des éliciteurs pourrait permettre de mieux comprendre le rôle des MAPK dans l'interconnexion des voies de signalisation liées à des *stimuli* différents.

Afin d'essayer de comprendre les relations pouvant exister entre les différents événements précoces activés chez la vigne en réponse à T4BcPG1, nous avons initié une étude pharmacologique en utilisant des inhibiteurs de ces événements.

L'influx de calcium n'est pas inhibé par la staurosporine ou le DPI. Le blocage de l'influx de calcium supprime la production de FAO mais n'affecte pas l'activation des MAPK. Ces résultats indiquent que l'influx de calcium est en amont de la production de FAO, probablement parallèle à l'activation des MAPK et n'est dépendant ni d'une sérine/thréonine protéine kinase, ni de la production de FAO.

Les élévations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dépendent en premier lieu d'un influx de calcium, car elles sont supprimées en présence d'EGTA ou de BAPTA. Elles sont très peu modifiées en présence de DPI, ce qui laisse à penser que la production de FAO n'est pas déterminante dans ce processus. En présence de staurosporine, le premier pic de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est diminué et le second est augmenté. L'élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ au niveau du second pic peut s'expliquer par l'augmentation de l'influx de calcium induite par la staurosporine dans les premières minutes du traitement. Mais il n'est pas exclu que la staurosporine agisse sur des protéines kinases autres que celle(s) susceptible(s) de réguler un canal calcique au niveau de la membrane plasmique, comme par exemple des protéines kinases qui réguleraient les Ca^{2+} -ATPases de la membrane plasmique, du tonoplaste, ou d'autres protéines impliquées dans le transport du calcium (activation par phosphorylation).

La production de FAO qui dépend de l'influx de calcium dépend aussi de l'activité de protéines kinases.

L'activation des MAPK, indépendante de l'influx de calcium, n'est pas non plus en aval de la production de FAO. Elle est, comme attendu, dépendante de l'activité de protéines kinases, puisque l'activation des MAPK implique des phosphorylations en cascades par des MAP2K, MAP3K et d'autres protéines kinases en amont. Les interactions entre ces événements sont indiquées Figure 49.

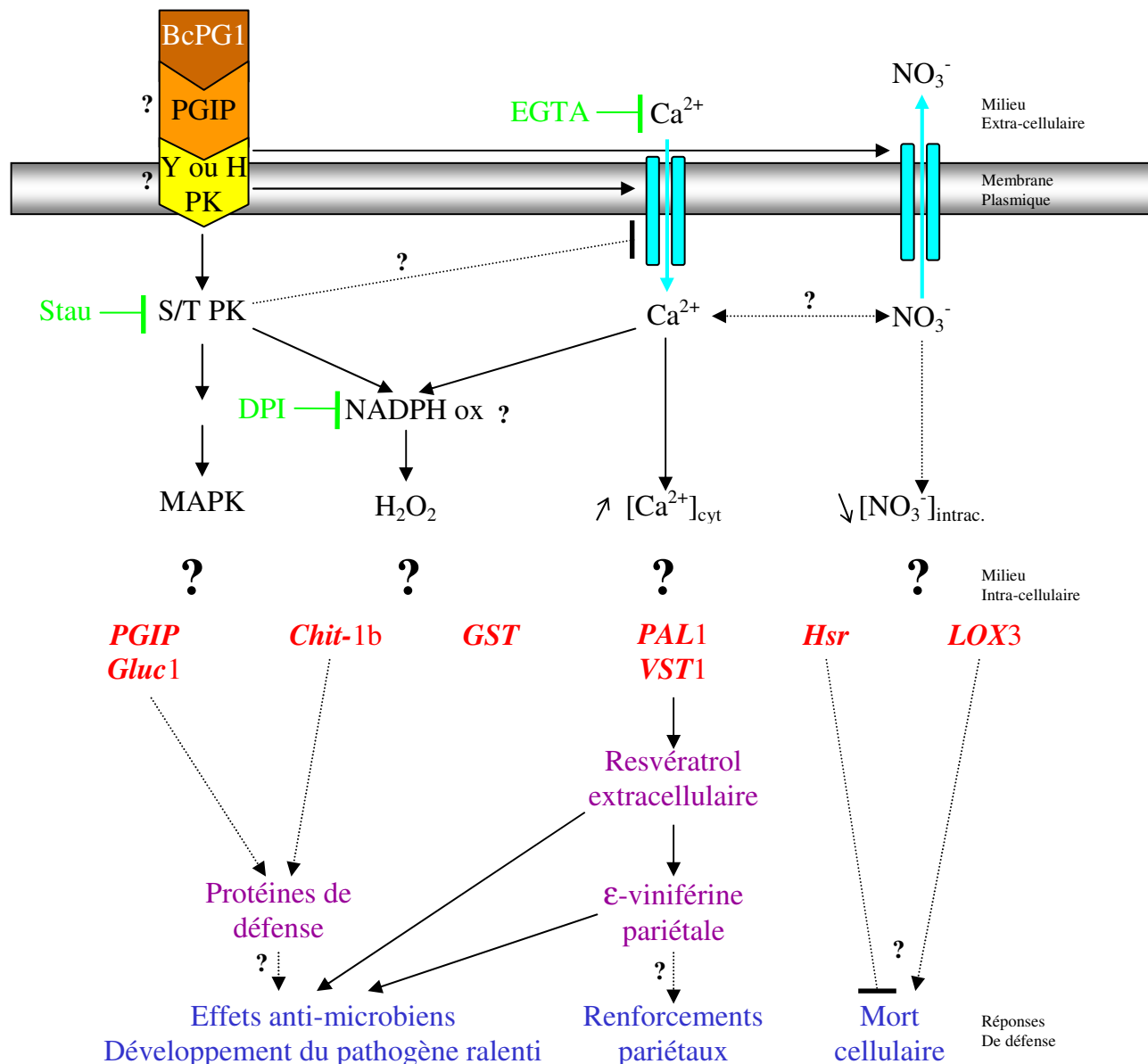


Figure 49 : Schéma des événements des réactions de défense activés par BcPG1 dans des cellules de vigne.

BcPG1 (marron) pourrait être reconnue par les cellules de vigne *via* un récepteur de type PGIP (orange) éventuellement couplé à une tyrosine ou histidine kinase (T ou Y protéine kinase; jaune). Cet événement de reconnaissance induit un influx de calcium, une élévation de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, un efflux de nitrate, la production d' H_2O_2 et l'activation de 2 MAPK (noir). L'activation de ces voies de signalisation, et probablement d'autres, conduit à l'activation de gènes de défense (rouge) dont les produits (violet) participent directement ou indirectement à ralentir voire arrêter le développement de certains pathogènes (bleu). Les inhibiteurs utilisés (vert) sont la staurosporine (Stau), le diphénylène iodonium (DPI) et l'EGTA. Flèche: lien positif entre deux événements. Barre: lien négatif entre deux événements. Trait plein: relation existante chez la vigne. Trait pointillé: relation probable.

L'organisation des événements dans la vigne en réponse à T4BcPG1, peut être comparée au mode d'action d'autres éliciteurs dans d'autres plantes et principalement à nos connaissances du mode d'action de la cryptogéine dans le tabac (Figure 06) où l'organisation des événements est différente.

Dans le modèle tabac/cryptogéine, la staurosporine inhibe la totalité des réponses cellulaires, suggérant ainsi que l'activation d'une sérine/thréonine protéine kinase est le premier événement déclenché. L'activité kinase pourrait être portée par le récepteur ou pourrait contrôler l'activité du canal calcique. Or, à ce jour, la plupart des RPK (receptor protein kinase) identifiés chez les plantes sont des sérine/thréonine kinases, alors que ce sont essentiellement des tyrosine kinases chez les animaux (Becraft, 1998). Dans notre modèle, si les cellules de vigne possèdent un récepteur de type RPK à T4BcPG1, il est clair que celui-ci n'est pas inhibé par la staurosporine. Il conviendrait donc de vérifier si, par exemple, des inhibiteurs de tyrosine-kinases bloquent la totalité des réponses. L'existence de récepteurs tyrosine-kinases pourrait alors être une particularité des plantes pérennes ligneuses comme la vigne, puisque les RPK végétaux n'ont pour l'instant été identifiés que chez des plantes annuelles (maïs, *Arabidopsis thaliana*, tomate et riz). Si on émet l'hypothèse de l'existence d'un récepteur à T4BcPG1, la PGIP pourrait être un bon candidat pour participer à la reconnaissance de cette protéine. En effet, les PGIP sont des protéines capables d'interagir physiquement avec certaines polygalacturonases fongiques et elles ont de fortes homologues avec les produits des gènes de résistance *Cf* de la tomate (De Lorenzo et Ferrari, 2002). L'analyse de la séquence peptidique de la PGIP1 de vigne (présente dans les bases de données), révèle 7 domaines LRR extra-cellulaires, un site de myristoylation, un site de phosphorylation par des protéines kinases AMPc- ou GMPc-dépendantes et un site de phosphorylation par une tyrosine kinase. Cependant, comme pour Cf-9, aucun domaine kinase intra-cellulaire n'est présent. Pour qu'il y ait fixation de T4BcPG1 et transduction du signal, il faudrait donc que la PGIP soit associée à une protéine transmembranaire au sein d'un complexe protéique multimérique, comme celui qui vient d'être découvert pour Cf-9 (Rivas *et al.*, 2002). Mais, avant de spéculer, il faudra vérifier que l'interaction physique entre T4BcPG1 et une PGIP de vigne conduit à l'expression des défenses.

Dans le modèle vigne/T4BcPG1, l'inhibiteur de sérine/thréonine protéine kinase pourrait avoir d'autres cibles que la protéine kinase présente en amont de l'influx de calcium dans le modèle tabac/cryptogéine. D'une part, la staurosporine peut inhiber une protéine kinase impliquée dans l'activation du module MAPK. D'autre part, la staurosporine pourrait inhiber des protéines kinases impliquées dans la régulation de protéines qui contrôlent l'homéostasie du calcium. En effet, des travaux rapportent qu'une Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique est régulée au niveau post-traductionnelle par un duo protéine kinase dépendante du calcium (CDPK)/calmoduline (CaM) ayant des affinités différentes pour le Ca^{2+} (Hwang *et al.*, 2000). Les auteurs proposent le fonctionnement suivant : lors d'une élévation de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, une CDPK spécifiquement activée par l'influx de Ca^{2+} maintiendrait par phosphorylation la Ca^{2+} -ATPase à l'état inactif permettant ainsi une élévation de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ plus forte. Lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ atteint un certain seuil, une CaM serait alors activée et se fixerait sur la Ca^{2+} -ATPase à proximité du site de phosphorylation. Cette fixation réactiverait la pompe à Ca^{2+} en empêchant son inhibition par phosphorylation, la présence de la CaM interdisant l'accès du site de phosphorylation à la CDPK. Dans notre modèle, la staurosporine inhiberait donc cette CDPK bloquant ainsi l'inhibition de cette Ca^{2+} -ATPase. Il y aurait alors un transport rapide du Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique et/ou la vacuole qui expliquerait la baisse du premier pic de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ en présence de staurosporine. Les effets de la staurosporine sur le second pic de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ pourraient s'expliquer par l'augmentation de l'influx de calcium induit par ce composé. Néanmoins, il est prématuré de spéculer sur ces résultats dans la mesure où de très nombreuses protéines sont impliquées dans l'homéostasie du calcium : canaux ligand ou voltage dépendants, antiports $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, Ca^{2+} -ATPase, localisées sur toutes les membranes cellulaires et qui, pour nombre d'entre-elles sont régulées par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation (Geisler *et al.*, 2000 ; Malmstrom *et al.*, 2000).

Comme dans le tabac en réponse à la cryptogéine ou dans le persil en réponse à Pep-13, la production de FAO, Ca^{2+} -dépendante, est contrôlée par une protéine kinase dans le modèle vigne/T4BcPG1 (Pugin *et al.*, 1997 ; Blume *et al.*, 2000). Tous les homologues de gp91, sous-unité catalytique de la NADPH-oxydase des mammifères, identifiés chez les plantes possèdent dans leur partie N-terminale un motif de fixation du Ca^{2+} qui laisse présager une régulation

directe par cet ion (Keller *et al.*, 1998). Chez les mammifères, la formation du complexe de la NADPH-oxydase dépend également d'une phosphorylation de protéines. Ainsi, les sous-unités gp91 et p22 demeurent inactives au niveau de la membrane plasmique jusqu'à ce qu'un événement de phosphorylation permette l'accrochage des deux sous-unités cytosoliques p47 et p67 afin de former le complexe enzymatique actif (Nürnberg et Scheel, 2001).

La seconde différence concerne les événements sous la dépendance d'un influx de calcium. Dans le cas de la cryptogéine tous les événements en dépendent alors qu'avec T4BcPG1, dans la vigne, seule la production de FAO est Ca^{2+} -dépendante. En particulier l'activation du module MAPK ne dépend pas de l'influx de calcium, ce qui suggère que ce module fonctionne probablement en parallèle à d'autres voies, contrairement aux autres modèles plantes/éliciteurs (Jonak *et al.*, 1999). Néanmoins, l'activation FAO-indépendante du module MAPK est conforme aux résultats obtenus par ailleurs (Ligterink *et al.*, 1997 ; Lebrun-Garcia *et al.*, 1998). De plus, dans les deux modèles (tabac/cryptogéine et vigne/T4BcPG1), les élévations de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, qui dépendent en premier lieu d'un influx de calcium, donnent des signatures comparables avec une élévation soutenue dans le temps qui semble caractéristique des éliciteurs de nature protéique (Lecourieux *et al.*, 2002). Il est actuellement prématuré de comparer l'origine des élévations de calcium dans les deux plantes et en particulier de discuter du rôle de H_2O_2 chez la vigne.

L'accumulation de transcrits de quelques gènes liés à la défense des plantes a été analysée dans des cellules de vigne traitées par T4BcPG1, les OGA ou la laminarine. Le taux de transcrits de sept des huit gènes étudiés (par RT-PCRq ou northern blot) augmente en réponse à T4BcPG1. Seul le gène de la chitinase 3 ne paraît pas induit par cet éliciteur. L'activation de ces gènes par T4BcPG1 confirme sa capacité à activer les défenses de la vigne et les liens qui existent entre les événements précoces mesurés et les gènes de défense.

Les produits directs ou indirects de plusieurs de ces gènes sont capables de ralentir le développement de certains pathogènes comme *Botrytis cinerea*. C'est notamment le cas de la PGIP (Powell *et al.*, 2000) et du resvératrol, dont la biosynthèse implique les gènes *PAL1* et *VST1* (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001). Le traitement de la vigne par T4BcPG1 devrait donc permettre de ralentir le développement de certains pathogènes.

Les OGA, utilisés à une concentration saturante, ne provoquent pas la même induction des gènes de défense de la vigne comparée à celle provoquée par T4BcPG1. En effet, dans des cellules traitées par les OGA, les ARNm des gènes *LOX3* et *PGIP* ne semblent pas s'accumuler et les transcrits des autres gènes s'accumulent plus faiblement et très transitoirement (maximum atteint après 4 h de traitement). Ces résultats confirment cependant des résultats antérieurs montrant que les OGA pouvaient notamment induire la synthèse d'activités β -1,3-glucanases (Davis et Hahlbrock, 1987).

La laminarine induit également l'expression de nombreux gènes de défense de vigne. Plus spécifiquement, elle induit fortement l'accumulation des transcrits de protéines PR (chitinases, β -1,3-glucanase, inhibiteur de protéase), faiblement celle des transcrits des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phytoalexines (*PAL1*, *VST1*), et ne provoque pas l'accumulation des ARNm *HSR*. Chez le tabac, des travaux récents ont montré que le produit du gène *HSR203* réprime l'induction de la mort cellulaire de type RH puisque les plantes exprimant un antisens de ce gène ont un développement accéléré de la RH (Tronchet *et al.*, 2001). Donc, si le gène de vigne *HSR* étudié est bien l'orthologue de *HSR203* du tabac, la laminarine ne devait pas induire une mort significative des cellules de vigne. C'est ce que nous avons observé puisque la mort des cellules de vigne traitées par la laminarine est identique à celle des cellules témoins (5%).

T4BcPG1 induit la production de phytoalexines dans les suspensions cellulaires de vigne. Dans le milieu extra-cellulaire, les principales phytoalexines détectées sont le trans-resvératrol et, dans une moindre mesure, son dimère : l' ϵ -viniférine. Le pic de production de ces deux phytoalexines est obtenu après 24 h de traitement, avant une disparition totale après 48 h de traitement. Dans la fraction cellulaire, seule l' ϵ -viniférine est détectée et la quantité maximale est mesurée après 36 h de traitement. Ces *optima* de production sont en accord avec des résultats précédents qui montrent que la quantité maximale de phytoalexines est fréquemment détectée 24 à 48 h après l'élicitation (Langcake and Pryce, 1977a ; Langcake, 1981 ; Bais *et al.*, 2000).

Les OGA n'induisent qu'une faible apparition de trans-resvératrol et d' ϵ -viniférine dans le milieu extra-cellulaire, mais l'optimum de production est ici atteint après 8 h de traitement et la quantité de phytoalexines détectée se maintient durant les 48 h d'expérience. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus sur d'autres plantes qui relatent une production de

phytoalexines induite par les OGA (Hahn *et al.*, 1981 ; Nothnagel *et al.*, 1983 ; Jin et West, 1984 ; Davis *et al.*, 1986).

La laminarine n'induit également qu'une faible production de trans-resvératrol et d' ϵ -viniférine dans le milieu de culture. La quantité de phytoalexines détectée est stable entre 8 h et 48 h de traitement.

La quantité de phytoalexines (trans-resvératrol et ϵ -viniférine) dans le milieu extracellulaire est environ 5 à 6 fois plus importante en réponse à T4BcPG1 par rapport aux deux éliciteurs saccharidiques utilisés à une concentration saturante. Cette quantité de phytoalexines semble corrélée au nombre des transcrits du gène *VST1* puisque, par RT-PCRq, nous avons quantifié environ 5 fois plus de transcrits *VST1* dans des cellules traitées par T4BcPG1 que dans celles traitées par la laminarine. De même, en northern blot, l'accumulation d'ARNm *PAL1* et *VST1* était beaucoup plus faible pour les OGA que pour T4BcPG1. Or, nous avons vu précédemment que certains auteurs font une relation entre l'existence d'une seconde élévation prolongée de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et l'expression du gène *PAL* ou la production de phytoalexines (Blume *et al.*, 2000 ; Lecourieux *et al.*, 2002). Les deux éliciteurs saccharidiques ne provoquent qu'un influx transitoire de $^{45}Ca^{2+}$ et une très faible, voire inexistante, seconde élévation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dans les cellules de vigne. Il existe donc une corrélation entre l'intensité de l'influx de calcium, l'élévation prolongée de $[Ca^{2+}]_{cyt}$, l'expression des gènes *PAL1* et *VST1* et la production de phytoalexines dans les suspensions cellulaires de vigne.

Néanmoins, ces résultats posent le problème de la métabolisation du resvératrol et de ses dérivés par la plante. En effet, il semble que le devenir de ces composés soit différent selon la nature de l'éliciteur : protéine (T4BcPG1) ou polysaccharide (OGA ou laminarine). Dans le cas de T4BcPG1, une quantité importante de trans-resvératrol s'accumule dans le milieu extracellulaire puis disparaît rapidement parallèlement à l'apparition d' ϵ -viniférine dans la fraction cellulaire. Dans le cas des deux éliciteurs saccharidiques, une faible quantité de trans-resvératrol est mesurée dans le milieu extra-cellulaire plus tôt qu'avec T4BcPG1, mais la teneur en resvératrol est stable pendant les 48 h d'expérience sans apparition d' ϵ -viniférine dans la fraction cellulaire. Or, Langcake et Pryce (1977a) ont émis l'hypothèse que l' ϵ -viniférine pourrait provenir de la dimérisation oxydative du resvératrol *via* une peroxydase. En effet, l'addition *in*

vitro d'une peroxydase et d' H_2O_2 conduit à l'apparition d'un dimère de resvératrol proche de l' ϵ -viniférine (Langcake et Pryce, 1977c). Des résultats ultérieurs ont montré que l'oxydation du resvératrol dans la vigne est contrôlé par trois peroxydases (deux pariétales et une cytosolique) dont certaines isoformes sont induites spécifiquement par les pathogènes fongiques (Calderon *et al.*, 1992). Dans ce cas, T4BcPG1 pourrait être le seul des trois éliciteurs testés à provoquer l'accumulation d'une peroxydase pariétale qui permettrait de transformer le resvératrol extracellulaire en ϵ -viniférine liée à la paroi cellulaire. De plus, cette dimérisation oxydative du resvératrol pourrait permettre de diminuer la forte accumulation des FAO produites lors du traitement des cellules de vigne par T4BcPG1. Récemment, une stratégie antisens a permis de mettre en évidence le rôle des phytoalexines dans la régulation des FAO puisque des tabacs transgéniques qui produisent beaucoup moins de phytoalexines (scopolétine et son glucoside) ont une accumulation de FAO soutenue dans le temps (Chong *et al.*, 2002). Dans la vigne, le resvératrol pourrait alors avoir trois fonctions : molécule anti-microbienne, précurseur de métabolites impliqués dans le renforcement des parois cellulaires et activité anti-oxydante qui limite l'accumulation des FAO. Les premiers résultats obtenus par le Dr. M. Adrian (IUVV, Dijon) confirment l'hypothèse d'une participation des phytoalexines aux renforcements de parois puisque, dans les cellules de vigne traitées par T4BcPG1, des stilbènes sont liés de façon covalente à la paroi et l'élasticité pariétale diminue au cours du traitement.

Après 24 h de traitement, T4BcPG1 induit la mort d'environ 25% des cellules de vigne alors que les OGA ou la laminarine, utilisés à une concentration saturante, ne sont pas cytotoxiques, comme montré précédemment sur le tabac (Mathieu *et al.*, 1991 ; Klarzynski *et al.*, 2000).

Le pourcentage de mort cellulaire déterminé dans des suspensions de cellules de vigne traitées par T4BcPG1 est beaucoup plus faible que celui mesuré dans des suspensions cellulaires de tabac traitées par la cryptogéine 50 nM (environ 60% après 24 h de traitement ; Binet *et al.*, 2001). Dans ce dernier système, l'influx de calcium et l'efflux de nitrate sont impliqués dans la mort cellulaire hypersensible (Binet *et al.*, 2001 ; Wendehenne *et al.*, 2002). La différence d'intensité de ces flux d'ions, faibles dans la vigne et forts dans le tabac, pourrait expliquer la différence du taux de mort cellulaire entre les deux systèmes. Les liens entre influx de calcium,

efflux de nitrate et mort cellulaire n'ont pas pu être vérifiés dans les cellules de vigne traitées par T4BcPG1 car les outils pharmacologiques utilisés pour bloquer ces flux d'ions (chélateurs de cations divalents, lanthanides et inhibiteurs de canaux anioniques) se sont révélés toxiques lors des mesures de mort cellulaire à 24 h.

Par la suite, nous avons voulu vérifier si l'induction de la mort de cellules en suspensions provoquée par T4BcPG1 pouvait se traduire par l'apparition de nécroses foliaires sur plantes. L'infiltration d'une solution de T4BcPG1, en face inférieure de feuilles de vigne (*Vitis vinifera* cv Chardonnay), provoque l'apparition de nécroses visibles dès 12 h après injection. Cependant, rien ne nous permet de conclure quant à l'origine de ces nécroses : réaction hypersensible (Pontier *et al.*, 1998a ; Lam *et al.*, 2001) ou hydrolyse des parois cellulaires végétales due à l'activité enzymatique de T4BcPG1.

L'ensemble des résultats présentés ici démontre que T4BcPG1 est capable d'activer les réactions de défense de cellules de vigne en suspension, c'est donc un éliciteur. L'activité élicitrice des OGA et de la laminarine avait déjà été démontrée sur le tabac (Mathieu *et al.*, 1991 ; Mathieu *et al.*, 1996 ; Rouet-Mayer *et al.*, 1997 ; Binet *et al.*, 1998 ; Lebrun-Garcia *et al.*, 1998 ; Klarzynski *et al.*, 2000). Nos résultats indiquent que ces polysaccharides sont également des éliciteurs efficaces sur la vigne. Néanmoins, il est à noter que les deux éliciteurs saccharidiques testés provoquent toujours une activation des réactions de défense plus faible et plus transitoire que T4BcPG1.

Les premiers événements des réactions de défense mis en évidence dans d'autres modèles sont aussi détectés dans la vigne en réponse à des éliciteurs. Si on considère les modèles les plus étudiés (flagelline/*Arabidopsis*, cryptogéine/tabac, Pep-13/persil, OGA/tabac...) il semble que globalement les événements induits et connus soient qualitativement comparables d'un éliciteur à un autre et d'une plante à une autre. Néanmoins des différences notoires existent au niveau quantitatif, cinétique et dans les voies de signalisation. Par exemple, dans le tabac, l'activation des MAPK est dépendante de l'influx de calcium alors que dans le système vigne/T4BcPG1, elle est indépendante de cet événement. De même, l'influx de calcium est ou n'est pas contrôlé par une sérine/thréonine protéine kinase en amont, dans le tabac et la vigne respectivement. Ces voies de signalisation en réponse aux éliciteurs sont bien loin d'être décryptées. De même, de

nombreux travaux sont nécessaires pour comprendre l'organisation qui dicte la spécificité des réponses physiologiques puisque certains des événements décrits activés en réponse aux éliciteurs sont aussi impliqués dans la réponse aux hormones végétales (Giraudat, 1995). Cependant les résultats de l'échange des motifs LRR des récepteurs putatifs *BRI1* (perception des brassinostéroïdes) et *Xa21* (perception de *Xanthomonas*) laissent supposer que la spécificité de la réponse à un stimulus donné pourrait résider en partie dans la kinase associée au site de fixation du ligand (He *et al.*, 2000).

L'activité élicitrice de T4BcPG1 est indépendante de son activité enzymatique

Une fois l'activité élicitrice de T4BcPG1 établie, le problème était de savoir si cette activité était le fait des OG libérés par l'enzyme ou de la structure protéique elle-même. En effet, les OGA sont des éliciteurs actifs sur la vigne (Résultats § 5.1) et d'autres plantes (Mathieu *et al.*, 1991 ; Mathieu *et al.*, 1996 ; Rouet-Mayer *et al.*, 1997 ; Binet *et al.*, 1998 ; Lebrun-Garcia *et al.*, 1998). Mais par ailleurs, l'activité élicitrice d'autres enzymes dégradant les parois végétales, comme la pectine lyase ou la xylanase, ne dépend pas de leur activité enzymatique mais de certains motifs protéiques (Rouet-Mayer *et al.*, 1997 ; Enkerli *et al.*, 1999).

La comparaison des effets des OGA et de T4BcPG1 sur les réactions de défense de la vigne suggérait que l'activité élicitrice de T4BcPG1 n'était pas due aux OG libérés par l'enzyme puisque la protéine induit globalement des réponses plus longues et plus intenses que les OGA utilisés à concentration saturante. D'autres travaux ont permis de confirmer que l'activité élicitrice de T4BcPG1 était indépendante de son activité enzymatique.

En premier lieu, la comparaison des réactions précoces induites par T4BcPG1 ou une autre endopolygalacturonase (AjPG), utilisées à la même activité enzymatique *in vitro*, montre des effets totalement différents aussi bien au niveau qualitatif que quantitatif. Ces résultats, bien que ne constituant pas une démonstration, nous ont conforté dans l'idée que l'activité élicitrice de T4BcPG1 ne dépendait pas de son activité enzymatique.

L'autre étape a consisté à réaliser des expériences de désensibilisation, expériences de choix pour différencier deux *stimuli* différents (Felix *et al.*, 1993). La désensibilisation est basée sur

l'existence d'un état réfractaire qui empêche les cellules de répondre deux fois de suite au même éliciteur (Felix *et al.*, 1993 ; Binet *et al.*, 1998 ; Felix *et al.*, 1998). Nos résultats de désensibilisation montrent clairement que des suspensions cellulaires de vigne, traitées deux fois de suite par le même éliciteur (OGA ou T4BcPG1), sont incapables de répondre au second traitement. Il y a donc bien établissement d'un état réfractaire dans les suspensions cellulaires utilisées. Chez la tomate, cet état réfractaire ne semble pas être dû à l'internalisation des récepteurs puisque le nombre de sites de fixation pour la chitine ne diminue pas après traitement par cet éliciteur (Felix *et al.*, 1998). Divers auteurs suggèrent plutôt une inactivation temporaire de la voie de signalisation (Felix *et al.*, 1993 ; Rouet-Mayer *et al.*, 1997). L'absence de désensibilisation des cellules de vigne en réponse à T4BcPG1 après un premier traitement par les OGA, et inversement, indique que la production de FAO induite par T4BcPG1 ne provient pas d'OGA libérés par l'enzyme. Les OGA et T4BcPG1 sont en fait perçus par les cellules de vigne comme deux *stimuli* différents. Des résultats similaires obtenus avec la pectine lyase et les OGA ont conduit les auteurs à conclure que l'activité élicitrice de la pectine lyase ne provenait pas des OG libérés par son activité enzymatique (Rouet-Mayer *et al.*, 1997). Cette affirmation est aussi confirmée par une étude de mutagenèse dirigée sur la pectate lyase où la mutation K172H conduit à une protéine dont l'activité enzymatique est diminuée de 97% alors que son activité élicitrice reste inchangée (Kita *et al.*, 1996). Néanmoins, dans notre modèle nous ne pouvons pas exclure que T4BcPG1 libère des fragments de pectine différents des OGA et actifs en qualité d'éliciteurs.

Enfin, nous avons cherché à bloquer spécifiquement soit l'activité élicitrice, soit l'activité enzymatique de T4BcPG1. Cette discrimination des activités enzymatique et élicitrice de T4BcPG1 a été obtenue après un traitement chimique (réduction des ponts disulfures) ou physique (1 h à 45°C) de la protéine. Ainsi, la réduction des ponts disulfures supprime l'activité élicitrice de T4BcPG1 alors qu'elle ne réduit son activité enzymatique que de 40%. Ce résultat suggère que les OG libérés ne sont pas assez abondants pour induire une activation des défenses mais, il est plus vraisemblable que les OG libérés soient inactifs car de dp ne correspondant pas à la taille efficace. L'importance des ponts disulfures dans l'activité élicitrice d'une protéine a déjà été signalée pour plusieurs éliciteurs : la mégaspermine, les élicitines et Avr9 (Ricci *et al.*, 1989 ;

Baillieul *et al.*, 1995 ; Van den Hooven *et al.*, 2001). Il semble donc que l'activité élicitrice de T4BcPG1 soit liée à la conformation spatiale de la protéine, maintenue par des ponts disulfures.

Le traitement de T4BcPG1 1 h à 45°C, réduit très fortement son activité enzymatique (de 91%) alors que son activité élicitrice n'est diminuée que de 22%. Bien que T4BcPG1 ait quasiment perdu son activité enzymatique, elle est encore capable de provoquer une forte production d'H₂O₂ dans les suspensions cellulaires de vigne. L'ensemble de ces résultats (comparaisons OGA/T4BcPG1/AjPG, désensibilisations et discrimination des activités élicitrice et enzymatique de T4BcPG1) montre que l'activité élicitrice de T4BcPG1 n'est pas due aux OG libérés par l'enzyme. Il semble donc que la reconnaissance de ce type d'enzyme par la plante ne soit pas uniquement liée à la détection des produits d'hydrolyse de la paroi végétale mais aussi à des motifs protéiques propres à l'enzyme.

La PGIP2 de *Phaseolus vulgaris*, protéine capable d'inhiber fortement l'activité polygalacturonase de BcPG1 (Dr. F. Sicilia, communication personnelle), inhibe à la fois l'activité élicitrice et enzymatique de T4BcPG1. Cette double inhibition est probablement due au recouvrement des deux sites (catalytique et éliciteur) par l'inhibiteur volumineux (De Lorenzo et Ferrari, 2002). Cependant, nous ne pouvons pas exclure que le site catalytique de T4BcPG1 soit aussi impliqué dans l'activité élicitrice de la protéine. Le site catalytique, porteur de la fonction de virulence, serait alors le motif reconnu par la plante lui conférant aussi la fonction d'avirulence. En effet, la protéine R la plus efficace pour la plante devrait être celle qui reconnaît le domaine catalytique impliqué dans la virulence. Dans ce cas, les mutations qui permettraient au pathogène de ne plus être détecté par la plante modifieraient son site catalytique et donc diminueraient sa virulence (Nimchuk *et al.*, 2001). Néanmoins, des expériences de mutagenèse dirigée permettront peut-être d'identifier les motifs protéiques impliqués dans l'activité élicitrice et/ou enzymatique de cette protéine.

L'ensemble des résultats présentés dans cette étude démontre que T4BcPG1 est un éliciteur capable d'activer les réactions de défense de la vigne. A ce titre, il pourrait être considéré comme le produit d'un gène d'avirulence. Or, Ten Have *et al.* (1998) ont conclu que le gène *Bcpg1* est impliqué dans la virulence de *Botrytis cinerea* puisque sa délétion provoque un

développement plus faible du champignon sur plantes ou fruits. Prenant en compte ces données, T4BcPG1 doit-il être considéré comme un facteur de virulence et/ou d'avirulence ? Cette question a déjà été soulevée par plusieurs auteurs, et il semble aujourd'hui acquis qu'un éliciteur peut être à l'origine le produit d'un gène de virulence qui, au cours de la co-évolution plantes-pathogènes, a été reconnu par la plante le transformant ainsi en facteur d'avirulence, capable de déclencher les réactions de défense de l'hôte (Kjemtrup *et al.*, 2000 ; Nimchuk *et al.*, 2001). En effet, une multitude de travaux appuient cette réflexion. Par exemple, la présence du gène *AvrPto* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* augmente la virulence du pathogène sur des plantes sensibles (Chang *et al.*, 2000) alors que chez les plantes résistantes (porteuses des gènes *Pto* et *Prf*), l'interaction physique *AvrPto/Pto* déclenche l'activation des réactions de défenses qui stoppent le développement du pathogène (Tang *et al.*, 1996b). De la même façon, une protéine extra-cellulaire de *Cladosporium fulvum* est un facteur soit de virulence soit d'avirulence en fonction des génotypes de tomate (Lauge *et al.*, 1998 ; Lauge *et al.*, 2000). De plus, des protéines impliquées dans la réplication, l'encapsidation ou le mouvement des virus sont aussi à la fois des facteurs de virulence et d'avirulence puisqu'elles participent au développement de ces pathogènes et sont reconnues par des protéines R (Erickson *et al.*, 1999 ; Zhao *et al.*, 2000). Aussi, les produits de nombreux gènes *Avr* bactériens, reconnus par des protéines R, sont des protéines qui appartiennent ou utilisent le système de sécrétion de type III, système qui participe également à la virulence de la bactérie (Mudgett et Staskawicz, 1998).

Lors de la co-évolution plantes-pathogènes, l'apparition des protéines R a donc permis de transformer une réaction compatible (entre un pathogène virulent et un hôte sensible) en une réaction incompatible, grâce à la reconnaissance d'une protéine impliquée dans la virulence du pathogène. Ainsi, une protéine *Avr* pourrait être à la fois un facteur de virulence (qui aide au développement du micro-organisme) chez les génotypes sensibles et un éliciteur chez les génotypes résistants exprimant une protéine R. Nous savons en effet aujourd'hui que, dans les cultivars sensibles, les protéines *Avr* de certains pathogènes interagissent avec des protéines végétales (cibles de virulence) pour inhiber les réactions de défense ou altérer le métabolisme de la plante favorisant ainsi la virulence du micro-organisme. Par contre, dans les cultivars résistants, une protéine de garde reconnaît une modification structurale de la protéine cible après

fixation de ce type de protéine Avr, ce qui active les réactions de défense ou empêche les effets délétères sur le métabolisme et rend l'interaction incompatible (Mackey *et al.*, 2002). Ainsi, lors d'interactions incompatibles, la protéine R peut soit directement reconnaître la protéine Avr (Jia *et al.*, 2000), soit détecter une modification d'une protéine cible de la plante, provoquée par un facteur de virulence du micro-organisme (Mackey *et al.*, 2002). Dans le cas de certains éliciteurs protéiques, la protéine R supprime donc l'interaction moléculaire nécessaire à la virulence et/ou à l'inhibition des réactions de défense (modèle de garde décrit par Van der Biezen et Jones, 1998 ; Dangl et Jones, 2001 ; Van der Hoorn *et al.*, 2002 ; Figures 03 et 04). Les éliciteurs saccharidiques seraient quant à eux des composés témoignant de la présence d'un pathogène et reconnus par la plupart des espèces végétales. Cette reconnaissance pourrait permettre aux cultivars ne possédant pas de protéine R capable de détecter une protéine Avr d'activer néanmoins des réactions de défense.

Dans notre modèle, les cellules de vigne *Vitis vinifera* cv Gamay seraient capables de reconnaître le facteur de virulence BcPG1, lui conférant ainsi un caractère d'avirulence. Il se pourrait alors que cette protéine soit pour la souche T4 de *Botrytis cinerea* un facteur de virulence sur certaines plantes comme la tomate et un facteur d'avirulence sur la vigne. Nous pouvons aussi imaginer que, sur un même cultivar de vigne, BcPG1 soit un facteur d'avirulence sur les feuilles et un facteur de virulence sur les raisins mûrs. Cependant, des travaux récents ont montré que la RH et les FAO favorisaient le développement du nécrotrophe *Botrytis cinerea* (Govrin et Levine, 2000). Dans ce cas, *Botrytis cinerea* serait capable d'utiliser à son profit les réactions de défense de la plante activées en réponse à BcPG1, dont les FAO et la mort cellulaire. Dans le même temps, ces réactions de défense seraient efficaces contre des pathogènes biotrophes, éliminant ainsi une possible compétition entre micro-organismes au bénéfice de *Botrytis cinerea*. Ainsi, au sein du couple *Botrytis*/Vigne, BcPG1 est à la fois un facteur d'avirulence (par sa capacité à activer les réponses de la vigne) et un facteur de virulence (par sa capacité à favoriser le développement de *Botrytis cinerea* via les défenses de la plante). Dans cette hypothèse la moindre virulence du mutant $\Delta Bcpg1$ de Ten Have *et al.* (1998) pourrait s'expliquer par l'incapacité de ce mutant à induire des réactions de défense bénéfiques au

développement de *Botrytis cinerea*. Cette interprétation d'un couple particulier rend compte de la façon dont plantes et microbes, au cours de l'évolution, luttent pour leur survie.

Protection de la vigne par activation des réactions de défense

Dans le souci de transférer les connaissances acquises au laboratoire à l'application d'une stratégie « activation des réactions de défense par utilisation d'éliciteurs » en viticulture, nous avons mis au point plusieurs tests de protection.

Le test de protection sur cellules nous a permis de vérifier que l'activation des réactions de défense induite par les éliciteurs de *Botrytis cinerea* et la laminarine limite le développement de *Botrytis cinerea*. Ce test original a plusieurs intérêts : le traitement est homogène, les problèmes de pénétration d'une molécule sont limités et il ne nécessite pas la culture onéreuse de plantes en serre. Néanmoins, le développement de ce test nécessite des expériences complémentaires pour vérifier notamment que la protection observée contre *Botrytis cinerea* peut également l'être avec d'autres éliciteurs et contre d'autres pathogènes. Ce test pourrait ensuite être utilisé lors d'une première étape de criblage de molécules inconnues.

Afin de nous rapprocher des conditions au vignoble nous avons développé, au sein du RVVS, de nouveaux tests de protection sur feuilles ou plants de vigne en utilisant deux pathogènes : *Botrytis cinerea* et *Plasmopara viticola*. Le test mis au point par le Dr. A. Aziz (Université de Reims) consiste à détacher des feuilles de vitro-plants de vigne, à les exposer à une solution d'éliciteur par flottaison pendant une durée de 1 à 4 jour(s) (selon les tests) puis à les inoculer par 200 conidies de *Botrytis cinerea*. Quatre jours après inoculation, le diamètre de développement du champignon est mesuré et comparé à celui obtenu sur des feuilles traitées par de l'eau. Les résultats de ce test réalisé avec des feuilles de vigne pré-traitées pendant 24 h avec la laminarine (0,5 ou 1 mg/mL) montre une réduction de 40% du diamètre de développement de *Botrytis cinerea* (A. Aziz, communication personnelle). Ce test confirme les résultats de protection obtenus avec le test sur cellules puisque la réduction du développement de *Botrytis cinerea* est du même ordre de grandeur. Il indique également que la laminarine peut être efficace sur différentes plantes puisqu'une protection avait déjà été mise en évidence sur le tabac

(Klarzynski *et al.*, 2000). L'efficacité de protection de la laminarine a également été vérifiée contre un parasite obligatoire de la vigne : *Plasmopara viticola*.

Au sein de notre laboratoire, le test développé par le Dr. X. Daire consiste à pulvériser une solution aqueuse de laminarine (0,5 g/L) sur des plants de vigne (*Vitis vinifera* cv Chardonnay) cultivés en pot puis, 10 jours plus tard, à les inoculer par pulvérisation d'une suspension de spores (10^5 /mL) de mildiou (*Plasmopara viticola*). Sept jours après inoculation, la surface foliaire couverte par des spores est mesurée, les spores sont comptées et le niveau de protection est évalué après une étude statistique. Les résultats montrent une protection induite par la laminarine contre *Plasmopara viticola* de l'ordre de 60%. Cette dernière information montre que l'activation des réactions de défense d'une plante par un éliciteur peut mener à une protection accrue contre deux pathogènes différents. Cette observation conforte l'idée que l'activation des réactions de défense d'une plante conduit à une protection contre un large spectre de pathogènes. Ainsi, des plants de tabac traités par la cryptogéine présentent une résistance accrue contre *Phytophthora parasitica*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* et *Rhizoctonia solani* (Ricci, 1997). Des résultats similaires ont été obtenus avec le concombre traité par l'harpine, une protéine élicitrice codée par le gène *HrpZp_{ss}* de *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (Strobel *et al.*, 1996). Alors que le système immunitaire des mammifères permet d'obtenir une protection contre un seul pathogène après vaccination, l'activation des réactions de défense des plantes par des éliciteurs entraîne une protection contre une multitude de pathogènes d'origine diverse. Cette observation renforce l'intérêt de la stratégie « activation des réactions de défense de la plante » dans la perspective d'une application en viticulture raisonnée.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis d'identifier des éliciteurs actifs sur la vigne. Trois d'entre eux ont été étudiés en détail quant aux réactions de défense qu'ils étaient capables d'induire dans cette plante. Une approche pharmacologique a également été menée pour essayer de comprendre les liens qui existent entre les événements précoces activés dans les suspensions cellulaires de vigne par T4BcPG1. Il ressort de cette étude que les réactions de défense activées dans la vigne sont globalement les mêmes que dans d'autres plantes. Cependant, dans la vigne, les interconnexions entre les voies de signalisation semblent différentes de celles connues dans d'autres modèles éliciteurs/cellules végétales. Ces différences soulèvent la question de savoir quelle est l'origine de ces divergences : la vigne ou l'éliciteur ? La vigne est une plante ligneuse et pérenne. Elle pourrait donc avoir des voies de signalisation différentes de celles des plantes annuelles herbacées qui constituent les principaux modèles de recherche fondamentale dans le domaine des interactions plantes/pathogènes. Sa sensibilité au calcaire pourrait expliquer pourquoi cet ion n'est peut-être pas le second messager privilégié par la vigne contrairement à d'autres espèces végétales. D'un autre côté, BcPG1 a la particularité d'être un facteur de virulence pour d'autres espèces végétales. A l'origine, il semble que la cible de cette enzyme soit la paroi végétale mais, au cours de l'évolution, la vigne aurait sélectionné des moyens de reconnaissance de ce facteur de virulence constitutif. Il est donc possible qu'en fonction du rôle originel d'un éliciteur pour un micro-organisme, les voies de signalisation activées dans la plante soient différentes. Pour tenter de connaître l'origine de ces divergences entre la vigne et les autres modèles cellules végétales/éliciteurs, il serait intéressant de réaliser une étude pharmacologique sur la vigne en utilisant un éliciteur (comme les OGA) dont le mode d'action est en partie connu sur d'autres plantes, et d'étudier les voies de signalisation et leurs interconnexions induites par BcPG1 dans une autre espèce végétale comme le tabac ou *Arabidopsis thaliana*. Des résultats récents révèlent que BcPG1 est actif sur ces plantes.

Cette dernière observation indique que BcPG1 n'est pas un éliciteur spécifique d'un genre de plante. Cette non-spécificité pourrait s'expliquer par le fait que *Botrytis cinerea* est connu dans la littérature pour avoir plus de 200 plantes hôtes. Cependant, l'identification moléculaire des souches de ce pathogène montre qu'il existe plusieurs (sous-)espèces de *Botrytis* qui semblent, dans la nature, beaucoup plus inféodées à une plante donnée (Giraud *et al.*, 1998). Au laboratoire, nos résultats et ceux de Derckel *et al.* (1999) indiquent que sur la vigne la souche T4 est avirulente alors que d'autres souches (V940, K1, T8) sont virulentes. De plus, il semble que la souche T4 soit virulente sur d'autres plantes comme la tomate ou le haricot. Ainsi, la virulence ou l'avirulence de ce champignon pourrait être gouvernée par des interactions « gène pour gène » en fonction des génotypes des plantes et des souches de *Botrytis cinerea*. Nos résultats montrent que BcPG1 induit un ensemble d'événements qui participent aux réactions de défense de la vigne et des plantes en général. A ce titre, cette protéine a toutes les caractéristiques d'un éliciteur qui pourrait être considéré comme le produit d'un gène d'avirulence sur la vigne. De plus, les forts polymorphismes observés au sein des polygalacturonases de *Botrytis cinerea* et des PGIP de plantes suggèrent un rôle important de ces deux types de protéines dans la virulence/avirulence des souches de ce pathogène et dans la sensibilité/résistance de ses hôtes. Dans ce cas, une interaction physique de BcPG1 d'une souche de *Botrytis cinerea* avec une PGIP spécifique d'une plante donnée ne pourrait-elle pas participer à la reconnaissance du pathogène, étape initiale de l'activation des réactions de défense de la plante dans le modèle « gène pour gène » ? Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier, sur une plante donnée, si l'avirulence d'une souche de *Botrytis cinerea* (dont les gènes *Bcpg* sont caractérisés) est liée à la présence d'un gène *PGIP* spécifique dans le génome végétal correspondant. L'utilisation de plantes transgéniques ou de mutants d'*Arabidopsis* devrait permettre de répondre à cette interrogation. Nous pourrions aussi vérifier si les autres endopolygalacturonases de la souche T4 de *Botrytis cinerea* (BcPG 2 à 6) sont capables d'activer les réactions de défense de la vigne (*Vitis vinifera* cv Gamay) indépendamment de leur activité enzymatique. Dans ce contexte, la mutagenèse dirigée au sein de *Bcpg1* pourrait permettre d'identifier les acides aminés impliqués dans le motif éliciteur de la protéine et de savoir si ce motif interagit avec une PGIP ou encore si le motif éliciteur correspond au site

catalytique. Par ailleurs, la mesure *in planta* de la production de BcPG1 par des souches virulentes ou avirulentes de *Botrytis cinerea*, devrait permettre de mieux comprendre le rôle de BcPG1 dans le développement de ce champignon.

Dans la littérature, l'expression de *Chit1b* est connue pour être régulée par l'éthylène, probablement en synergie avec JA (Ellis et Turner, 2001 ; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). Dans les cellules de vigne, la laminarine ou BcPG1 induisent l'expression de *Chit1b* suggérant une production de ces molécules signalisatrices dans cette plante. Plus généralement, quelle pourrait être l'implication de l'AS, JA et E dans la mise en place des réactions de défense de la vigne ? Des dosages de SA, JA et E ainsi que l'identification puis l'analyse de l'expression des gènes *PR-1*, *PDF1.2*, et *VSP* chez la vigne permettraient certainement de mieux comprendre les synergies et antagonismes entre ces différentes molécules qui semblent régir la mise en place de nombreuses réactions de défense et des résistances systémiques. S'il s'avère que le mode d'action des éliciteurs efficaces sur la vigne est comparable sur *Arabidopsis*, l'utilisation de mutants de ce modèle génétique et de la technique de « micro-array » pourraient permettre d'améliorer rapidement nos connaissances des interconnexions existantes entre les diverses voies de signalisation empruntées et la mise en place des réactions de défense.

Par ailleurs, les résultats de collaborateurs du RVVS et les nôtres ont mis en évidence que le traitement de cellules, feuilles ou plants de vigne avec des éliciteurs conduit à une tolérance accrue à deux pathogènes fongiques : *Botrytis cinerea* et *Plasmopara viticola*. Quand est-il de la résistance qui pourrait être induite par BcPG1 ? Nos premières infiltrations de BcPG1 dans des feuilles de vigne laissent présager de grandes difficultés pour la pénétration de cette macromolécule dans cette plante ligneuse. C'est pourquoi, la recherche d'un peptide éliciteur minimal devrait être entreprise. S'il existe des problèmes de pénétration de BcPG1 et si un peptide éliciteur ne peut pas être identifié, l'expression du gène *Bcpg1* sous le contrôle d'un promoteur inductible dans la vigne, avec un adressage apoplastique de la protéine, pourrait permettre d'évaluer la résistance induite par BcPG1.

L'identification de l'éliciteur BcPG1 a permis de caractériser des réactions de défense de la vigne, réactions utilisées ensuite pour rechercher d'autres éliciteurs efficaces sur cette plante. Ces éliciteurs, de nature chimique différente, ont probablement des modes d'action différents

qu'ils faudra étudier pour mieux comprendre la subtilité des interactions plantes/micro-organismes. Plusieurs résultats, notamment obtenus sur *Arabidopsis*, suggèrent une spécialisation des défenses activées en fonction de l'agent pathogène à combattre (Thomma *et al.*, 2001), il serait donc intéressant de développer, au sein du RVVS, plusieurs pathosystèmes pour étudier les interactions entre la vigne et différents micro-organismes (virus, bactéries, champignon biotrophe, nécrotrophe...) afin d'améliorer la compréhension des réactions de défense efficaces contre un pathogène particulier. Par ailleurs, jour après jour de nouveaux gènes de vigne sont identifiés. Le développement d'une technique permettant l'analyse globale de l'expression de tous ces gènes améliorerait nettement la compréhension des mécanismes de défense de la vigne mis en jeu dans chaque pathosystème en fonction des tissus ou des conditions physiologiques. L'ensemble des connaissances alors acquises sur les réactions de défense de la vigne devraient guider le choix d'un (des) éliciteur(s) pour une application au vignoble. Ce choix sera aussi conditionné par les connaissances de l'aptitude de l'éliciteur à pénétrer dans la plante, le temps nécessaire à l'activation des réactions de défense, la durée de la protection, sa métabolisation, son incidence sur la qualité des raisins et des vins.

Cette stratégie d'activation des réactions de défense de la vigne par l'utilisation éliciteurs, démontrée au laboratoire, devrait se vérifier au vignoble et être appliquée à relativement court terme pour contribuer au développement de la viticulture raisonnée.

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abad, L.R., D'Urzo, M.P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Reuveni, M., Zhu, J.K., Niu, X., Singh, N.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A.** (1996) Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci.*, 118, 11-23.
- **Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L.A., Bessis, R.** (1997) Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *J. Chem. Ecol.*, 23, 1689-1702.
- **Alexander, D., Stinson, J., Pear, J., Glascock, C., Ward, E., Goodman, R.M., Ryals, J.** (1992) A new multigene family inducible by tobacco mosaic virus or salicylic acid in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5, 513-515.
- **Allan, A.C., Fluhr, R.** (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, 9, 1559-1572.
- **Allen, D.G., Blinks, J.R., Prendergast, F.G.** (1977) Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration: a calcium-independent component. *Science*, 195, 996-998.
- **Alleweldt, G., Possingham, J.V.** (1988) Progress in grapevine breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 75, 669-673.
- **Anderson, P.A., Lawrence, G.J., Morrish, B.C., Ayliffe, M.A., Finnegan, E.J., Ellis, J.G.** (1997) Inactivation of the flax rust resistance gene *M* associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. *Plant Cell*, 9, 641-651.
- **Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., Sheen, J.** (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415, 977-983.
- **Asensio, J.L., Canada, F.J., Siebert, H.C., Laynez, J., Poveda, A., Nieto, P.M., Soedjanaamadja, U.M., Gabius, H.J., Jimenez-Barbero, J.** (2000) Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. *Chem. Biol.*, 7, 529-543.
- **Atkinson, M.M., Baker, C.J.** (1989) Role of the plasmalemma H⁺-ATPase in *Pseudomonas syringae*-induced K⁺/H⁺ exchange in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol.*, 91, 298-303.
- **Atkinson, M.M., Keppler, L.D., Orlandi, E.W., Baker, C.J., Mischke, C.F.** (1990) Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the K⁺/H⁺ and hypersensitive responses in tobacco. *Plant Physiol.*, 92, 215-221.
- **Ayers, A.R., Ebel, J., Finelli, F., Berger, N., Albersheim, P.** (1976) Host-pathogen interactions: IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* pv. *sojae*. *Plant Physiol.*, 57, 751-759.

- **Bach, E., Schollmeyer, E.** (1992) An ultraviolet-spectrophotometric method with 2-cyanoacetamide for the determination of the enzymatic degradation of reducing polysaccharides. *Anal. Biochem.*, 203, 335-339.
- **Baillieul, F., Genetet, I., Kopp, M., Saindrenan, P., Fritig, B., Kauffmann, S.** (1995) A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defense genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance. *Plant J.*, 8, 551-560.
- **Bais, A.J., Murphy, P.J., Dry, I.B.** (2000) The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Austral. J. Plant Physiol.*, 27, 425-433.
- **Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dinesh-Kumar, S.P.** (1997) Signalling in plant-microbe interactions. *Science*, 276, 726-733.
- **Baker, C.J., Deahl, K., Domek, J., Orlandi, E.W.** (1998) Oxygen metabolism in plant/bacterial interactions: effects of DPI on the pseudo-NAD(P)H oxidase activity of peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252, 461-464.
- **Baker, C.J., Orlandi, E.W.** (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33, 299-321.
- **Baker, C.J., Orlandi, E.W., Mock, N.M.** (1993) Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol.*, 102, 1341-1344.
- **Baldwin, D., Crane, V., Rice, D.** (1999) A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 96-103.
- **Barka, E.A., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J., Audran, J.C.** (2000) Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 186, 91-95.
- **Basse, C.W., Fath, A., Boller, T.** (1993) High affinity binding of a glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. *J. Biol. Chem.*, 268, 14724-14731.
- **Becraft, P.W.** (1998) Receptor kinases in plant development. *Trends Plant Sci.*, 3, 384-388.
- **Benen, J.A.E., Kester, H.C.M., Visser, J.** (1999) Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *Eur. J. Biochem.*, 259, 577-285.
- **Benhamou, N.** (1996) Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci.*, 1, 233-240.
- **Bent, A.F.** (1996) Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell*, 8, 1757-1771.
- **Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., Staskawicz, B.** (1994) *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science*, 265, 1856-1860.
- **Bergmann, C., Ito, Y., Singer, D., Albersheim, P., Darvill, A.G., Benhamou, N., Nuss, L., Salvi, G., Cervone, F., De Lorenzo, G.** (1994) Polygalacturonase-inhibiting protein accumulates in *Phaseolus vulgaris* L. in response to wounding, elicitors, and fungal infection. *Plant J.*, 5, 625-634.

- **Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Solano, R.** (2002) Constitutive expression of *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.*, 29, 23-32.
- **Bestwick, C., Bolwell, P., Mansfield, J., Nicole, M., Wojtaszek, P.** (1999) Generation of the oxidative burst - scavenging for the truth. *Trends Plant Sci.*, 4, 88-89.
- **Binet, M.N., Bourque, S., Lebrun-Garcia, A., Chiltz, A., Pugin, A.** (1998) Comparison of the effects of cryptogin and oligogalacturonides on tobacco cells and evidence of different forms of desensitization induced by these elicitors. *Plant Sci.*, 137, 33-41.
- **Binet, M.N., Humbert, C., Lecourieux, D., Vantard, M. and Pugin, A.** (2001) Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogin, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiol.*, 125, 564-572.
- **Blée, E.** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.*, 7, 315-321.
- **Blein, J.P., Milat, M.-L., Ricci, P.** (1991) Responses of cultured tobacco cells to cryptogin, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiol.*, 95, 486-491.
- **Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., Scheel, D.** (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*, 12, 1425-1440.
- **Blumwald, E., Aharon, G.S., Lam, B.C.H.** (1998) Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.*, 3, 342-346.
- **Boissy, G., De la Fortelle, E., Kahn, R., Huet, J.C., Bridogne, G., Pernollet, J.C., Brunie, S.** (1996) Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure*, 4, 1429-1439.
- **Bol, J.F., Linthorst, H.J.M., Cornelissen, B.J.C.** (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28, 113-128.
- **Boller, T.** (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46, 489-214.
- **Bonas, U., Lahaye, T.** (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin. Microbiol.*, 5, 44-50.
- **Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J.P., Ricci, P.** (1996) Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 102, 181-192.
- **Bonnet, P., Lacourt, I., Venard, P., Ricci, P.** (1994) Diversity in pathogenicity to tobacco and in elicitor production among isolates of *Phytophthora parasitica*. *J. Phytopathol.*, 141, 25-37.
- **Bostock, R.M., Kuc, J.A.** (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicits fungitoxic sesquiterpenes in potato. *Science*, 212, 67-69.

- **Bottin, A., Veronesi, C., Pontier, D., Esquerré-Tugaye, M.T., Blein, J.P., Rustérucci, C., Ricci, P.** (1994) Differential responses of tobacco cells to elicitors from two *Phytophthora* species. *Plant Physiol. Biochem.*, 32, 373-378.
- **Bourque, S., Binet, M.N., Ponchet, M., Pugin, A., Lebrun-Garcia, A.** (1999) Characterization of the cryptogin binding sites on plant plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 274, 34699-34705.
- **Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- **Brady, J.D., Fry, S.C.** (1997) Formation of di-isotyrosine and loss of isodityrosine in the cell walls of tomato cell-suspension cultures treated with fungal elicitor of H₂O₂. *Plant Physiol.*, 115, 87-92.
- **Brunner, F., Stintzi, A., Fritig, B., Legrand, M.** (1998) Substrate specificities of tobacco chitinases. *Plant J.*, 14, 225-234.
- **Breuil, A.C., Adrian, M., Pirio, N., Meunier, P., Bessi, R., Jeandet, P.** (1998) Metabolism of stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*: characterization of a resveratrol dehydrodimer. *Tetrahedron lett.*, 39, 537-540.
- **Brisson, L.F., Tenhaken, R., Lamb, C.** (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell*, 6, 1703-1712.
- **Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., De Samblanx, G.W., Osborn, R.W.** (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16, 297-323.
- **Busam, G., Kassemeyer, H.H., Matern, U.** (1997) Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiol.*, 115, 1029-1038.
- **Bush, D.S.** (1993) Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol.*, 103, 7-13.
- **Bush, D.S.** (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 27, 953-967.
- **Calderon, A., Zapata, A.A., Pedreno, M., Munoz, R., Barcelo, A.R.** (1992) Levels of 4-hydroxystilbene-oxidizing isoperoxidases related to constitutive disease resistance in *in vitro*-cultured grapevine. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 29, 63-70.
- **Calderon, A., Zapata, J.M., Barcelo, A.R.** (1994) Peroxidase-mediated formation of reveratrol oxidation products during the hypersensitive-like reaction of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 44, 289-299.
- **Camacho, L., Parton, R., Trewavas, A.J., Malho, R.** (2000) Imaging cytosolic free-calcium distribution and oscillations in pollen tubes with confocal microscopy: a comparison of different dyes and loading methods. *Protoplasma*, 212, 162-173.
- **Cameron, R.K., Paiva, N.L., Lamb, C.J., Dixon, R.A.** (1999) Accumulation of salicylic acid and *PR-I* 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.

- **Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., Hirt, H.** (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J. Biol. Chem.*, 275, 36734-36740.
- **Cardinale, F., Meskiene, I., Ouaked, F., Hirt, H.** (2002) Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell*, 14, 703-711.
- **Cervone, F., De Lorenzo, G., Degrà, L., Salvi, G., Bergami, M.** (1987) Purification and characterization of a polygalacturonase inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.*, 85, 631-637.
- **Cervone, F., De Lorenzo, G., Pressey, R., Darvill, A., Albersheim, P.** (1990) Can *Phaseolus* PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants? *Phytochem.*, 29, 447-449.
- **Cervone, F., Hahn, M.G., De Lorenzo, G., Darvill, A., Albersheim, P.** (1989) Host-pathogen interactions XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiol.*, 90, 542-548.
- **Cessna, S.G., Sears, V.E., Dickman, M.B., Low, P.S.** (2000) Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell*, 12, 2191-2199.
- **Chandra, S., Low, P.S.** (1995) Role of phosphorylation in elicitation of the oxydative burst in cultured soybean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, 4120-4123.
- **Chang, J.H., Rathjen, J.P., Bernal, A.J., Staskawicz, B.J. and Michelmore, R.W.** (2000) *AvrPto* enhances growth and necrosis caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato lines lacking either *Pto* or *Prf*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13, 568-571.
- **Chen, W.Q., Singh, K.B.** (1999) The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the Arabidopsis *GST6* promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J.*, 19, 667-677.
- **Cheong, J.J., Hahn, M.G.** (1991) A specific, high-affinity binding site for the hepta- β -glucoside elicitor exists in soybean membranes. *Plant Cell.*, 3, 137-147.
- **Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B., Saindrenan, P.** (2002) Downregulation of a pathogen-responsive tobacco udp-gluc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell*, 14, 1093-1107.
- **Clough, S.J., Fengler, K.A., Yu, I.-C., Lippok, B., Smith, R.K., Bent, A.F.** (2000) The *Arabidopsis dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 9323-9328.
- **Cohen, Y., Reuveni, M., Baider, A.** (1999) Local and systemic activity of BABA (DL-3- β -aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. *Eur. J. Plant Pathol.*, 105, 351-361.
- **Collins, N., Drake, J., Ayliffe, M., Sun, Q., Ellis, J., Hulbert, S., Pryor, T.** (1999) Molecular characterization of the maize *Rpl-d* rust resistance haplotype and its mutant. *Plant Cell*, 11, 1365-1376.
- **Collmer, A.** (1998) Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 329-335.

- **Conrath, U., Domard, A., Kauss, H.** (1989) Chitosan-elicited synthesis of callose and coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, 8, 152-155.
- **Côté, F., Cheong, J.J., Alba, R., Hahn, M.G.** (1995) Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside elicitors of phytoalexin synthesis in soybean. *Physiol. Plant.*, 93, 401-410.
- **Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R. and Boulay, M.** (2001) *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *VST1* gene under the control of a pathogen-inducible *PR10* promoter. *J. Exp. Bot.*, 358, 901-910.
- **Croft, K.P.C., Voisey, C.R., Slusarenko, A.J.** (1990) Mechanism of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.) inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 36, 49-62.
- **Dai, G.H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., Boubals, D.** (1995a) Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Eur. J. Plant Pathol.*, 101, 541-547.
- **Dai, G.H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., Boubals, D.** (1995b) Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 46, 177-188.
- **Dai, G.H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., Boubals, D.** (1995c) Histochemical responses of leaves of *in vitro* plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmopara viticola*. *Phytopathol.*, 85, 149-154.
- **Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H.** (1996) Death don't have no mercy : cell death programs in plant-microbe interaction. *Plant Cell*, 8, 1793-1807.
- **Dangl, J.L., Jones, J.D.G.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826-833.
- **Davis, K.R., Darvill, A.G., Albersheim, P., Dell, A.** (1986) Host-pathogen interactions XXIX. Oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexins in soybean. *Plant Physiol.*, 80, 568-577.
- **Davis, K.R., Hahlbrock, K.** (1987) Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiol.*, 85, 1286-1290.
- **De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D., Caprari, C., Clark, A.J., Desiderio, A., Devoto, A., Forrest, R., Leckie, F., Nuss, L., Salvi, G.** (1993) Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication. *Biochem. Soc. Trans.*, 22, 394-397.
- **De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., Cervone, F.** (2001) Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 39, 313-335.
- **De Lorenzo, G., Ferrari, S.** (2002) Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 5, 295-299.

- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gutrella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J. (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266, 1247-1250.
- Delledonne, M., Xia, Y.J., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394, 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13454-13459.
- Derckel, J.P., Audran, J.C., Haye, B., Lambert, B., Legendre, L. (1998) Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and β -1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiol. Plant.*, 104, 56-64.
- Derckel, J.P., Baillieul, F., Manteau, S., Audran, J.C., Haye, B., Lambert, B., Legendre, L. (1999) Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathol.*, 89, 197-203.
- Derckel, J.P., Legendre, L., Audran, J.C., Haye, B., Lambert, B. (1996) Chitinase of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) : five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in others tissues. *Plant Sci.*, 119, 31-37.
- Desikan, R., Clarke, A., Atherfold, P., Hancock, J.T., Neill, S.J. (1999) Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defence responses in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Planta*, 210, 97-103.
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., Fobert, P.R. (2000) The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family bZIP transcription factors. *Plant Cell*, 12, 279-290.
- De Wit, P.J.G.M. (2002) On guard. *Nature*, 416, 801-803.
- Diaz, J., Ten Have, A. and Van Kan, J.A.L. (2002) The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.*, 129, 1341-1351.
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., Dangl, J.L. (1994) *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 77, 565-577.
- Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C., Dangl, J.L. (1997) A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* *LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell*, 88, 685-694.
- Dixon, M.S., Golstein, C., Thomas, C.M., Van der Biezen, E.A., Jones, J.D.G. (2000) Genetic complexity of pathogen perception by plants: The example of *Rcr3*, a tomato gene required specifically by *Cf-2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 8807-8814.
- Dixon, R.A., Lamb, C.J., Masoud, S., Sewalt, V.J.H., Paiva, N.L. (1996) Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses - a review. *Gene*, 179, 61-71.
- Dong, X. (2001) Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 309-314.

- **Dorey, S., Kopp, M., Geoffroy, P., Fritig, B., Kauffmann, S.** (1999) Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiol.*, 121, 163-171.
- **Dubos, B.** (1999) Maladies cryptogamiques de la vigne. Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. Eds Féret, *collections des usuels Féret de la vigne et du vins*, 1-174.
- **Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F.** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10328-10333.
- **Ebel, J.** (1998) Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *BioEssays*, 20, 569-576.
- **Ebel, J., Cosio, E.G.** (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.*, 148, 1-36.
- **Ecker, J.R.** (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, 268, 667-675.
- **Ellis, C., Turner, J.G.** (2001) The *Arabidopsis* mutant *cevl* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell*, 13, 1025-1033.
- **Enkerli, J., Felix, G., Boller, T.** (1999) The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiol.*, 121, 391-397.
- **Erickson, F.L., Holzberg, S., CalderonUrrea, A., Handley, V., Axtell, M., Corr, C., Baker, B.** (1999) The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant J.*, 18, 67-75.
- **Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D.G., Daniels, M.J., Parker, J.E.** (1999) EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3292-3297.
- **Fath, A. and Boller, T.** (1996) Solubilization, partial purification, and characterization of a binding site for a glycopeptide elicitor from microsomal membranes of tomato cells. *Plant Physiol.*, 112, 1659-1668.
- **Federici, L., Caprari, C., Mattei, B., Savino, C., Di Matteo, A., De Lorenzo, G., Cervone, F., Tsernoglou, D.** (2001) Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (Polygalacturonase-inhibiting protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13425-13430.
- **Felix, G., Baureithel, K., Boller, T.** (1998) Desensitization of the perception system for chitin fragments in tomato cells. *Plant Physiol.*, 117, 643-650.
- **Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T.** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.*, 18, 265-276.
- **Felix, G., Grosskopf, D.G., Regenass, M., Boller, T.** (1991) Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 8831-8834.

- **Felix, G., Regenass, M., Boller, T.** (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of refractory state. *Plant J.*, 4, 307-316.
- **Felix, G., Regenass, M., Spanu, P., Boller, T.** (1994) The protein phosphatase inhibitor calyculin A mimics elicitor action in plant cells and induces rapid hyperphosphorylation of specific proteins as revealed by pulse labeling with [³²P]phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 952-956.
- **Flor, H.H.** (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathol.*, 32, 653-669.
- **Flor, H.H.** (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 9, 275-296.
- **Foissner, I., Wendehenne, D., Langerbartels, C., Durner, J.** (2000) *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J.*, 23, 817-824.
- **Fournier, J., Pouénat, M., Rickauer, M., Rabinovitch-Chable, H., Rigaud, M., Esquerré-Tugaye, M.T.** (1993) Purification and characterization of an elicitor-induced lipoxygenase in tobacco cells. *Plant J.*, 3, 63-70.
- **Frahry, G., Schopfer, P.** (1998) Inhibition of O₂-reducing activity of horseradish peroxidase by diphenyleneiodonium. *Phytochem.*, 48, 223-227.
- **Fritig, B., Heitz, T., Legrand, M.** (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.*, 10, 16-22.
- **Frye, C.A., Tang, D., Innes, R.W.** (2001) Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 373-378.
- **Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessman, H., Ryals, J.** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261, 754-756.
- **Garcia-Pineda, E., Lozoya-Gloria, E.** (1999) Induced gene expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC oxidase) in pepper (*Capsicum annuum* L.) by arachidonic acid. *Plant Sci.*, 145, 11-21.
- **Gassmann, W., Hinsch, M.E., Staskawicz, B.J.** (1999) The Arabidopsis *RPS4* bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *Plant J.*, 20, 265-277.
- **Geisler, M., Axelsen, K.B., Harper, J.F., Palmgren, M.G.** (2000) Molecular aspects of higher plant P-type Ca²⁺-ATPases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1465, 52-78.
- **Gelli, A., Higgins, V.J., Blumwald, E.** (1997) Activation of plant plasma membrane Ca²⁺-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.*, 113, 269-279.
- **Gianinazzi, S., Martin, C., Vallée, J.C.** (1970) Hypersensibilité au virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* nc. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 270, 2383-2386.
- **Gil-ad, N., Mayer, M.** (1999) Evidence for rapid breakdown of hydrogen peroxide by *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 455-461.

- **Giraud, T., Levis, C., Fortini, D., Leroux, P., Brygoo, Y.** (1998) Plusieurs espèces cachées sous le nom de *Botrytis cinerea*! *Phytoma*, 504, 56-60.
- **Giraudat, J.** (1995) Absciscic acid signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 232-238.
- **Glazebrook, J., Ausubel, F.M.** (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8955-8959.
- **Glazener, J.A., Orlandi, E.W., Baker, J.C.** (1996) The active oxygen response of cell suspension to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol.*, 110, 759-763.
- **Gomez-Gomez, L., Boller, T.** (2000) FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*, 5, 1003-1011.
- **Gomez-Gomez, L., Boller, T.** (2002) Flagellin perception : a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.*, 7, 251-256.
- **Gomez-Gomez, L., Felix, G., Boller, T.** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 18, 277-284.
- **Gorman, A.L.F., Thomas, M.V.** (1980) Intracellular calcium accumulation during depolarization in a molluscan neurone. *J. Physiol.*, 308.
- **Govrin, E.M., Levine, A.** (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.*, 10, 751-757.
- **Grab, D., Feger, M., Ebel, J.** (1989) An endogenous factor from soybean (*Glycine max* L.) cell cultures activates phosphorylation of a protein which is dephosphorylated in vivo in elicitor-challenged cells. *Planta*, 179, 340-348.
- **Granado, J., Felix, G., Boller, T.** (1995) Perception of fungal sterol in plants. *Plant Physiol.*, 107, 485-490.
- **Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W., Dangl, J.L.** (1995) Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, 269, 843-846.
- **Groom, O.J., Torres, M.A., Fordham-Skelton, P., Hammond-Kosak, K.E., Robinson, N.J., Jones, J.D.G.** (1996) *RbohA*, a rice homologue of the mammalian *pg91phox* respiratory burst oxidase gene. *Plant J.*, 10, 515-522.
- **Gu, Y.Q., Yang, C., Thara, V.K., Zhou, J., Martin, G.B.** (2000) Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell*, 12, 771-785.
- **Hadwiger, L.A., Beckman, J.M.** (1980) Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiol.*, 66, 205-211.
- **Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R., Schmelzer, E.** (1995) Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4150-4157.

- **Hahn, M.G., Darvill, A.G., Albersheim, P.** (1981) Host-pathogen interactions XIX: The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *Plant Physiol.*, 68, 1161-1169.
- **Hain, R., Reif, H., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stocker, R.H., Stenzel, K.** (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 361, 153-156.
- **Hammerschmidt, R.** (1999) Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37, 285-306.
- **Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G.** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8, 1773-1791.
- **Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G.** (1997) Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 575-607.
- **Hanania, U., Avni, A.** (1997) High-affinity binding site for ethylene-inducing xylanase elicitor on *Nicotianae tabacum* membranes. *Plant J.*, 12, 113-120.
- **Harding, S.A., Roberts, D.M.** (1998) Incompatible pathogen infection results in enhanced reactive oxygen and cell death responses in transgenic tobacco expressing a hyperactive mutant calmodulin. *Planta*, 206, 253-258.
- **He, S.Y., Huang, H.C., Collmer, A.** (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{pss}: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, 73, 1255-1266.
- **He, Z., Wang, Z.Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P., Chory, J.** (2000) Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science*, 288, 2360-2363.
- **Heath, M.C.** (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 315-319.
- **Heintz, C., Blaich, R.** (1989) Structural characters of epidermal cell walls and resistance to powdery mildew of different grapevine cultivars. *Vitis*, 28, 153-160.
- **Hipskind, J.D., Paiva, N.L.** (2000) Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13, 551-562.
- **Hirt, H.** (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.*, 2, 11-15.
- **Hoos, G., Blaich, R.** (1990) Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelia growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *J. Phytopathol.*, 129, 102-110.
- **Hwang, I., Sze, H., Harper, J.F.** (2000) A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 6224-6229.
- **Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, K., Heberle-Bors, E., Ellis, B.E., Morris, P.C., Innes, R.W., Ecker, J.R., Scheel, D., Klessig, D.F.,**

Machida, Y., Mundy, J., Ohashi, Y., Walker, J.C. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.*, 7, 301-308.

- **Ishihara, A., Miyagawa, H., Kuwahara, Y., Ueno, T., Mayama, S.** (1996) Involvement of Ca^{2+} ion in phytoalexin induction in oats. *Plant Sci.*, 115, 9-16.
- **Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4800-4805.
- **Jabs, T.** (1999) Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem. Pharmacol.*, 57, 231-245.
- **Jacobs, A.K., Dry, I.B., Robinson, S.P.** (1999) Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathol.*, 48, 325-336.
- **Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Métraux, J.P., Mauch-Mani, B.** (2001) β -aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Eur. J. Plant pathol.*, 107, 29-37.
- **Jeandet, P., Bessis, R., Gautheron, B.** (1991) The production of resveratrol (3,5,4'-trihydrostilbène) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 41-46.
- **Jeandet, P., Breuil, A.C., Adrian, M., Weston, L.A., Debord, S., Meunier, P., Maume, G., Bessis, R.** (1997) HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorimetry. *Anal. Chem.*, 69, 5172-5177.
- **Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., Valent, B.** (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.*, 19, 4004-4014.
- **Jin, D.F., West, C.A.** (1984) Characteristics of galacturonic acid oligomers as elicitors of cabsene synthase activity in castor bean seedlings. *Plant Physiol.*, 74, 989-992.
- **Jonak, C., Ligterink, W., Hirt, H.** (1999) MAP kinases in plant signal transduction. *Cell Mol. Life Sci.*, 55, 204-213.
- **Jones, J.D.G.** (2001) Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 281-287.
- **Joosten, M.H.A.J., De Wit, P.J.G.M.** (1999) The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 37, 335-367.
- **Kajava, A.V.** (1998) Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.*, 277.
- **Kamoen, O.** (1984) Secretions from *Botrytis cinerea* as elicitors of necrosis and defence. *Rev. Cytol. Biol.*, 7, 241-248.
- **Kamoun, S., Young, M., Glascock, C.B., Tyler, B.M.** (1993) Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6, 15-25.

- **Karadimcheva, B.** (1982) Particularités dans la structure de la pellicule du grain de raisin en égard à la résistance à la pourriture grise de divers cépages. *Bulletin de l'O.I.V.*, 613, 246.
- **Kazan, K., Schenk, P.M., Wilson, I., Manners, J.M.** (2001) DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defence responses. *Mol. Plant Pathol.*, 2, 177-185.
- **Keen, N.T.** (1975) Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens ? *Science*, 187, 74-75.
- **Keen, N.T., Partridge, J.** (1972) Pathogen-produced elicitor of a chemical defense mechanism in soybeans monogenetically resistant to *Phytophthora megasperma* var. *glycinea*. *Phytopathol.*, 62, 768.
- **Keller, H., Pamboukdjian, N., Ponchet, M., Poupet, A., Delon, R., Verrier, J.L., Roby, D., Ricci, P.** (1999) Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell*, 11, 223-235.
- **Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.** (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91(phox) subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell*, 10, 255-266.
- **Kinkema, M., Fan, W., Dong, X.** (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell*, 12, 2339-2350.
- **Kita, N., Boyd, C., Garret, M.R., Jurnak, F., Keen, N.** (1996) Differential effect of site-directed mutations in *PelC* on pectate lyase activity, plant tissue maceration, and elicitor activity. *J. Biol. Chem.*, 271, 26529-26535.
- **Kjemtrup, S., Nimchuk, Z., Dangel, J.L.** (2000) Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Curr. Opin. Microbiol.*, 3, 73-78.
- **Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J.M., Yvin, J.C., Kopp, M., Kloareg, B., Fritig, B.** (2000) Linear β -1,3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.*, 124, 1027-1037.
- **Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Jun Ma, Z., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H.** (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 8849-8855.
- **Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R.** (1996) Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*, 8, 489-503.
- **Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R.** (1997) Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.*, 12, 1067-1078.
- **Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., Trewavas, A.J.** (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, 352, 524-526.
- **Kooman-Gersmann, M., Honee, G., Bonnema, G., De Wit, P.J.G.M.** (1996) A high-affinity binding site for the AVR9 peptide elicitor of *Cladosporium fulvum* is present on plasma membranes of tomato and other solanaceous plants. *Plant Cell*, 8, 929-938.

- **Kooman-Gersmann, M., Vogelsang, R., Vossen, P., vandenHooven, H.W., Mahe, E., Honee, G., DeWit, P.J.G.M.** (1998) Correlation between binding affinity and necrosis-inducing activity of mutant AVR9 peptide elicitors. *Plant Physiol.*, 117, 609-618.
- **Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- **Lagerdah, E.S., Moullet, O., Appels, R.** (1997) Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide binding domain and a leucine-rich region at the *Cre3* nematode resistance locus of wheat. *Genome*, 40, 659-665.
- **Lam, E., Kato, N., Lawton, M.** (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411, 848-853.
- **Lamb, C., Dixon, R.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 251-275.
- **Langcake, P.** (1981) Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon-viniferin, alpha-viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.*, 18, 213-226.
- **Langcake, P., McCarthy, W.V.** (1979) The relationship between resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 18, 244-253.
- **Langcake, P., Pryce, R.J.** (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.*, 9, 77-86.
- **Langcake, P., Pryce, R.J.** (1977a) The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochem.*, 16, 1193-1196.
- **Langcake, P., Pryce, R.J.** (1977b) A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, 33, 151-152.
- **Langcake, P., Pryce, R.J.** (1977c) Oxidative dimerization of 4-hydroxystilbene in vitro: production of grapevine phytoalexin mimic. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 208-210.
- **Lauge, R., Dmitriev, A.P., Joosten, M.H.A.J., De Wit, P.J.G.M.** (1998) Additional resistance gene(s) against *Cladosporium fulvum* present on the *Cf-9* introgression segment are associated with strong PR protein accumulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11, 301-308.
- **Lauge, R., Goodwin, P.H., De Wit, P.J.G.M., Joosten, M.H.A.J.** (2000) Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. *Plant J.*, 23, 735-745.
- **Lawrence, G.J., Finnegan, E.J., Ayliffe, M.A., Ellis, J.G.** (1995) The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. *Plant Cell*, 7, 1195-1206.
- **Lawton, K.A., Potter, S.L., Uknes, S., Ryals, J.** (1994) Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell*, 6, 581-588.
- **Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., Ward, E.** (1998) Functionnal analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 16, 223-233.

- **Lebrun-Garcia, A., Bourque, S., Binet, M.N., Ouaked, F., Wendehenne, D., Chiltz, A., Schäffner, A., Pugin, A.** (1999) Involvement of plasma membrane proteins in plant defense responses. Analysis of the cryptogein signal transduction in tobacco. *Biochimie*, 81, 663-668.
- **Lebrun-Garcia, A., Chiltz, A., Gout, E., Bligny, R., Pugin, A.** (2002) Questioning the role of salicylic acid and cytosolic acidification in mitogen-activated protein kinase activation induced by cryptogein in tobacco cells. *Planta*, 214, 792-797.
- **Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., Pugin, A.** (1998) Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J.*, 15, 773-781.
- **Leckie, F., Mattei, B., Capodicasa, C., Hemmings, A., Nuss, L., Aracri, B., De Lorenzo, G., Cervone, F.** (1999) The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino-acid substitution in the solvent-exposed β -strand/ β -turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. *EMBO J.*, 18, 2352-2363.
- **Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., Pugin, A.** (2002) Analysis of cytosolic free calcium elevations in response to elicitors in tobacco cells. *Plant Cell*, In press.
- **Lecourieux-Ouaked, F., Pugin, A., Lebrun-Garcia, A.** (2000) Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol. Plant-Microbe interact.*, 13, 821-829.
- **Lee, J., Klessig, D.F., Nürnberger T.** (2001) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene *HIN1* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell*, 13, 1079-1093.
- **Legendre, L., Heinsteins, P.F., Low, P.S.** (1992) Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 20140-20147.
- **Leister, R.T., Katagiri, F.** (2000) A resistance gene product of the nucleotide binding site - leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins *in vivo*. *Plant J.*, 22, 345-354.
- **Lemaître, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichart, J.M., Hoffman, J.A.** (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 973-983.
- **Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C.** (1994) H_2O_2 from the oxydative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79, 583-593.
- **Ligterink, W., Hirt, H.** (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway in plants: versatile signaling tools. *Int. Rev. Cytol.*, 201, 209-215.
- **Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H., Scheel, D.** (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*, 276, 2054-2057.
- **Luderer, R., Rivas, S., Nürnberger, T., Mattei, B., Van den Hooven, H.W., Van der Hoorn, R.A., Romeis, T., Wehrfritz, J.M., Blume, B., Nennstiel, D., Zuidema, D., Vervoort, J., De Lorenzo, G., Jones, J.D.G., De Wit, P.J.G.M., Jooststen, M.H.A.J.** (2001) No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 14, 867-876.

- **Machinandarena, M.F., Olivieri, F.P., Daleo, G.R., Oliva, C.R.** (2001) Isolation and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from potato leaves. Accumulation in response to salicylic acid, wounding and infection. *Plant Physiol. Biochem.*, 39, 129-136.
- **Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A., Dangl, J.L.** (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, 108, 743-754.
- **Malho, R., Moutinho, A., vanderLuit, A., Trewavas, A.J.** (1998) Spatial characteristics of calcium signalling: the calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signalling. *Philos. Trans. Roy. Soc. London*, 353, 1463-1473.
- **Malmstrom, S., Akerlund, H.E., Askerlund, P.** (2000) Regulatory role of the N terminus of the vacuolar calcium-ATPase in cauliflower. *Plant Physiol.*, 122, 517-526.
- **Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D., Tanksley, S.** (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262, 1432-1436.
- **Martinez, C., Baccou, J.C., Bresson, E., Baissac, Y., Daniel, J.F., Jalloul, A., Montillet, J.L., Geiger, J.P., Assigbetse, K., Nicole, M.** (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.
- **Mathieu, Y., Kurkdjian, A., Xia, H., Guern, J., Koller, A., Spiro, M.D., O'Neill, M., Albersheim, P., Darvill, A.** (1991) Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant J.*, 1, 333-343.
- **Mathieu, Y., Sanchez, F.J., Droillard, M.J., Lapous, D., Lauriere, C., Guern, J.** (1996) Involvement of protein phosphorylation in the early steps of transduction of the oligogalacturonide signal in tobacco cells. *Plant Physiol. Biochem.*, 34, 399-408.
- **Mauch, F., Dudler, R.** (1993) Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.*, 102, 1193-1201.
- **Mc Dowell, J.M., Dangl, J.L.** (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.*, 25, 79-82.
- **Mehdy, M.C.** (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.*, 105, 467-472.
- **Melan, M.A., Dong, X., Endara, M.E., Davis, K.R., Ausubel, F.M., Peterman, T.K.** (1993) An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscissic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.*, 101, 441-450.
- **Meskiene, I., Hirt, H.** (2000) MAP kinase pathways : molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol. Biol.*, 42, 791-806.
- **Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Panabieres, F., Ricci, P., Blein, J.P.** (1998) Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 245, 133-139.

- **Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Ricci, P., Blein, J.P.** (1997) The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett.*, 416, 190-192.
- **Milat, M.L., Ricci, P., Blein, J.P.** (1991) Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein. *Phytochem.*, 30, 2171-2173.
- **Mindrinis, M., Katagiri, F., Yu, G.L., Ausubel, F.M.** (1994) The *Arabidopsis thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell*, 79, 1089-1099.
- **Mithöfer, A., Daxberger, A., Fromhold-Treu, D., Ebel, J.** (1997) Involvement of an NAD(P)H oxidase in the elicitor-inducible oxidative burst of soybean. *Phytochem.*, 45, 1101-1107.
- **Mithofer, A., Ebel, J., Bhagwat, A.A., Boller, T., Neuhaus, G.** (1999) Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta*, 207, 566-574.
- **Morel, J.B., Dangl, J.L.** (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differentiation*, 4, 671-683.
- **Mudgett, M.B., Staskawicz, B.J.** (1998) Protein signaling via type III secretion pathways in phytopathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1, 109-114.
- **Murashige, T., Skoog, F.** (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- **Naton, B., Hahlbrock, K., Schmelzer, E.** (1996) Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. *Plant Physiol.*, 433-434.
- **Nespoulous, C., Huet, J.C., Pernollet, J.C.** (1992) Structure-function relationships of α and β elicitors, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. *Planta*, 186, 551-557.
- **Newman, M.A., Von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M.J., Dow, J.M.** (2002) Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of defenses in responses to bacteria. *Plant J.* 29, 487-495.
- **Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., Mössinger, E.** (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.*, 108, 17-27.
- **Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N., Ohashi, Y.** (1998) Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.*, 39, 500-507.
- **Nimchuk, Z., Rohmer, L., Chang, J.H., Dangl, J.L.** (2001) Knowing the dancer from the dance: R-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. *Curr Opin. Plant Biol.*, 4, 288-294.
- **Nitsch, J.P., Nitsch, C.** (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science*, 169, 85.
- **Nothnagel, E.A., McNeil, M., Albersheim, P., Dell, A.** (1983) Host-pathogen interactions XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. *Plant Physiol.*, 71, 916-926.

- **Nuhse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H., Boller, T.** (2000) Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *J. Biol. Chem.*, 275, 7521-7526.
- **Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell*, 78, 449-460.
- **Nürnberg, T., Scheel, D.** (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.*, 6, 372-379.
- **Ori, N., Eshed, Y., Paran, I., Presting, G., Aviv, D., Tanksley, S., Zamir, D., Fluhr, R.** (1997) The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell*, 9, 521-532.
- **Orlandi, E.W., Hutcheson, S.W., Baker, C.J.** (1992) Early physiological responses associate with race-specific recognition in soybean leaf tissue and cell suspensions treated with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 40, 173-180.
- **Osman, H., Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Marion, D., Prange, T., Maume, B.F., Vauthrin, S., Blein, J.P.** (2001) Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS Lett.*, 489, 55-58.
- **Papadakis, A.K., Roubelakis-Angelakis, K.A.** (1999) The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplasts. *Plant physiol.*, 121, 197-205.
- **Parker, J.E., Coleman, M.J., Szabo, V., Frost, L.N., Schmidt, R., Van der Biezen, E.A., Moores, T., Dean, C., Daniels, M.J., Jones, J.D.G.** (1997) The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the Toll and interleukine-1 receptors with *N* and *L6*. *Plant Cell*, 9, 879-894.
- **Parker, J.E., Schulte, W., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1991) An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4, 19-27.
- **Paul, B., Chereyathmanjiyil, A., Masih, I., Chapuis, L., Benoit, A.** (1998) Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.*, 165, 65-70.
- **Peck, S.C., Nühse, T.S., Hess, D., Iglesias, A., Meins, F., Boller, T.** (2001) Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell*, 13, 1467-1475.
- **Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Métraux, J.P., Broekaert, W.F.** (1998) Concomitant activation on jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin. *Plant Cell*, 10, 2103-3113.
- **Perez, V., Huet, J.C., O'Donohue, M., Nespoulous, C., Pernollet, J.C.** (1999) A novel elicitin necrotic site revealed by α -cinnamomin sequence and site-directed mutagenesis. *Phytochem.*, 50, 961-966.

- **Pernollet, J.C., Sallantin, M., Sallé-Tourne, M., Huët, J.C.** (1993) Elicitin isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiol. Mol. Plant Physiol.*, 42, 53-67.
- **Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E.** (2000) *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, 103, 1111-1120.
- **Pezet, R., Pont, V.** (1988) Mise en évidence du ptérostilbène dans les grappes de *Vitis vinifera*. *Plant Physiol. Biochem.*, 26, 603-607.
- **Piedras, P., Rivas, S., Droge, S., Hillmer, S., Jones, J.D.G.** (2000) Functional, c-myc-tagged *Cf-9* resistance gene products are plasma-membrane localized and glycosylated. *Plant J.*, 21, 529-536.
- **Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A., 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, 1225-1237.
- **Pieterse, C.M.J. and Van Loon, L.C.** (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.*, 4, 52-58.
- **Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, N., Weisbeek, P.J., Van Loon, L.C.** (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1571-1580.
- **Pont, V., Pezet, R.** (1990) Relation between the chemical structure and the biological activity of hydroxystilbenes against *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.*, 130, 1-8.
- **Pontier, D., Balague, C., Roby, D.** (1998a) The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 321, 721-734.
- **Pontier, D., Tronchet, M., Rogowsky, P., Lam, E., Roby, D.** (1998b) Activation of *hsr203*, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11, 544-554.
- **Popham, P., Pick, S., Novacky, A.** (1995) The effect of harpin from *Erwinia amylovora* on the plasmalemma of suspension-cultured tobacco cells. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 47, 39-50.
- **Powell, A.L., Van Kan, J., Ten Have, A., Visser, J., Greve, L.C., Bennett, A.B., Labavitch, J.M.** (2000) Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13, 942-950.
- **Pryce, R.J., Langcake, P.** (1977) alpha-viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochem.*, 16, 1452-1454.
- **Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., Guern, J.** (1997) Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and pentose phosphate pathway. *Plant Cell*, 9, 2077-2091.

- **Rancé, I., Fournier, J., Esquerré-Tugaye, M.T.** (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6554-6559.
- **Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S., Greenberg, J.T.** (1999) The gain-of-function *Arabidopsis acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell*, 11, 1695-1708.
- **Reddy, A.S.N.** (2001) Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci.*, 160, 381-404.
- **Reignault, P.H., Kunz, C., Delage, N., Moreau, E., Vedel, R., Hamada, W., Bompeix, G., Boccara, M.** (2000) Host- and symptom-specific pectinase isozymes produced by *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.*, 104, 421-428.
- **Ren, Y.Y., West, C.A.** (1992) Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiol.*, 99, 1169-1178.
- **Renault, A.S., Deloire, A. and Bierne, J.** (1996) Pathogenesis-related proteins in grapevine induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 35, 49-52.
- **Repka, V., Fischerova, I., Silharova, K.** (2000) Immunodetection of PR-1 like proteins in grapevine leaves infected with *Oidium tuckeri* and in elicited suspension cell cultures. *Vitis*, 39, 123-127.
- **Repka, V., Fischerova, I., Silharova, K.** (2001) Methyl jasmonate induces a hypersensitive-like response of grapevine in the absence of avirulent pathogens. *Vitis*, 40, 5-10.
- **Reuveni, M., Zahavi, T., Cohen, Y.** (2001) Controlling downy mildew (*Plasmopara viticola*) in field-grown grapevine with β -aminobutyric acid (BABA). *Phytoparasitica*, 29, 125-133.
- **Ricci, P.** (1997) Induction of the hypersensitive response and systemic acquired resistance by fungal proteins : the case of elicitors. In *Plant-Microbe Interactions*, Eds. Stacey G. K.N. (Chapman and Hall), Vol. 3, pp. 53-75.
- **Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.C., Sallantin, M., Beauvais-Canté, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G., Pernollet, J.C.** (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.*, 183, 555-563.
- **Ricci, P., Panabières, F., Bonnet, P., Maia, N., Ponchet, M., Devergne, J.C., Marais, A., Cardin, L., Milat, M.L., Blein, J.P.** (1993) Proteinaceous elicitors of plant defense responses. In *Mechanisms of Plant Defense Responses*, eds. Fritig B. & Legrand M. (Kluwer, Boston), Vol. 2 : 121-135.
- **Rivas, S., Romeis, T., Jones, J.D.G.** (2002) The Cf-9 disease resistance protein is present in an 420 kilodalton heteromultimeric membrane-associated complex at one molecule per complex. *Plant Cell*, 14, 689-702.
- **Robert, N., Ferran, J., Breda, C., Coutos-Thévenot, P., Boulay, M., Buffard, D., Esnault, R.** (2001) Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv *pisi* : expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107, 249-261.
- **Robert, N., Roche, K., Lebeau, Y., Breda, C., Boulay, M., Esnault, R., Buffard, D.** (2002) Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Sci.*, 162, 389-400.

- **Robinson, S.P., Jacobs, A.K., Dry, I.B.** (1997) A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiol.*, 114, 771-778.
- **Roetschi, A., Si-Ammour, A., Belbarhi, L., Mauch, F., Mauch-Mani, B.** (2001) Characterization of an Arabidopsis-Phytophthora pathosystem: resistance requires a functional PAD2 gene and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid. *Plant J.* 28, 293-305.
- **Romeis, T.** (2001) Protein kinases in the plant defence response. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 407-414.
- **Romeis, T., Piedras, P., Jones, J.D.G.** (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell*, 12, 803-815.
- **Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., Jones, J.D.G.** (1999) Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell*, 11, 273-287.
- **Ross, A.F.** (1966) Systemic effects of local lesion formation. In *Viruses of plants*, Eds Beemster A.B. (North Holland Publishing Co., Amsterdam), pp. 127-150.
- **Rouet-Mayer, M.A., Mathieu, Y., Cazalé, A.C., Guern, J., Laurière, C.** (1997) Extracellular alkalinization and oxidative burst induced by fungal pectin lyase in tobacco cells are not due to the perception of oligogalacturonide fragments. *Plant Physiol. Biochem.*, 35, 321-330.
- **Rustérucci, C., Montillet, J.L., Agnel, J.P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J.J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J.P., 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, 36446-36455.
- **Rustérucci, C., Stallaert, V., Milat, M.L., Pugin, A., Ricci, P., Blein, J.-P.** (1996) Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.*, 111, 885-891.
- **Sacks, W., Nürnberger, T., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1995) Molecular characterization of nucleotide sequences encoding the extracellular glycoprotein elicitor from *Phytophthora megasperma*. *Mol. Gen. Genet.*, 246, 45-55.
- **Salmeron, J.M., Oldroyd, G.E.D., Rommens, C.M.T., Scofield, S.R., Kim, H.S., Lavelle, D.T., Dahlbeck, D., Staskawicz, B.J.** (1996) Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell*, 86, 123-133.
- **Salzman, R.A., Paino d'Urzo, M., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Bordelon, B.P.** (1994) Characterization of an antifungal osmotin-like glycoprotein from grape *Vitis* (L.) spp. *Plant Physiol.*, 105, S-161.
- **Salzman, R.A., Tikhonova, I., Bordelon, B.P., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A.** (1998) Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.*, 117, 465-472.

- **Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Second edition. (Cold Spring Harbor, New York).
- **Sandermann, H.** (2000) Active oxygen species as mediators of plant immunity: three case studies. *Biol. Chem.*, 381, 649-653.
- **Scheel, D.** (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Cur. Opin. Plant Biol.*, 1, 305-310.
- **Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., Manners, J.M.** (2000) Coordinated plant defence responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 11655-11660.
- **Schwacke, R., Hager, A.** (1992) Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca^{2+} and protein-kinase activity. *Planta*, 187, 136-141.
- **Sharp, J.K., Valent, B., Albersheim, P.** (1984) Purification and partial characterisation of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.*, 259, 11312-11320.
- **Simon-Plas, F., Elmayan, T., Blein, J.P.** (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.*, 31, 137-47.
- **Simon-Plas, F., Rustérucci, C., Milat, M.-L., Humbert, C., Montillet, J.L., Blein, J.P.** (1997) Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Environ.*, 20, 1573-1579.
- **Somssich, I.E., Hahlbrock, K.** (1998) Pathogen defence in plants -- a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.*, 3, 86-90.
- **Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C., Ronald, P.** (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. *Science*, 270, 1804-1806.
- **Stahmann, K.P., Monschau, N., Sahm, H., Koschel, A., Gawronski, M., Conrad, H., Springer, T., Kopp, F.** (1995) Structural properties of native and sonicated cinerean, a β -(1-3) (1-6)-D-glucan produced by *Botrytis cinerea*. *Carbohydr. Res.*, 115-128.
- **Staples, R.C., Mayer, A.M.** (1995) Putative virulence factor of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiol. lett.*, 134, 1-7.
- **Stark-Lorenzen, P., Nelke, B., Hänssler, G., Mühlbach, H.P., Thomzik, J.E.** (1997) Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oriza sativa* L). *Plant Cell Rep.*, 16, 668-673.
- **Staskawicz, B.J., Mudgett, M.B., Dangl, J.L., Galan, J.E.** (2001) Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science*, 292, 2285-2289.
- **Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J.P.** (1997) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 35, 235-270.

- **Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B.** (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75, 687-706.
- **Strobel, N., Ji, C., Gopalan, S., Kuc, J., He, S.** (1996) Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv *syringae* 61 HrpZ_{pss} protein. *Plant J.*, 9, 431-439.
- **Suzuki, K., Shinshi, H.** (1995) Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell*, 7, 639-647.
- **Swiderski, M.R., Innes, R.W.** (2001) The Arabidopsis *PBS1* resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *Plant J.*, 26, 101-112.
- **Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y., Martin, G.B.** (1996a) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science*, 274, 2060-2063.
- **Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y. and Martin, G.B.** (1996b) Physical interaction of AvrPto and the Pto kinase defines a recognition event involved in plant disease resistance. *Science*, 274, 2060-2063.
- **Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M., Nishida, E.** (2001) Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J.*, 20, 466-479.
- **Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J.P., Pugin, A.** (1995) Involvement of free calcium in action of cryptogin, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol.*, 109, 1025-1031.
- **Ten Have, A., Breuil, W.O., Wubben, J.P., Visser, J., Van Kan, J.A.** (2001) *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet. Biol.*, 33, 97-105.
- **Ten Have, A., Mulder, W., Visser, J., Van Kan, J.A.** (1998) The endopolygalacturonase gene *Bcpgl* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11, 1009-1016.
- **Thomas, C.M., Dixon, M.S., Parniske, M., Golstein, C., Jones, J.D.G.** (1998) Genetic and molecular analysis of tomato Cf genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Philos. Trans. Roy. Soc. London*, 353, 1413-1424.
- **Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F.** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 15107-15111.
- **Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Tierens, K., Broekaert, W.F.** (1999) Requirement of functional *ethylene-insensitive 2* gene efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.*, 121, 1093-1101.
- **Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A.M.A., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F.** (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.*, 13, 63-68.

- **Thomzik, J.E., Stenzel, K., Stocker, R., Schreier, P.H., Hain, R., Stahl, D.J.** (1997) Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 51, 265-278.
- **Thorpe, G., Kricka, L.** (1986) Enhanced chemiluminescent reactions catalysed by horseradish peroxidase. *Method Enzymol.*, 133, 331-353.
- **Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G.** (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase *gp91phox*. *Plant J.*, 14, 365-370.
- **Traut, T.W.** (1994) The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. *Eur. J. Biochem.*, 229, 9-19.
- **Trewavas, A.J., Malho, R.** (1998) Ca^{2+} signalling in plant cells: the big network! *Curr.Opin. Plant. Biol.*, 1, 428-433.
- **Tronchet, M., Ranty, B., Marco, Y., Roby, D.** (2001) *HSR203* antisense suppression in tobacco accelerates development of hypersensitive cell death. *Plant J.*, 27, 115-127.
- **Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Hockenhull, R., Jackson, R.W., Sesma, A., Athanassopoulos, E., Bennett, M.A., Stevens, C., Vivian, A., Taylor, J.D., Murillo, J.** (2000) Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J.*, 19, 3204-3214.
- **Uknes, S., Dincher, S., Friedrich, L., Negretto, D., Williams, S., Thompson-Taylor, H., Potter, S., Ward, E., Ryals, J.** (1993) Regulation of Pathogenesis-Related protein 1a gene expression in tobacco. *Plant Cell*, 5, 159-169.
- **Van den Hooven, H.W., Van den Burg, H.A., Vossen, P., Boeren, S., De Wit, P.J.G.M., Vervoort, J.** (2001) Disulfide bond structure of the AVR9 elicitor of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: Evidence for a cystine knot. *Biochemistry*, 40, 3458-3466.
- **Van der Biezen, E.A., Jones, J.D.G.** (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.*, 23, 454-456.
- **Van der Hoorn, R.A.L., De Wit, P.J.G.M. and Joosten, M.H.A.J.** (2002) Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci.*, 7, 67-71.
- **Van Etten, H., Matthews, P., Tegtmeier, K., Deitert, M.F. and Stein, J.I.** (1989) Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 27, 143-164.
- **Van Loon, L.C. and Van Kammen, A.** (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* cv Samsun and Samsun NN. Changes in protein constitution after infection with VMT. *Virology*, 40, 199-201.
- **Van Loon, L.C. and Van Strien, E.A.** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55, 85-97.

- **Van Santen, Y., Benen, J.A.E., Schröter, K.H., Kalk, K.H., Armand, S., Visser, J., Dijkstra, W.** (1999) 1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 274, 30474-30480.
- **Vander, P., Varum, K.M., Domard, A., El Gueddari, N.E., Moerschbacher, B.M.** (1998) Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.*, 118, 1353-1359.
- **Van Wees, S.C.M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., Van Loon, L.C., 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, 537-549.
- **Veit, S., Wörle, M., Nürnberger, T., Koch, W., Seitz, H.U.** (2001) A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco. *Plant Physiol.*, 127, 832-841.
- **Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Higgins, V.J., Blumwald, E.** (1994) Plant defense response to fungal pathogens. I. Activation of host plasma membrane H⁺-ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol.*, 10, 209-215.
- **Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J.** (1994) Salicylic acid is not translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell*, 6, 959-965.
- **Viard, M.P., Martin, F., Pugin, A., Ricci, P., Blein, J.P.** (1994) Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.*, 104, 1245-1249.
- **Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J., Browse, J.** (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7209-7214.
- **Wang, Z.X., Yano, M., Yamanouchi, U., Iwamoto, M., Monna, L., Hayasaka, H., Katayose, Y., Sasaki, T.** (1999) The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J.*, 19, 55-64.
- **Ward, E., Ukness, S., William, S., Wiederhold, D., Alexander, D., Ahl-Goy, P., Métraux, J.P., Ryals, J.** (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 3, 1085-1094.
- **Ward, M.J., Pei, Z.M., Schroeder, J.I.** (1995) Roles of ions channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell*, 7, 833-844.
- **Waterhouse, L., Lamuela-Raventos, R.M.** (1994) The occurrence of piceid, a stilbene glucoside in grape berries. *Phytochem.*, 37, 571-573.
- **Weber, H.** (2002) Fatty-acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.*, 7, 217-224.

- **Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., Beer, S.V.** (1992) Harpin, an elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257, 85-88.
- **Wendehenne, D., Binet, M.N., Blein, J.P., Ricci, P., Pugin, A.** (1995) Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett.*, 374, 203-207.
- **Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.M., Barbier-Brygoo, H., Pugin, A.** (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell*, 14, 1937-1951.
- **Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F., Durner, J.** (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.*, 6, 177-183.
- **Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., Baker, B.** (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78, 1101-1115.
- **Wrzaczek, M., Hirt, H.** (2001) Plant MAP kinase pathways: How many and what for ? *Biol. Cell.*, 93, 1-7.
- **Wubben, J.P., Mulder, W., Ten Have, A., Van Kan, J.A., Visser, J.** (1999) Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1596-1602.
- **Wubben, J.P., Ten Have, A., Van Kan, J.A., Visser, J.** (2000) Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Curr. Genet.*, 37, 152-157.
- **Xiao, S., Ellwood, S., Calis, O., Patrick, E., Li, T., Coleman, M., Turner, J.G.** (2001) Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 291, 118-120.
- **Xie, Z.X., Fan, B.F., Chen, Z.X.** (1998) Induction of PR-1 proteins and potentiation of pathogen signals by salicylic acid exhibit the same dose response and structural specificity in plant cell cultures. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11, 568-571.
- **Xing, T., Higgins, V.J., Blumwald, E.** (1996) Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Cell*, 8, 555-564.
- **Yamamoto, T., Iketani, H., Ieki, H., Nishizawa, Y., Notsuka, K., Hibi, T., Hayashi, T., Matsuta, N.** (2000) Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep.*, 19, 639-646.
- **Yang, K.Y., Liu, Y., Zhang, S.** (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 741-746.
- **Yang, K.Y., Shah, J., Klessig, D.F.** (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.*, 11, 1621-1639.
- **Yano, A., Suzuki, K., Uchimiya, H., Shinshi, H.** (1998) Induction of hypersensitive cell death by a fungal protein in cultures of tobacco cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11, 115-123.

- **Yoshioka, K., Sugie, K., Park, H.J., Maeda, H., Tsuda, N., Kawakita, K., Doke, N.** (2001) Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 14, 725-736.
- **Yu, L.M.** (1995) Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4088-4094.
- **Zhang, S., Klessig, D.F.** (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.*, 6, 520-527.
- **Zhang, S., Du, H., Klessig, D.F.** (1998) Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell*, 10, 435-449.
- **Zhao, Y., DelGrosso, L., Yigit, E., Dempsey, D.A., Klessig, D.F., Wobbe, K.K.** (2000) The amino terminus of the coat protein of Turnip crinckle virus is the AVR factor recognized by resistant *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1015-1018.
- **Zhou, F., Kurth, J., Wei, F., Elliot, C., Vale, G., Yahiaoui, N., Keller, B., Somerville, S., Wise, R., Schulze-Lefert, P.** (2001) Expression of barley *mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a *rar1*-independent signaling pathway. *Plant Cell*, 13, 337-350.
- **Zimmerli, L., Jakab, G., Métraux, J.P., Mauch-Mani, B.** (2000) Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by γ -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 12920-12925.
- **Zimmermann, S., Frachisse, J.M., Thomine, S., Barbier-Brygoo, H., Guern, J.** (1998) Elicitor-induced chloride efflux and anion channels in tobacco cell suspensions. *Plant Physiol. Biochem.*, 36, 665-674.
- **Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. and Scheel, D.** (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca^{2+} -permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2751-2755.

VII. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

- *articles scientifiques :*

- Coutos-Thévenot P., **Poinssot B.**, Bonomelli A., Yean H., Breda C., Buffard D., Esnault R., Hain R., et Boulay M. (2001). "In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR10 promoter." *J. Exp. Bot.*, 358, 901-910.
- Gomès E., Sagot E., Gaillard C., Laquitaine L., **Poinssot B.**, Sannejouan Y.H., Delrot S. et Coutos-Thévenot P. (2002). "Non-specific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp) cells in response to fungal elicitor treatments". Submitted, *Mol. Plant-Microbe Interact.*
- **Poinssot B.**, Vandelle E., Adrian M., Bentéjac M., Levis C., Cardinale F., Garin J., Coutos-Thévenot P., et A. Pugin. (2002). "The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defence reactions unrelated to its enzymatic activity". Submitted, *Mol. Plant-Microbe Interact.*

- *articles de vulgarisation :*

- Daire X., **Poinssot B.**, Bentéjac M., Silué D. et Pugin A (2002). "Stimulation des défenses de la vigne contre les pathogènes". *Phytoma*, 548, 24-26.
- Pugin A. et **Poinssot B.** (2001). "Comment aider la vigne à se protéger (I)". *Bourgogne Vins Actualités*, 82, 13-14.
- **Poinssot B.** et Pugin. A. (2001)." Comment aider la vigne à se protéger (II)". *Bourgogne Vins Actualités*, 83, 10-11.

- *Colloques :*

- **Poinssot B.**, Vandelle E., Bentéjac M. et Pugin A. « Identification et mode d'action d'un éliciteur de réactions de défense de la vigne et protection induite ». 2ème rencontre scientifique du réseau vigne et vins septentrionaux. 25-26 Avril 2002. communication orale.
- **Poinssot B.**, Adrian M., Coutos-Thévenot P. et Pugin A.. "Responses of grapevine cells treated by an elicitor secreted by *Botrytis cinerea*". 4th general meeting of the SFPV. December 5-7, 2001. Poster.
- **Poinssot B.**, Coutos-Thévenot P. et Pugin A. "Responses of grapevine cells treated by an elicitor secreted by *Botrytis cinerea*". XIIth international Botrytis Symposium. July 3-7, 2000. Poster.
- **Poinssot B.**, Coutos-Thévenot P. et Pugin A. "Responses of grapevine cells treated by an elicitor secreted by *Botrytis cinerea*". Forum des Jeunes Chercheurs 1999, Besançon. Poster.

The Endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* Activates Grapevine Defense Reactions Unrelated to Its Enzymatic Activity

Benoît Poinssot,¹ Elodie Vandelle,¹ Marc Bentéjac,¹ Marielle Adrian,² Caroline Levis,³ Yves Brygoo,³ Jérôme Garin,⁴ Francesca Sicilia,⁵ Pierre Coutos-Thévenot,⁶ and Alain Pugin¹

¹Laboratoire de Biochimie, Biologie cellulaire et Ecologie des Interactions Plantes/Micro-Organismes, UMR 1088 INRA/Université de Bourgogne, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France; ²Institut Jules Guyot, Université de Bourgogne, BP 138, 21004 Dijon cedex, France; ³Laboratoire de Phytopathologie, Méthodologie de la Détection, INRA Versailles, Route de Saint Cyr, 78026 Versailles cedex, France; ⁴Laboratoire de Chimie des Protéines, Département de Biologie Moléculaire et Structurale, CEA-Grenoble, 38054 Grenoble cedex, France; ⁵Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Roma La Sapienza, Piazzale Aldo Moro 5, 00185, Roma, Italy; ⁶Laboratoire de Physiologie et Biochimie Végétales, ESA CNRS 6161, Université de Poitiers, 40 Avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France

Submitted 25 October 2002. Accepted 12 February 2003.

A purified glycoprotein from *Botrytis cinerea* (strain T4), identified as endopolygalacturonase 1 (T4BcPG1) by mass spectrometry analysis, has been shown to activate defense reactions in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay). These reactions include calcium influx, production of active oxygen species, activation of two mitogen-activated protein kinases, defense gene transcript accumulation, and phytoalexin production. Most of these defense reactions were also activated in grapevine in response to purified oligogalacturonides (OGA) with a degree of polymerization of 9 to 20. In vivo, these active OGA might be a part of the released products resulting from endopolygalacturonase activity on plant cell walls. Nevertheless, the intensity and kinetics of events triggered by OGA were very different when compared with T4BcPG1 effects. Moreover, chemical treatments of T4BcPG1 and desensitization assays have allowed us to discriminate enzymatic and elicitor activities, indicating that elicitor activity was not due to released oligogalacturonides. Thus, BcPG1 should be considered as both an avirulence and a virulence factor. The role of the secreted BcPG1 in the pathogenicity of *Botrytis cinerea* is discussed.

Disease is an exceptional outcome in plant-pathogen interactions. Most potential pathogens are stopped by preformed physical and chemical barriers or after the induction of a complex array of defense responses. The initiation of these inducible reactions requires specific receptor-mediated recognition of pathogen or plant cell wall-derived molecules, termed exogenous or endogenous elicitors, respectively (Ebel and Cosio, 1994). Following pathogen recognition, the activation of signal transduction pathways involving ion fluxes, protein kinase activation, and active oxygen species (AOS) production (Blumwald et al. 1998; Nürnberger and Scheel 2001) results in the expression of defense-related genes encoding, for example, enzymes responsible for phytoalexin biosynthesis (Somssich and Hahlbrock 1998) and pathogenesis-related (PR) proteins (Fritig et al. 1998). These events are frequently associated with a localized cell death known as the hypersensitive reaction

(HR), often considered as an important event for limiting the spread of pathogens. However, while the oxidative burst and the HR inhibit the virulence of biotrophs, they facilitate the infection by necrotrophs (Govrin and Levine 2000). Plants can also develop systemic acquired resistance (SAR) that reduces subsequent infection of healthy tissues by a broad range of pathogens. HR and SAR are controlled by interconnected signaling pathways, including salicylic acid, jasmonate, and ethylene. Salicylic acid is a signaling molecule often implicated in the resistance to biotrophic pathogens (Dempsey et al. 1999), whereas ethylene and jasmonate pathway activation triggers resistance against necrotrophic fungi (Berrocal-Lobo et al. 2002; Ton et al. 2002). Some pathogenic strains are able to circumvent plant defenses. For example, necrotrophs such as *Botrytis cinerea* are able to degrade host cell walls (Staples and Mayer 1995), detoxify plant products (Gil-ad and Mayer 1999), or block defense responses (Cessna et al. 2000). Some strains of *Botrytis cinerea* are pathogenic on grapevine, whereas others have been reported to be unable to develop on this plant, suggesting defense response activation by elicitor production and an incapacity to counteract these defenses (Derckel et al. 1999).

Grapevine is a perennial crop species that is sensitive to a large spectrum of pathogens (*Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea*); some of them becoming resistant to fungicides under selective pressure (Leroux et al. 1999). Resistance of grapevine to pathogens could be improved by crossing resistant varieties with cultivated sensitive ones or introducing defense genes by genetic modifications (Coutos-Thévenot et al. 2001). Nevertheless, these practices are not allowed for grapevine in French vineyards. Indeed, in the past, crossbreeding has been shown to modify the wine taste of well defined varieties. Activation of defense responses could be an alternative strategy to limit pathogen development on grapevine.

This work describes the purification from culture filtrates of *Botrytis cinerea* of an elicitor of defense responses in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay). These responses include calcium influx, H₂O₂ production, mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, defense gene transcript accumulation, and phytoalexin synthesis. The elicitor is shown to be endopolygalacturonase 1 (BcPG1), known as a virulence factor participating in *Botrytis cinerea* pathogenicity (Ten Have et al. 1998). Although elicitor activity from BcPG1 can originate from

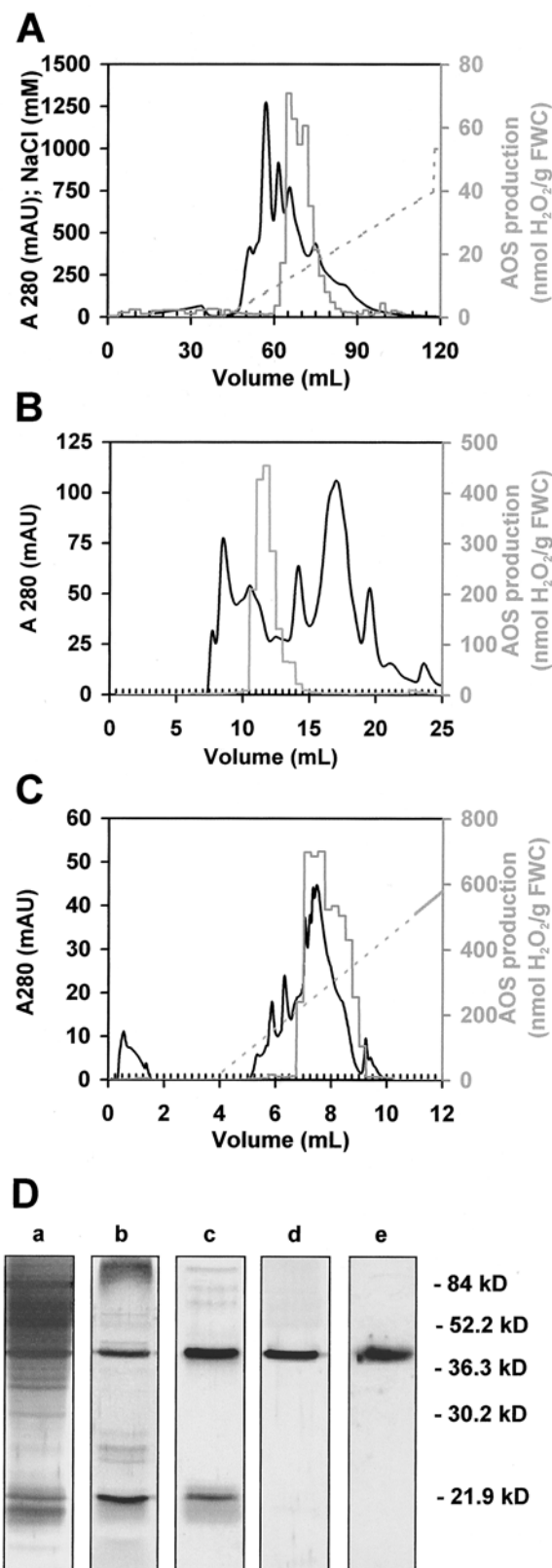


Fig. 1. Elicitor purification. **A**, First anion exchange chromatography at pH 10.8 of the concentrated culture filtrate of *Botrytis cinerea* T4. **B**, Gel filtration chromatography (pH 7.0) of the pooled active fractions from the first purification step. **C**, Fast protein liquid chromatography (FPLC) anion exchange purification at pH 10.8 of the active component separated by gel filtration. A 280 nm (black line; mAU); AOS production (gray line; nmol H₂O₂ per fresh weight of cells [FWC]); NaCl concentration (gray dotted line; mM). H₂O₂ production used to monitor elicitor activity was measured in grapevine cells (1 ml) 20 min after treatment with an aliquot (20 μ l) of each fraction. Results are from one representative experiment out of five. **D**, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis during the different purification steps and detection of a glycoprotein. Lane a, concentrated culture filtrate. Lane b, active fractions pooled after the first anion exchange chromatography. Lane c, active fraction from the gel filtration chromatography. Lane d, purified elicitor after fast protein liquid chromatography anion exchange. In each lane, 1 μ g of protein was separated on a 12% SDS-PAGE before silver staining. Lane e, glycoprotein detection after SDS-PAGE of the purified elicitor (5 μ g) and transfer onto nitrocellulose membrane. Glycoprotein detection was performed following the manufacturer's instructions. Results are from one representative experiment out of three.

oligogalacturonides (OGA) released by the enzyme, we demonstrate that it is the protein itself, rather than its enzyme activity, that is responsible for defense response activation.

RESULTS

Elicitor purification and identification.

Inoculated onto grapevine plants, strain T4 of *Botrytis cinerea* induces defense responses including secondary metabolites and PR protein synthesis (Derckel et al. 1999). We first established that the elicitor activity present in the culture filtrate of this strain was totally abolished by pronase treatment (data not shown). By liquid chromatography, we purified the only elicitor present in a 14-day-old culture filtrate of the T4 strain, monitoring the AOS production induced in grapevine cell suspensions. The culture filtrate was first fractionated by anion exchange chromatography at pH 10.8. The active compound, bound to the gel, was eluted by a salt gradient (Fig. 1A), indicating a basic pI. Active fractions were pooled and subjected to gel filtration. The elicitor activity was attributable to a major peak on the elution profile (Fig. 1B), corresponding to a 40-kDa protein, calibrated using markers of molecular mass (data not shown). Purification was achieved by anion exchange fast protein liquid chromatography (FPLC) at pH 10.8, the AOS-inducing compound being eluted between 200 to 400 mM NaCl (Fig. 1C). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed during the purification process to check the composition of the fractions. The culture filtrate (Fig. 1D, lane a) contained numerous polypeptides, whereas relatively few polypeptides were present in the active fractions eluted by the first anion exchange chromatography (Fig. 1D, lane b). Two major polypeptides with apparent molecular mass of 40 and 21 kDa, respectively, were detected in the active fraction after gel filtration (Fig. 1D, lane c). After the second anion exchange chromatography only one polypeptide of 40 kDa was revealed (Fig. 1D, lane d). Assays for the detection of sugar moieties indicated that this purified proteinaceous elicitor is a glycoprotein (Fig. 1D, lane e).

The 40-kDa polypeptide in the gel was submitted to trypsin digestion, and released peptides were analyzed by Q-TOF tandem mass spectrometry. Sequences were obtained for five peptides (Table 1). Protein databases revealed that all of these peptides belong to the endopolygalacturonase 1 (EC 3.2.1.15) from *Botrytis cinerea*, for which the corresponding gene, termed *Bcpgl*, has been sequenced from strain SAS56 (Ten Have et al. 1998). The full-length cDNA corresponding to the endopolygalacturonase 1 from the T4 strain was cloned and sequenced (Fig. 2A). Comparison of the T4 endopolygalacturonase 1 gene (*T4Bcpgl*) sequence with the published *Bcpgl* sequence (*SAS56Bcpgl*) revealed 43 nucleotide changes among 1,146 nt, which led to 14 amino acid modifications (Fig. 2A). However, no amino acid involved in substrate binding (R²⁷⁹ and K²⁸¹) or in substrate hydrolysis (D²⁰³, D²²⁴, D²²⁵, and H²⁴⁶) (Van Santen et al. 1999) was different. The polymorphisms were confirmed by restriction patterns of the plasmid containing the *T4Bcpgl* cDNA. The lengths of fragments obtained after digestion of the plasmid with different restriction enzymes corresponded exactly to the theoretical map of the plasmid constructed from the nucleotide sequence (data not shown). In particular, the loss of the two *KpnI* sites in the *T4Bcpgl* sequence (positions 132 and 966) was confirmed, and the polymorphism K³²²T was in accordance with the relative molecular mass of the third peptide (1,661.9) liberated by trypsin digestion.

The identity of the endopolygalacturonase 1 purified from the *Botrytis cinerea* T4 was verified by measuring its enzyme

activity. The enzyme hydrolyzed polygalacturonic acid to reducing sugars, exhibiting a sharp optimum at pH 5.0 (Fig. 2B).

Comparison of elicitor activities of T4BcPG1 and active oligogalacturonides.

Calcium influx, AOS production, and MAPK activation were previously shown to be very early events occurring in response to elicitors (Lebrun-Garcia et al. 1998; Pugin et al. 1997; Tavernier et al. 1995), defense gene transcript accumulation, and phytoalexin synthesis occurring later (Hahlbrock et al. 1995; Jabs et al. 1997). We investigated these effects in grapevine cell suspensions in response to treatments with purified T4BcPG1 or active OGA with a 9 to 20 degree of polymerization. Indeed, endopolygalacturonases can release oligogalacturonides from nonmethylated homogalacturonan, a major component of pectins (De Lorenzo and Ferrari 2002). OGA have been reported to be efficient elicitors of defense responses, including calcium influx, AOS production, and MAPK activation (Binet et al. 1998; Lebrun-Garcia et al. 1998; Mathieu et al. 1991, 1996; Reymond et al. 1995). Thus, we might assume that elicitor activity of endopolygalacturonase resulted from OGA released, but elicitor activity of other cell wall degrading enzymes, such as xylanase or pectin lyase, did not depend on the enzyme activity but on the protein itself (Rouet-Mayer et al. 1997; Enkerli et al. 1999). The comparison of T4BcPG1 and OGA effects should determine whether the elicitor activity of T4BcPG1 was due to the release of OGA or to the recognition of distinctive motifs of the protein. At first, both elicitors were tested at different concentrations (T4BcPG1 at 0.75 to 10 µg per g of fresh weight of cells (FWC) and OGA at 500 µg to 5 mg per g of FWC) for each response to determine their saturating concentration. These values are 5 µg per g of FWC for T4BcPG1 and 2 mg per g of FWC for OGA (data not shown).

Calcium influx was measured using ⁴⁵Ca²⁺ as a tracer in the external medium (Tavernier et al. 1995). In control cells, no significant calcium influx was measured during the experiment (data not shown). T4BcPG1 triggered a fast and sustained calcium influx in grapevine cells that reached 0.12 ± 0.02 µmol per g of FWC after treatment for 40 min (Fig. 3A). In OGA-treated cells, calcium influx reached 0.03 ± 0.01 µmol per g of FWC after 20 min and then stabilized (Fig. 3A).

T4BcPG1 triggered a rapid and transient H₂O₂ production (Fig. 3B). This H₂O₂ production peaked at 20 min (751 ± 50 nmol per g of FWC) then decreased to a minimum level after 90 min. In OGA-treated cells, H₂O₂ production peaked at 10 min (91 ± 6 nmol per g of FWC).

In-gel kinase assays using myelin basic protein as a substrate revealed that in grapevine cells, T4BcPG1 or OGA activated two protein kinases with apparent molecular masses of 45 and 49 kDa, respectively (Fig. 3C, lane 1). The activation of both protein kinases was maximal after treatment for 5 min. Western blot analysis using an antibody raised against the human inactive MAPKs ERK1 and ERK2 revealed that both grapevine protein kinases are MAPKs and that the amount of each MAPK did not change during the first hour of treatment with T4BcPG1 or OGA (Fig. 3C, lane 2). Western blot performed

Table 1. Sequences and masses of peptides^a

Peptide mass	Sequence
902.5	C*AGLPSTGVK
1,413.4	TVSGATGSVSGVTYK
1,661.9	PTSGVPITDVRFNSVK
1,707.9	SDNTVSDIHESSTVK
2,085.9	DITLSGITSYGVVVQQDYK

^a Obtained after trypsin digestion of the glycoproteinaceous elicitor analyzed by Q-TOF mass spectrometry. * = cysteine with acrylamide

with an antibody raised against a synthetic peptide containing phospho-Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, corresponding to the human active MAPKs ERK1 and ERK2, confirmed the fast and transient activation of both MAPKs in T4BcPG1- or OGA-treated cells

(Fig. 3C, lane 3). However, MAPK activation triggered by T4BcPG1 is sustained at a higher level and for a longer period when compared with OGA-treated cells (Fig. 3C, lanes 1 and 3). Taken together, these data indicate that OGA effects are

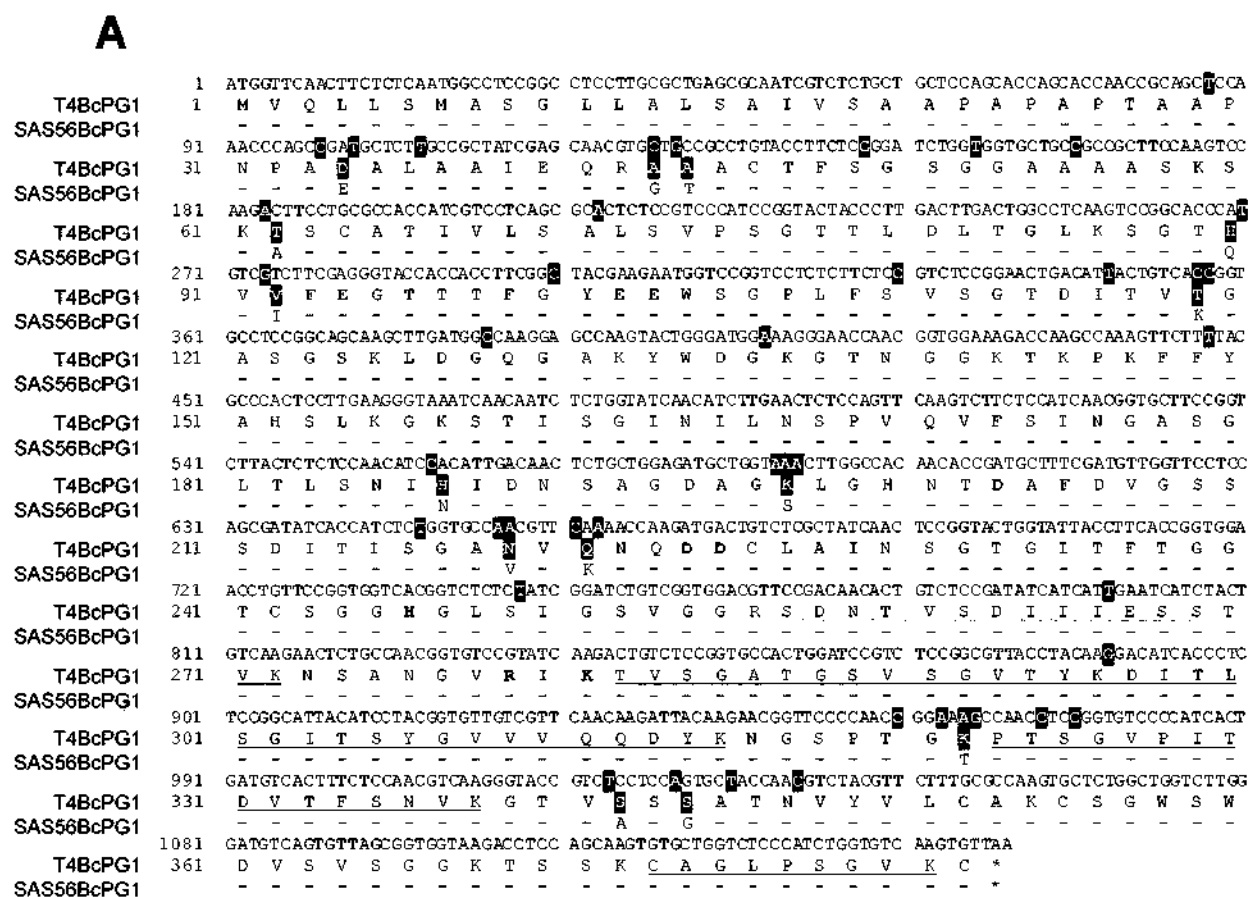


Fig. 2. Elicitor nucleotide sequence and enzyme activity. **A**, Nucleotide sequence of the *Bcpg1* cDNA from *Botrytis cinerea* T4 (*T4Bcpg1*). Deduced amino acid sequence (T4BcPG1) in the one-letter code is indicated underneath. Underlined, microsequenced peptides obtained from mass spectrometry Q-TOF analysis. Shadowed boxes, polymorphisms to the product (SAS56BcPG1) of the previously sequenced *Bcpg1* gene (gb AAC 64374) from *B. cinerea* SAS56. **B**, pH-dependant polygalacturonase activity of T4BcPG1. Enzyme activity was determined with the 2-cyanoacetamide spectrophotometric method using polygalacturonic acid as substrate. One reducing group unit (RGU) corresponded to 1 μ mol of reducing sugar liberated from polygalacturonic acid in 1 min at 30°C with a standard calibration curve obtained with galacturonic acid as reducing sugar. Values shown are mean $\pm$ standard error of duplicate assays. Results are from one representative experiment out of three.

very small compared with T4BcPG1, even if a saturating concentration of OGA was used.

Northern hybridization was performed to monitor the accumulation of transcripts corresponding to different defense genes of grapevine in response to T4BcPG1 or OGA (Fig. 4A). T4BcPG1 triggered, with different kinetics, the expression of genes encoding: glutathione-S-transferase (*GST*) with detoxifying properties (Mauch and Dudler 1993); lipoxygenase (*LOX 3*), a 9-*LOX* induced in plant-pathogen interaction (Göbel et al. 2002; Rancé et al. 1998; Rustérucchi et al. 1999); phenylalanine ammonia lyase (*PAL 1*) and stilbene synthase (*VST 1*), involved in grapevine phytoalexin synthesis (Coutos-Thévenot et al. 2001); polygalacturonase inhibiting protein (*PGIP*), which inhibits polygalacturonases produced by some fungi (De Lorenzo and Ferrari 2002); and glucanase (*GLU*), a PR-2 protein that hydrolyzes β -1,3-glucan produced by some pathogens (Derckel et al. 1998). In T4BcPG1-treated cells, *LOX 3* and *PAL 1* transcripts accumulated as early as after two hours of treatment. *LOX 3* transcript

accumulation was very transient, between 2 and 4 h, whereas *PAL 1* transcript accumulation lasted 12 h with maximum accumulation at 2 h. *VST 1* and *GST* transcript accumulation increased after 2 and 8 h of treatment, respectively, with maximum accumulation at 12 h. *PGIP* and *GLU* transcript accumulation started after 8 and 12 h of treatment, respectively, with maximum accumulation between 36 and 48 h. The defense gene transcript accumulation in response to OGA, used at saturating concentration, is different from that in response to T4BcPG1 (Fig. 4A). OGA did not activate *LOX 3* gene expression. *PAL 1*, *GST*, *GLU*, *PGIP*, and *VST 1* transcripts accumulated to lesser amounts and more transiently in response to OGA, with a sharp maximum at 4 h, whereas in the presence of T4BcPG1, transcripts accumulated early and lasted for 24 to 48 h, depending on the gene studied.

The main phytoalexins synthesized by grapevine are trans-resveratrol and its dimer, ϵ -viniferin, whose respective accumulation is essentially extracellular and cellular (data not shown). T4BcPG1 triggered two peaks of extracellular resvera-

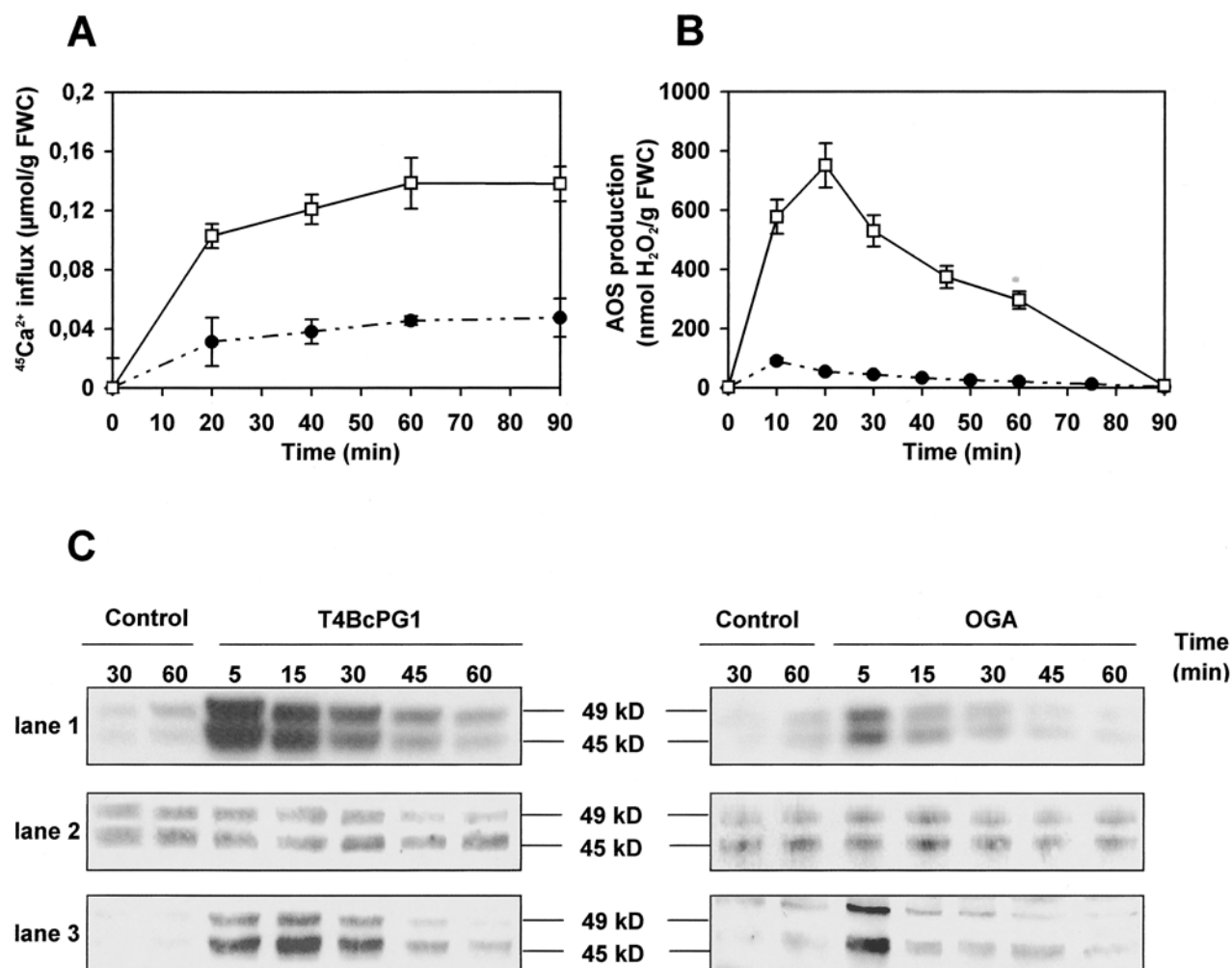


Fig. 3. Early events induced by T4BcPG1 and oligogalacturonides (OGA) in grapevine cell suspensions. **A**, Time course of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by grapevine cells treated with T4BcPG1 (5 μg per g of fresh weight of cells (FWC); open square) or OGA (2 mg per g of FWC; black dot). Before treatments (5 min), cell suspensions were incubated with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0.033 MBq per g of FWC). After different periods of treatment, triplicate 1.5-ml aliquots were filtered under vacuum on GF/A filters, and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ incorporation was determined. For each value, data obtained in means $\pm$ SE of triplicate assays from one representative experiment out of three. **B**, Timecourse production of active oxygen species by grapevine cells treated with T4BcPG1 (5 μg per g of FWC; open square) or OGA (2 mg per g of FWC; black dot). H_2O_2 production was determined using chemiluminescence of luminol. Chemiluminescence, measured within a 10-s period with a luminometer, was integrated and expressed in nmol of H_2O_2 per g of FWC. For each value, values obtained in control cells were subtracted. Values shown are means $\pm$ SE of triplicate assays from one representative experiment out of three. **C**, Activation of two mitogen-activated protein kinases (MAPK) in untreated (control) grapevine cells or treated with T4BcPG1 or OGA. Lanes 1, 2, and 3, timecourse activation of MAPK in grapevine cells treated with T4BcPG1 (5 μg per g of FWC) or OGA (2 mg per g of FWC). Lane 1, In-gel kinase assay with myelin basic protein as substrate. Lane 2, Western blot analysis of total MAPK with an antibody raised against human inactive ERK1/2. Lane 3, Western blot analysis of phosphorylated MAPK with an antibody raised against a synthetic phospho-Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ peptide corresponding to residues around Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ of human phosphorylated ERK1/2. Results are from one representative experiment out of three.

trol at 12 and 36 h (Fig. 4B). In T4BcPG1-treated cells, ϵ -viniferin appeared after 12 h treatment and reached its highest levels between 24 and 60 h (Fig. 4C). In comparison, OGA induced principally the first peak of extracellular resveratrol at 12 h (Fig. 4B), whereas low levels of ϵ -viniferin were detected in the cells (Fig. 4C).

Elicitor activity of T4BcPG1 is not due to enzyme activity.

Further experiments were performed to determine whether the elicitor activity of T4BcPG1 was due to the release of OGA (enzyme activity) or to the recognition of distinctive motifs of the protein.

T4BcPG1 was submitted to different treatments before measuring enzyme activity on the one hand and elicitor activity

on the other hand (Fig. 5A). Heat treatment (100°C) or incubation of the enzyme with the powerful specific inhibitor PGIP2 from *Phaseolus vulgaris* inhibited both enzyme and elicitor activities. Disulfide bridge reduction suppressed elicitor activity (98% of inhibition) and reduced enzyme activity by only 40%. In contrast, incubation for 1 h at 45°C reduced the enzyme activity by 91% without strongly inhibiting elicitor activity (22%). Additionally, the establishment of a refractory state, i.e., the inability of the cells to react to a second application of the same elicitor (Binet et al. 1998; Felix et al. 1993) was used to further discriminate between enzyme activity (OGA effect) and elicitor activity (protein recognition). After a first treatment with OGA, our data indicated that grapevine cells were effectively refractory to a second application of OGA, as deter-

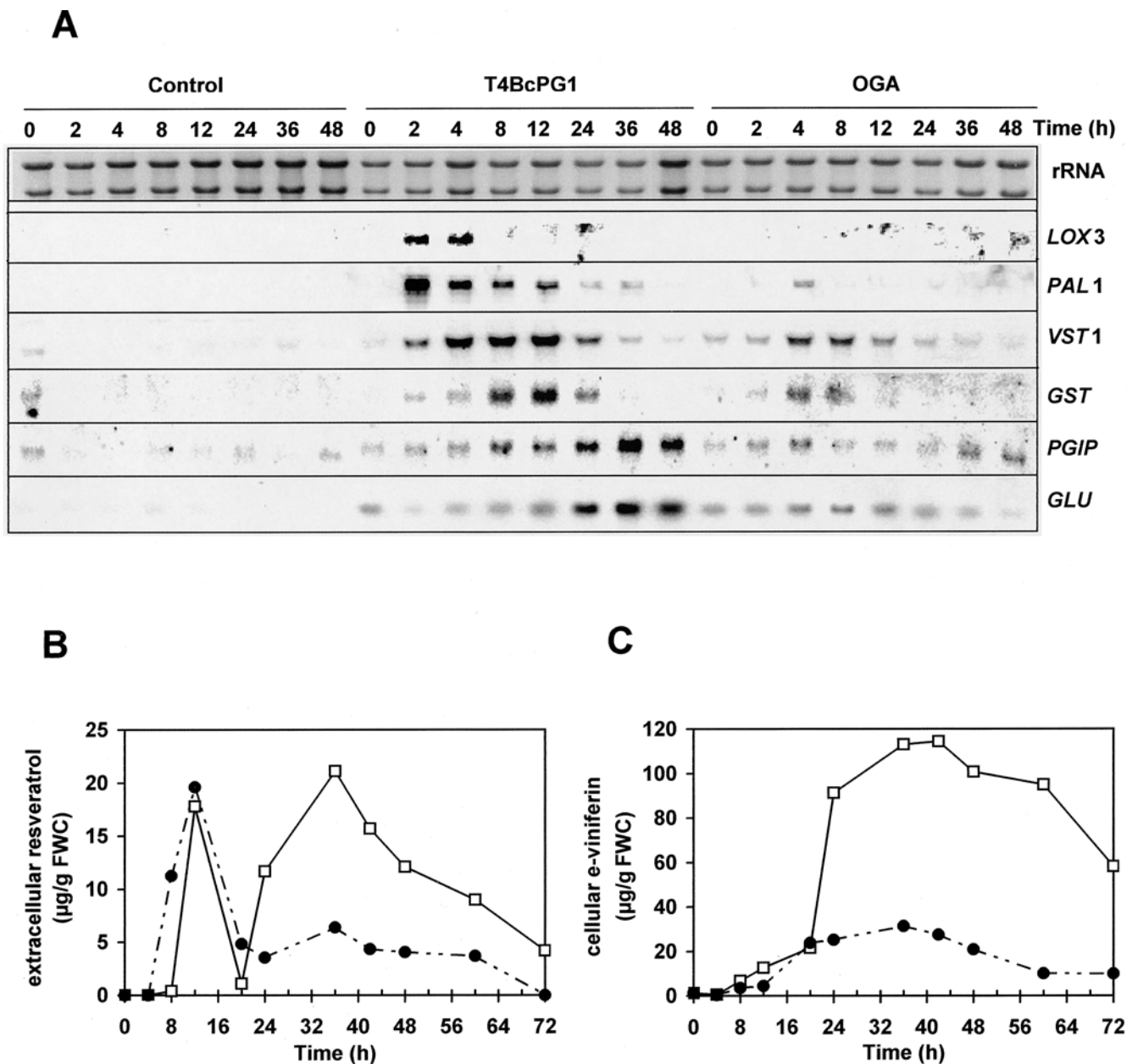


Fig. 4. Accumulation of transcripts of defense-related genes and phytoalexin synthesis in T4BcPG1 or oligogalacturonide (OGA)-treated grapevine cells. **A**, Kinetics of accumulation of defense gene transcripts in grapevine cells treated with T4BcPG1 (5 µg per g of fresh weight of cells [FWC]), OGA (2 mg per g of FWC), or water (control). Total RNA was extracted from cells and was subjected to Northern blot analysis using *LOX 3*, *PAL 1*, *VST 1*, *GST*, *PGIP*, and *GLU* cDNA clones as probes. Ethidium bromide-stained 28S rRNA is shown as a control for gel loading. These results are representative of three independent experiments. **B**, Extracellular trans-resveratrol and **C**, ϵ -viniferin in cells of grapevine treated with 5 µg per g of FWC of T4BcPG1 (open square) or with 2 mg per g of FWC of OGA (black dot). For each value, data from control cells was subtracted. Phytoalexins were quantified using a high-pressure liquid chromatography system. Results are from one representative experiment out of three.

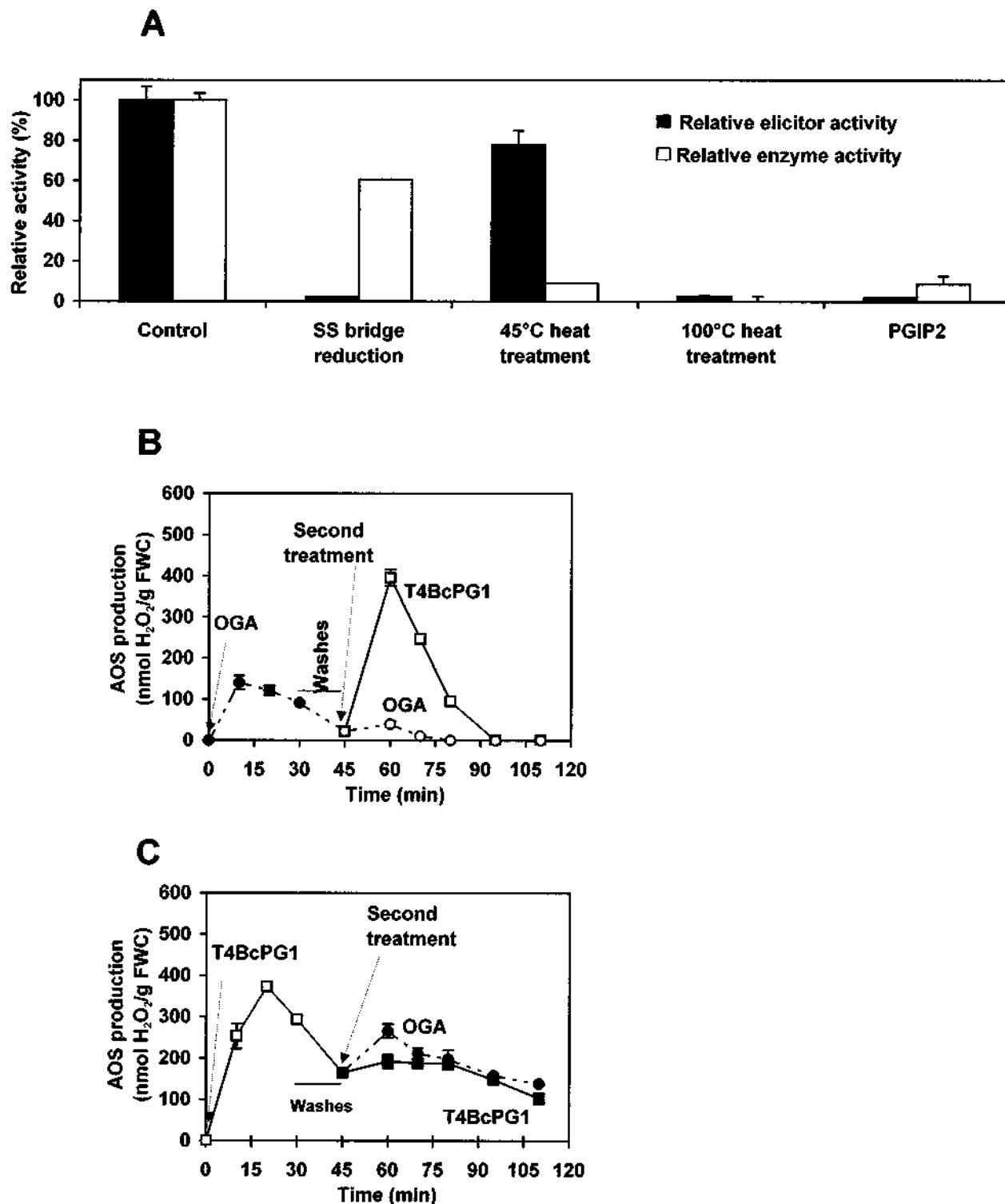


Fig. 5. T4BcPG1 elicitor activity is not due to enzyme activity. **A**, Elicitor and enzyme activity of T4BcPG1 are dissociated after chemical or physical treatments. T4BcPG1 (3 μ g) was submitted to disulfide bridge reduction by 1 mM dithiothreitol, followed by alkylation with 10 mM IAEDENS and was heated 1 h at 45°C or 5 min at 100°C or incubated with PGIP2 (6 μ g). Relative elicitor activity (black column) was determined by measuring the H_2O_2 production in grapevine cell suspensions 20 min after treatment with T4BcPG1 (3 μ g per g of (fresh weight of cells [FWC])). Relative polygalacturonase activity (white column) of T4BcPG1 (300 ng) was measured using the 2-cyanoacetamide method. The activity of T4BcPG1 was 45 mRGU. **B** and **C**, Desensitization experiments on grapevine cell suspensions monitored by H_2O_2 production after successive additions of oligogalacturonides (OGA) and T4BcPG1. **B**, Cells were first treated at time 0 with OGA at 2 mg per g of FWC (black dot), were washed three times between 30 and 45 min with fresh medium, and then were treated with OGA at 2 mg per g of FWC (open circle) or with T4BcPG1 at 1.5 μ g per g of FWC (open square). **C**, Cells were first treated at time 0 with T4BcPG1 at 1.5 μ g per g of FWC (open square), were washed three times between 30 and 45 min with fresh medium, and then were treated with OGA at 2 mg per g of FWC (black dot) or with T4BcPG1 at 1.5 μ g per g of FWC (black square). The data are representative of three experiments.

mined by measuring AOS production (Fig. 5B). Nevertheless, cells fully responded to a subsequent addition of T4BcPG1 (Fig. 5B). In the same way, after a first treatment with T4BcPG1, OGA were always efficient, whereas a second application of T4BcPG1 triggered a low response (Fig 5C). Taken together, these data indicated that the successive oxidative bursts are likely triggered by distinct elicitor molecules.

Purified OGA, prepared from polygalacturonic acid, probably lack the specific structure of the cell wall oligogalacturonides (Ridley et al. 2001). Thus, they may not be a proper control for testing the responsibility of endopolygalacturonase activity in elicitor activity of T4BcPG1. This observation led us to check the elicitor activity of the purified endopolygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (AjPG), used at the same enzymatic activity or the same protein concentration as T4BcPG1.

Our data indicated that AjPG triggered a calcium influx and AOS production comparable to OGA but delayed by about 10 min. In comparison with T4BcPG1, AjPG effects were very small (Table 2).

DISCUSSION

Here, we report the purification and the identification of a 40-kDa glycoproteinaceous elicitor from *Botrytis cinerea* that triggers a cascade of events leading to defense responses in grapevine cell suspensions. Five peptide microsequences obtained after trypsin digestion led to its identification as endopolygalacturonase 1 (T4BcPG1). In vitro assays confirmed that the *T4Bcpgl* gene product was able to degrade polygalacturonic acid, with an optimum pH at 5.0. The activated signaling pathways in T4BcPG1-treated grapevine cells involve a rapid calcium influx, activation of two MAPKs, AOS production, accumulation of defense gene transcripts, and phytoalexin production. Taken overall, these results indicate that the protein T4BcPG1 activates signal transduction events involved in plant responses to elicitors.

Results presented here indicate that the elicitor activity of T4BcPG1 was not solely due to the release of oligogalacturonides with elicitor activity (enzyme activity) but to the recognition of specific motifs of the protein. First, comparison of defense responses activated by OGA or T4BcPG1 showed that OGA induced calcium influx, AOS production, MAPK activation, defense gene transcript accumulation, and phytoalexin production to a lesser amount, even if a saturating concentration is used. Moreover, the absence of desensitization of subsequent applications of OGA in T4BcPG1-treated cells and vice versa indicated that T4BcPG1-induced AOS production did not result from OGA released by the enzyme. Taking into account that the endogenous oligogalacturonides released by the enzyme might differ from the OGA used (Ridley et al. 2001), data obtained with the endopolygalacturonase from *Aspergillus japonicus* clearly demonstrated that another protein with the same enzyme activity possesses a much weaker elicitor activity than T4BcPG1. Moreover, the discrimination between enzyme and elicitor activities of T4BcPG1 was shown by chemical (disulfide bridge reduction) and physical (1 h at 45°C) treatments of the protein. Indeed, while disulfide bridge reduction suppressed elicitor activity of T4BcPG1 by 98%, it reduced enzyme activity by only 40%. Alternatively, a mild heat treatment of T4BcPG1 greatly reduced enzyme activity without strongly affecting elicitor activity, showing that the heat denaturation characteristics of elicitor and enzyme activities are not correlated. Taken together, these results suggest that T4BcPG1 or AjPG cannot release OGA (or not enough) from grapevine cell walls, probably due to the inefficiency of endopolygalacturonases to hydrolyze highly methylated pectins (Benen et al.

1999) or to the release of short-chain inactive OGA (De Lorenzo et al. 1994). These data indicate that only the T4BcPG1 protein contains motifs specifically recognized by grapevine cells to trigger a very fast and high activation of calcium influx and AOS production. Inhibition of both elicitor and enzyme activities by the specific inhibitor PGIP2 from *Phaseolus vulgaris* (PvPGIP2) could result from the masking of enzyme and elicitor active sites by the large protein PvPGIP2. It is possible that the catalytic domain is also the recognized domain for elicitor function. Indeed, many examples indicate that the same site is required for both virulence and avirulence functions (Kjemtrup et al. 2000). In this assumption, site-directed mutagenesis affecting the catalytic site of T4BcPG1 might not permit the discrimination between enzyme and elicitor activities.

Thus, this protein, which is similar to the one described as a virulence factor for *Botrytis cinerea* on tomato (Ten Have et al. 1998), behaves as an elicitor for grapevine defense responses. Similarly, extracellular proteins from *Cladosporium fulvum* have been identified as virulence or avirulence factors, depending upon genotype of the host tomato (Lauge et al. 1998, 2000). Many bacterial proteins such as “type III effector proteins” are involved in virulence but are also determinants for plant defense response activation (He et al. 1993; Lee et al. 2001). Furthermore, viral proteins required for replication and encapsidation can also have an avirulence function (Erickson et al. 1999; Zhao et al. 2000). The maintenance of *avr* genes in pathogen populations suggests that these genes play a role in virulence of the pathogen on susceptible hosts (Nimchuk et al. 2001). In incompatible interactions, R proteins would intercept the Avr protein (Jia et al. 2000) or recognize an Avr-induced modification of the virulence host target (Mackey et al. 2002). Thus, R proteins would suppress the molecular interaction necessary for virulence, defense response inhibition, or both (Dangl and Jones 2001; Van der Biezen and Jones 1998; Van der Hoorn et al. 2002). In this context, *Vitis vinifera* cv. Gamay should contain a R protein interacting with BcPG1 or its virulence target. Nevertheless, maintenance of the *Bcpgl* gene in *Botrytis cinerea* should be beneficial for the fungus, even though the gene product triggers defense activation in grapevine. Indeed, recent data showed that plant defense reactions and particularly the oxidative burst favored the development of necrotrophs such as *Botrytis cinerea* (Govrin and Levine 2000). In that case, the decrease in pathogenicity of a *Botrytis* mutant deleted in *Bcpgl* gene (Ten Have et al. 1998) is unlikely to be attributable to a decrease in virulence but rather to a decrease in avirulence caused by the lack of the AOS-inducing activity of BcPG1. Thus, in the competition between microorganisms for host plant invasion, plant defense reactions and particularly the oxidative burst triggered by *Botrytis* components should favor the growth of *Botrytis cinerea* while restricting the development of biotrophs.

MATERIALS AND METHODS

Plant material.

Grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell suspensions were cultivated in Nitsch-Nitsch medium (Nitsch and Nitsch 1969) without added hormone on a rotary shaker (150 rpm, 25°C) under continuous light (2000 ergs/cm²). Cells were subcultured every 7 days to be maintained in exponential phase and 1-day prior assays.

Fungus.

Botrytis cinerea (*Botryotinia fuckeliana* p.f.) T4 (gift of Y. Brygoo, INRA, Versailles) was multiplied in 9.5 cm-petri dishes with 15 ml of half-strength V8 medium supplemented with 5 g of

KH₂PO₄ per l and 30 g of bacto agar (pH 6.0) per l, and then subcultured every month. For elicitor production, Roux flasks with 200 ml of the plant Nitsch-Nitsch medium, pH 6.0, were inoculated with 2000 conidia of the T4 strain and then cultured 14 days at 25°C with a 16 and 8 h light and dark photoperiod.

Elicitor purification.

Culture filtrate (4 l) were concentrated by dialysis against polyethylene glycol (15,000 to 20,000). The concentrate was collected and passed through a 0.2 µm filter (Sterivex; Millipore, Molsheim, France). The 15-ml concentrated fraction was diluted to 50 ml with equilibration buffer (20 mM ethanolamine, pH 10.8) and was loaded onto the anion exchange column (Hitrap Q sepharose 5 ml; Pharmacia Biosciences, Orsay, France) through a 50-ml superloop injector using an AKTA purifier system (Pharmacia Biosciences). The column was washed with 10 ml of the equilibration buffer, and adsorbed proteins were eluted with a linear NaCl gradient (0 to 700 mM in equilibration buffer). The flow rate was 5 ml per min with a total volume of 150 ml. Elicitor purification was monitored by its ability to induce H₂O₂ production in grapevine cell suspensions. Aliquots (20 µl) of each 2 ml fraction were injected into 1-ml aliquots of grapevine cell suspension, and H₂O₂ production was determined 20 min after treatment. Active fractions were pooled and concentrated by ultra filtration (Macrosep 10 K; Pall Filtron, Allschwill, Switzerland). The concentrated fraction (0.5 ml) was further purified by size exclusion chromatography on a Superdex 75 HR/10/30 column (Pharmacia Biosciences). The elution buffer (0.5 ml per min) was 50 mM NaH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.0. Active fractions were pooled before a further purification step by FPLC using an anion exchange column (Mini Q; Pharmacia Biosciences) equilibrated at pH 10.8 in the 20 mM ethanolamine buffer. The elicitor was desorbed by NaCl linear gradient (0 to 700 mM). Finally, active fractions were pooled, concentrated (Microsep 10K; Pall Filtron), washed three times with ultrapure water, and stocked at -20°C in aliquots before use.

Protein analysis.

Protein concentration was measured according to Bradford (Bradford 1976) with bovine serum albumin (BSA) as the standard. Aliquots containing 1 µg of protein were made soluble in Laemmli buffer (4 min at 100°C), then submitted to SDS-PAGE and visualized by silver staining (Laemmli 1970). Detection of the glycosidic moieties was performed with the ECL glycoprotein detection kit from Pharmacia Biosciences after transfer onto nitrocellulose membrane.

Elicitor identification and sequencing.

The purified elicitor protein was submitted to 12% SDS-PAGE, was Coomassie blue-stained, and was cut out from gel before trypsin digestion. The in-gel digestion of the 40-kDa protein was performed as previously described (Ferro et al. 2000). The gel band was then extracted with 5% (vol/vol) formic acid solution and acetonitrile. The extracts were combined with the original digest, and the sample was evaporated to dryness. The residues were dissolved in 0.1% (vol/vol) formic acid and desalted, using a Zip Tip (Millipore). Elution of the peptides was performed with 5 µl of a 50:50:0.1 (vol/vol/vol) acetonitrile/H₂O/formic acid solution. The peptide solution was introduced into a glass capillary for nanoelectrospray ionization. Tandem mass spectrometry experiments were carried out on a Q-TOF hybrid mass spectrometer (Micromass, Villeurbanne, France). Collision-induced dissociation of selected precursor ions was performed using argon as the collision gas and

with collision energies of 40 to 60 eV. Interpretations of MS/MS spectra was achieved manually and with the help of the PepSeq program (MassLynx software, Micromass). MS/MS sequence information was used for database searching, using NCBI's Protein BLAST program to identify the elicitor. A full-length *T4Bcpg1* cDNA was found in a sequenced cDNA library constructed by Y. Brygoo and coworkers. Sequencing of the corresponding clone was performed twice in each strand with the Ready reaction dye primer cycle sequencing kit from Abi Prism (PerkinElmer, Courtaboeuf, France).

Endopolygalacturonase activity assay.

Endopolygalacturonase activity was measured by the 2-cyanoacetamide spectrophotometric method (Bach and Schollmeyer 1992). Briefly, polygalacturonic acid 2.5% (wt/vol) was used as substrate, and reducing sugars released by T4BcPG1 (300 ng) were determined after a 15-min incubation at 30°C in a medium buffered with MES or Tris 10 mM at indicated pH (total volume: 350 µl). At the end of the assays, samples were incubated for 10 min at 100°C, after addition of a borate buffer 1M, pH 9.0, (400 µl) and 2-cyanoacetamide 1% (wt/vol; 250 µl). Absorbance at 274 nm was measured with a spectrophotometer (DU 640, Beckman Coulters, Villepinte, France) after a 25-fold dilution of samples in ultrapure water. Released reducing sugars were quantified using a standard calibration curve obtained with galacturonic acid.

Elicitor treatment.

Cells were collected during the exponential growth phase, were washed with the M2 suspension buffer (175 mM mannitol, 0.5 mM K₂SO₄, 0.5 mM CaCl₂, and 2 mM MES, pH 5.4), then were resuspended at 0.1 g of FWC per ml. After 2 h of equilibration (150 rpm, 24°C), grapevine cells were treated with different elicitor concentrations, and measurements of AOS production, calcium influx, and protein kinase activation were performed. Phytoalexin production and defense gene transcript accumulation were determined, using cells maintained under sterile conditions in their culture medium. Control cells were incubated in the same conditions without an elicitor. All chemicals were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France) and were dissolved in water. Purified active oligogalacturonides used were a mixture of oligomers with degree of polymerization from 9 to 20.

H₂O₂ production measurements.

H₂O₂ production was determined using chemiluminescence of luminol. Aliquots (250 µl) of cell suspensions were added to

Table 2. Comparison of the elicitor activity of endopolygalacturonases from *Botrytis cinerea* (T4BcPG1) and *Aspergillus japonicus* (AjPG) and oligogalacturonides (OGA)^a

Product	AOS production (nmol H ₂ O ₂ /g FWC)	⁴⁵ Ca ²⁺ influx (µmol/g FWC)
T4BcPG1	751 ± 50	0.14 ± 0.02
OGA	91 ± 6	0.03 ± 0.01
AjPG	22 ± 1	0.03 ± 0.01

^a *Botrytis cinerea* (T4BcPG1) and *Aspergillus japonicus* (AjPG) are at the same enzymatic activity (45 mRGU), and OGA is at saturating concentration (2 mg per g. of fresh weight of cells [FWC]). Polygalacturonase activity of T4BcPG1 or AjPG was measured using the 2-cyanoacetamide method. Values for active oxygen species production and ⁴⁵Ca²⁺ influx correspond to the maximal response obtained for each treatment after subtraction of control cell values. For H₂O₂ production, measurements were carried out at 10, 20, or 30 min after treatments with OGA, T4BcPG1, or AjPG, respectively. For ⁴⁵Ca²⁺ influx, data correspond to the optimum at 20, 40, or 60 min after treatments with OGA, AjPG, or T4BcPG1, respectively. Values shown are means ± standard error of triplicate assays.

300 µl of a buffer containing 50 mM HEPES, pH 8.5, 175 mM mannitol, 5 mM CaCl₂, 0.5 mM K₂SO₄, and 50 µl of 0.3 mM luminol. Chemiluminescence, measured within a 10-s period with a luminometer, (Lumat LB 9507, EG&G Berthold, Evry, France) was integrated and was expressed in nmol of H₂O₂ per gram of FWC, using a standard calibration curve obtained by addition of H₂O₂ in grapevine cell suspension aliquots.

Ca²⁺ influx measurements.

Before treatment (5 min), cell suspensions were incubated with ⁴⁵Ca²⁺ (0.033 MBq per g of FWC; Pharmacia Biosciences). After different periods of treatment, triplicate 1.5-ml aliquots were filtered under vacuum on GF/A filters and were washed three times with a total volume of 25 ml buffer (175 mM mannitol, 0.5 mM K₂SO₄, 5 mM LaCl₃, and 2 mM MES, pH 5.4) before transferring the cells to scintillation vials. After a 2-h period at 65°C, dry weight was determined, and 10 ml of Ready Safe cocktail (Beckman) were added to the vials before counting in a scintillation counter (TRI-CARB 2100 TR, Packard, Rungis, France).

MAP kinase activation:

Western blot and in-gel kinase assays.

After elicitor treatment, 2-ml aliquots of cells were harvested by filtration on GF/A filters, were frozen in liquid nitrogen, and were ground in a mortar. The powder was thawed in 350 µl of extraction buffer (50 mM HEPES, 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM β-glycerolphosphate, 10 mM NaF, 5 mg of leupeptin per l, 5 mg of antipain l, 5 mM dithiothreitol (DTT), and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.5). After centrifugation (15 min, 10,000 × g), supernatant aliquots were used to determine protein concentration. Proteins (15 µg) were solubilized in Laemmli buffer (4 min at 100°C), then submitted to 12% SDS-PAGE before transfer to nitrocellulose membrane. Detection of total MAPKs by Western blot was performed with an antibody raised against human inactive ERK1/2 as primary antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, U.S.A.). Phosphorylated MAPKs were detected by Western blot, using a primary antibody raised against a synthetic phospho-Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ peptide corresponding to residues around Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ of human phosphorylated ERK1/2 (Cell Signaling Technology). Probing and detection were performed as described in the ECL Western detection kit (Pharmacia Biosciences) with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody.

For in-gel kinase assays, 15 µg of proteins were separated by 12% SDS-PAGE containing myelin basic protein at 0.1 mg per ml as a substrate for kinase reaction. Denaturation, renaturation, and kinase reaction were performed as described by Lebrun-Garcia and associates (1998). Protein kinase activity was visualized by autoradiography.

Phytoalexin quantification.

After different times of treatment, cell suspension aliquots (2 ml) were collected and filtered on GF/A glass fiber filters. Cells were ground with sand in 2-ml methanol and were filtered using a centrex MF disposable microfilter (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). After centrifugation (10 min, 5,000 × g), supernatants were evaporated under gaseous nitrogen, and phytoalexins were solubilized by addition of 1 ml of methanol. Phytoalexins contained in the extracellular medium were extracted by ethyl acetate (1:1, vol/vol), were concentrated by evaporation under vacuum (35°C), and were dissolved in 1 ml of methanol. Phytoalexins were identified and quantified using a high-pressure liquid chromatography system equipped with a W 600 system controller, a W 717 sample injector, and a W 979 photodiode array detector coupled to a W

474 fluorometer detector (Waters, Milford, MA, U.S.A.). Each sample (40 µl) was loaded onto a Lichrocart C-18 inverse phase column (250 mm × 4 mm, 5 µm; Merck, Amsterdam) equilibrated with a 90:10 (vol/vol) H₂O/acetonitrile mobile phase. Phytoalexins were eluted with a linear gradient from 10 to 85% acetonitrile at a flow rate of 1 ml per min. Quantification of trans-resveratrol and ε-viniferin was performed with standard calibration curves, using the peak area of different amounts of pure molecules fluorometrically detected (λ_{ex} = 330 nm, λ_{em} = 374 nm).

Northern blot analysis.

Aliquots (2 ml) of grapevine cell suspensions were filtered and subsequently were frozen in liquid N₂. Total RNA isolation was obtained by adding 1 ml of trizol (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.), following the manufacturer's procedure. Total RNA (10 µg) were separated on a 1.2% agarose gel containing 1.1% formaldehyde, then were transferred to a Hybond N⁺ membrane (Pharmacia Biosciences) and cross-linked by UV. The blot was hybridized at 65°C with cDNA probes labeled with 50 µCi [α-³²P]-dCTP using the Ready-To-Go labeling kit (Pharmacia Biosciences). Blots were exposed for 24 h in a phosphorimager screen (Molecular Dynamics, Bondoufle, France).

Chemical or physical treatments of T4BcPG1.

The T4BcPG1 protein (3 µg) was submitted to different treatments—reduction by 1 mM DTT (1 h at 37°C) and alkylation by 10 mM IAEDENS (1 h at 37°C); heat treatment (1 h at 45°C or 5 min at 100°C); inhibition by PGIP2 (6 µg, purified according to Cervone and associates [1987])—before measuring on one part its elicitor activity. The elicitor activity was determined by the H₂O₂ production of grapevine cell suspensions in M10 buffer (175 mM mannitol, 0.5 mM K₂SO₄, 0.5 mM CaCl₂, and 10 mM MES, pH 5.0) at 20 min after treatment with 3 µg protein per g of FWC. The enzymatic activity of 300 ng protein was determined in the same M10 buffer using polygalacturonic acid as substrate. The unmodified elicitor preparation was referred to as 100% (control).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Bezier and F. Baillieul for providing grapevine defense gene cDNA clones, F. Cervone for the gift of PGIP2 from *Phaseolus vulgaris*, F. Roux for MS/MS analysis, and A. Klinguer and N. Besozzi for excellent technical assistance. We are grateful to D. Wendehenne, K. Gould, and L. C. Van Loon for helpful discussion. B. Poinsot is supported by a grant from the Conseil Régional de Bourgogne and the Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne.

LITERATURE CITED

- Bach, E., and Schollmeyer, E. 1992. An ultraviolet-spectrophotometric method with 2-cyanoacetamide for the determination of the enzymatic degradation of reducing polysaccharides. *Anal. Biochem.* 203:335-339.
- Benen, J. A. E., Kester, H. C. M., and Visser, J. 1999. Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *Eur. J. Biochem.* 259:577-585.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., and Solano, R. 2002. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR 1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.* 29:23-32.
- Binet, M. N., Bourque, S., Lebrun-Garcia, A., Chiltz, A., and Pugin, A. 1998. Comparison of the effects of cryptogin and oligogalacturonides on tobacco cells and evidence of different forms of desensitization induced by these elicitors. *Plant Sci.* 137:33-41.
- Blumwald, E., Aharon, G. S., and Lam, B. C. H. 1998. Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 3:342-346.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye

- binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Cervone, F., De Lorenzo, G., Degra, L., Salvi, G., and Bergami, M. 1987. Purification and characterization of the polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 85:631-637.
- Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B., and Low, P. S. 2000. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell* 12:2191-2199.
- Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R., and Boulay, M. 2001. In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR10 promoter. *J. Exp. Bot.* 358:901-910.
- Dangl, J. L., and Jones, J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.
- De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D., Caprari, C., Clark, A. J., Desiderio, A., Devoto, A., Forrest, R., Leckie, F., Nuss, L., and Salvi, G. 1994. Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication. *Biochem. Soc. Trans.* 22:394-397.
- De Lorenzo, G., and Ferrari, S. 2002. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:295-299.
- Dempsey, D. A., Shah, J., and Klessig, D. F. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:547-575.
- Derckel, J. P., Audran, J. C., Haye, B., Lambert, B., and Legendre, L. 1998. Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and β -1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiol. Plant.* 104:56-64.
- Derckel, J. P., Baillieu, F., Manteau, S., Audran, J. C., Haye, B., Lambert, B., and Legendre, L. 1999. Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathol.* 89:197-203.
- Ebel, J., and Cosio, E. G. 1994. Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148:1-36.
- Enkerli, J., Felix, G., and Boller, T. 1999. The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiol.* 121:391-397.
- Erickson, F. L., Holzberg, S., CalderonUrrea, A., Handley, V., Axtell, M., Corr, C., and Baker, B. 1999. The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant J.* 18:67-75.
- Felix, G., Regenass, M., and Boller, T. 1993. Specific perception of sub-nanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: Induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of refractory state. *Plant J.* 4:307-316.
- Ferro, M., Seigneurin-Berny, D., Rolland, N., Chapel, A., Salvi, D., Garin, J., and Joyard, J. 2000. Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. *Electrophoresis* 21:3517-3526.
- Fritig, B., Heitz, T., and Legrand, M. 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10:16-22.
- Gil-ad, N., and Mayer, M. 1999. Evidence for rapid breakdown of hydrogen peroxide by *Botrytis cinerea*. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Lett.* 176:455-461.
- Göbel, C., Feussner, I., Hamberg, M., and Rosahl, S. 2002. Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 1584:55-64.
- Govrin, E. M., and Levine, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:751-757.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R., and Schmelzer, E. 1995. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:4150-4157.
- He, S. Y., Huang, H. C., and Collmer, A. 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{ps}: A protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73:1255-1266.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D. 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4800-4805.
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., and Valent, B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 19:4004-4014.
- Kjemtrup, S., Nimchuk, Z., and Dangl, J. L. 2000. Effector proteins of phytopathogenic bacteria: Bifunctional signals in virulence and host recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:73-78.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lauge, R., Dmitriev, A. P., Joosten, M. H. A. J., and De Wit, P. J. G. M. 1998. Additional resistance gene(s) against *Cladosporium fulvum* present on the Cf-9 introgression segment are associated with strong PR protein accumulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:301-308.
- Lauge, R., Goodwin, P. H., De Wit, P. J. G. M., and Joosten, M. H. A. J. 2000. Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. *Plant J.* 23:735-745.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., and Pugin, A. 1998. Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J.* 15:773-781.
- Lee, J., Klessig, D. F., and Nürnberger, T. 2001. A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene *HIN1* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell* 13:1079-1093.
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., and Gredt, M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protect.* 18:687-697.
- Mackey, D., Holt, B. F., Wiig, A., and Dangl, J. L. 2002. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108:743-754.
- Mathieu, Y., Kurkdjian, A., Xia, H., Guern, J., Koller, A., Spiro, M. D., O'Neill, M., Albersheim, P., and Darvill, A. 1991. Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant J.* 1:333-343.
- Mathieu, Y., Sanchez, F. J., Droillard, M. J., Lapous, D., Laurière, C., and Guern, J. 1996. Involvement of protein phosphorylation in the early steps of transduction of the oligogalacturonide signal in tobacco cells. *Plant Physiol. Biochem.* 34:399-408.
- Mauch, F., and Dudler, R. 1993. Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 102:1193-1201.
- Nimchuk, Z., Rohmer, L., Chang, J. H., and Dangl, J. L. 2001. Knowing the dancer from the dance: R-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:288-294.
- Nitsch, J. P., and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 169:85.
- Nürnberger, T., and Scheel, D. 2001. Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* 6:372-379.
- Pugin, A., Frachisse, J. M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., and Guern, J. 1997. Early events induced by the elicitor cryptogin in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and pentose phosphate pathway. *Plant Cell* 9:2077-2091.
- Rancé, I., Fournier, J., and Esquerré-Tugayé, M.-T. 1998. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:6554-6559.
- Reymond, P., Grünberger, S., Paul, K., Müller, M., and Farmer, E. E. 1995. Oligogalacturonide defense signals in plants: Large fragments interact with the plasma membrane *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:4145-4149.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., and Mohnen, D. 2001. Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochem.* 57:929-967.
- Rouet-Mayer, M. A., Mathieu, Y., Cazale, A. C., Guern, J., and Laurière, C. 1997. Extracellular alkalization and oxidative burst induced by fungal pectin lyase in tobacco cells are not due to the perception of oligogalacturonide fragments. *Plant Physiol. Biochem.* 35:321-330.
- Rustérucci, C., Montillet, J.-L., Agnel, J.-P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J.-J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J.-P., and Triantaphylides, C. 1999. Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin of tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* 274:36446-36455.
- Somssich, I. E., and Hahlbrock, K. 1998. Pathogen defence in plants—A paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3:86-90.
- Staples, R. C., and Mayer, A. M. 1995. Putative virulence factor of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Lett.* 134:1-7.
- Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J. P., and Pugin, A. 1995. Involvement of free calcium in action of cryptogin, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol.* 109:1025-1031.
- Ten Have, A., Mulder, W., Visser, J., and Van Kan, J. A. 1998. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:1009-1016.

- Ton, J., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C., and Pieterse, C. M. J. 2002. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:27-34.
- Van der Biezen, E. A., and Jones, J. D. G. 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* 23:454-456.
- Van der Hoorn, R. A. L., De Wit, P. J. G. M., and Joosten, M. H. A. J. 2002. Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci.* 7:67-71.
- Van Santen, Y., Benen, J. A. E., Schröter, K. H., Kalk, K. H., Armand, S., Visser, J., and Dijkstra, W. 1999. 1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 274:30474-30480.
- Zhao, Y., Del Grosso, L., Yigit, E., Dempsey, D. A., Klessig, D. F., and Wobbe, K. K. 2000. The amino terminus of the coat protein of Turnip crinkle virus is the AVR factor recognized by resistant *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1015-1018.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCE

Protein BLAST program: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection Against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*

Aziz Aziz,¹ Benoît Poinssot,² Xavier Daire,² Marielle Adrian^{2,3}, Annie Bézier,¹ B. Lambert,¹ Jean-Marie Joubert,⁴ and Alain Pugin²

¹Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne, URVVC - UPRES EA 2069, UFR Sciences, Moulin de la Housse, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2 France; ²Unité Mixte de Recherche, Plante-Microbe-Environnement, INRA 1088/CNRS 2625/ Université de Bourgogne, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France; ³Institut Jules Guyot, UMR 1088 INRA/Université de Bourgogne, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France; ⁴Société Goëmar, Avenue du Général Patton, BP 55, 35413 Saint Malo cedex, France

Submitted 21 April 2003. Accepted 30 June 2003.

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is susceptible to many pathogens, such as *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*, *Uncinula necator*, and *Eutypa lata*. Phytochemicals are used intensively in vineyards to limit pathogen infections, but the appearance of pesticide-resistant pathogen strains and a desire to protect the environment require that alternative strategies be found. In the present study, the β -1,3-glucan laminarin derived from the brown algae *Laminaria digitata* was shown both to be an efficient elicitor of defense responses in grapevine cells and plants and to effectively reduce *B. cinerea* and *P. viticola* development on infected grapevine plants. Defense reactions elicited by laminarin in grapevine cells include calcium influx, alkalinization of the extracellular medium, an oxidative burst, activation of two mitogen-activated protein kinases, expression of 10 defense-related genes with different kinetics and intensities, increases in chitinase and β -1,3-glucanase activities, and the production of two phytoalexins (resveratrol and ϵ -viniferin). Several of these effects were checked and confirmed in whole plants. Laminarin did not induce cell death. When applied to grapevine plants, laminarin reduced infection by *B. cinerea* and *P. viticola* by approximately 55 and 75%, respectively. Our data describing a large set of defense reactions in grapevine indicate that the activation of defense responses using elicitors could be a valuable strategy to protect plants against pathogens.

The spread of a plant disease is governed by the abilities of the plant and its potential pathogen to react quickly to new signals generated during the molecular dialogue between both partners. In plants, a complex array of defense responses is induced after detection of a microorganism via the recognition of elicitor molecules released during the plant–pathogen interaction (Ebel and Cosio 1994). Following elicitor perception, the activation of signal transduction pathways generally leads to the production of active oxygen species (AOS), phytoalexin biosynthesis, reinforcement of plant cell walls, and the accumulation of patho-

genesis-related (PR) proteins, some of which possess antimicrobial properties (Fritig et al. 1998; Hammerschmidt 1999; Somssich and Hahlbrock 1998; Van Loon and Van Strien 1999). All these defense reactions, which sometimes are associated with a localized cell death known as the hypersensitive reaction (HR), are considered to be important responses for delimiting the pathogen's growth. Moreover, plants have the ability to develop systemic acquired resistance (SAR), which reduces subsequent infection of healthy tissues by a broad range of pathogens. However, if these defense reactions occur too late, the infection process will spread successfully.

Various types of elicitors have been characterized, including carbohydrate polymers, lipids, (glyco)peptides, and (glyco)proteins. These products are secreted by microorganisms or derived from the cell walls of fungi, bacteria, or host plants (Côté and Hahn 1994; Ebel and Cosio 1994) or from seaweed (Bouarab et al. 1999; Klarzynski et al. 2000; Potin et al. 1999). Among them, ramified β -(1,3)-(1,6)-glucans, xyloglucans, oligogalacturonides, and chitin or chitosan oligomers exhibit elicitor activity across different plant species and evoke pathogen defense responses (Côté and Hahn 1994; Côté et al. 1998; Darvill et al. 1992; John et al. 1997; Sharp et al. 1984).

The chemically well-characterized heptaglucoide from the pathogenic oomycete *Phytophthora sojae* (Cheong and Hahn 1991; Sharp et al. 1984) has been shown to highly induce phytoalexin biosynthesis even when applied at low nanomolar concentrations (Brady et al. 1993; Côté and Hahn 1994). Similarly, linear β -1,3-glucan oligomers are recognized as elicitors by a variety of plants, such as alfalfa (Cardinale et al. 2000), bean (Mithöfer et al. 1999), and rice (Inui et al. 1997). The linear β -1,3-glucan laminarin derived from the brown algae *Laminaria digitata* elicits a variety of defense reactions in tobacco plants, such as the stimulation of phenylalanine ammonia lyase, caffeic acid O-methyl transferase, and lipoxygenase activities, as well as the accumulation of salicylic acid and PR proteins (Klarzynski et al. 2000). Furthermore, certain glucans have been reported to enhance resistance against viruses (Rouhier et al. 1995) and bacteria (Klarzynski et al. 2000).

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is susceptible to many diseases, such as gray mould (*Botrytis cinerea*), downy mildew (*Plasmopara viticola*), powdery mildew (*Uncinula necator*), and dieback (*Eutypa lata*). Phytochemicals commonly are used in vineyards to prevent and limit pathogen infections. However, because of the development of pesticide-resistant pathogen strains (Leroux

Corresponding author: A. Pugin, E-mail: pugin@dijon.inra.fr; Fax: 33-3-80-69-32-26.

Current address of B. Poinssot: Department of Plant Biology, University of Fribourg, 1700, Switzerland.

A. Aziz and B. Poinssot contributed equally to this article.

et al. 1999), and in an effort to preserve wine quality and yet reduce the impact of pesticides on the environment, considerable interest has been focused on the replacement of chemicals by efficient, alternative strategies. Grapevine resistance could be increased by genetic improvement, but hybrids and transformed grapevine (Coutos-Thévenot et al. 2001) are forbidden in French vineyards. Thus, the alternative strategies most commonly involve biological control of pathogens, or else the activation of plant defense mechanisms using elicitors.

In *V. vinifera*, only a few defense markers have been investigated in leaves and berries. Most of studies have concentrated on gene expression and activities of chitinases and glucanases (Bézier et al. 2002a; Busam et al. 1997; Derckel et al. 1996, 1998; Robert et al. 2002; Robinson et al. 1997; Salzman et al. 1998) and the production of stilbenic phytoalexins (Adrian et al. 1997; Bais et al. 2000; Jeandet et al. 1991; Langcake and Pryce 1977a and b; Pryce and Langcake 1977). Recently, we reported a large set of defense responses triggered by the endopolygalacturonase 1 of *B. cinerea* in grapevine (Poinssot et al. 2003).

In the present study, we report that laminarin is a potent elicitor of defense reactions in grapevine cells. The early responses triggered by laminarin include calcium influx, an oxidative burst, extracellular alkalization of the culture medium, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. Laminarin induces the expression of defense genes associated with the octadecanoid, phenylpropanoid, and stilbenoid pathways, and those corresponding to PR proteins. Moreover, laminarin induces a significant protection of grapevine leaves against two pathogens, *B. cinerea* and *P. viticola*.

RESULTS

Early signaling events induced by laminarin in grapevine cell suspensions.

The production of H_2O_2 increased with increasing concentrations of laminarin and became saturated at between 0.5 and 1 g/liter (Fig. 1A). The oxidative burst was detected approximately 10 min after laminarin application and the H_2O_2 pro-

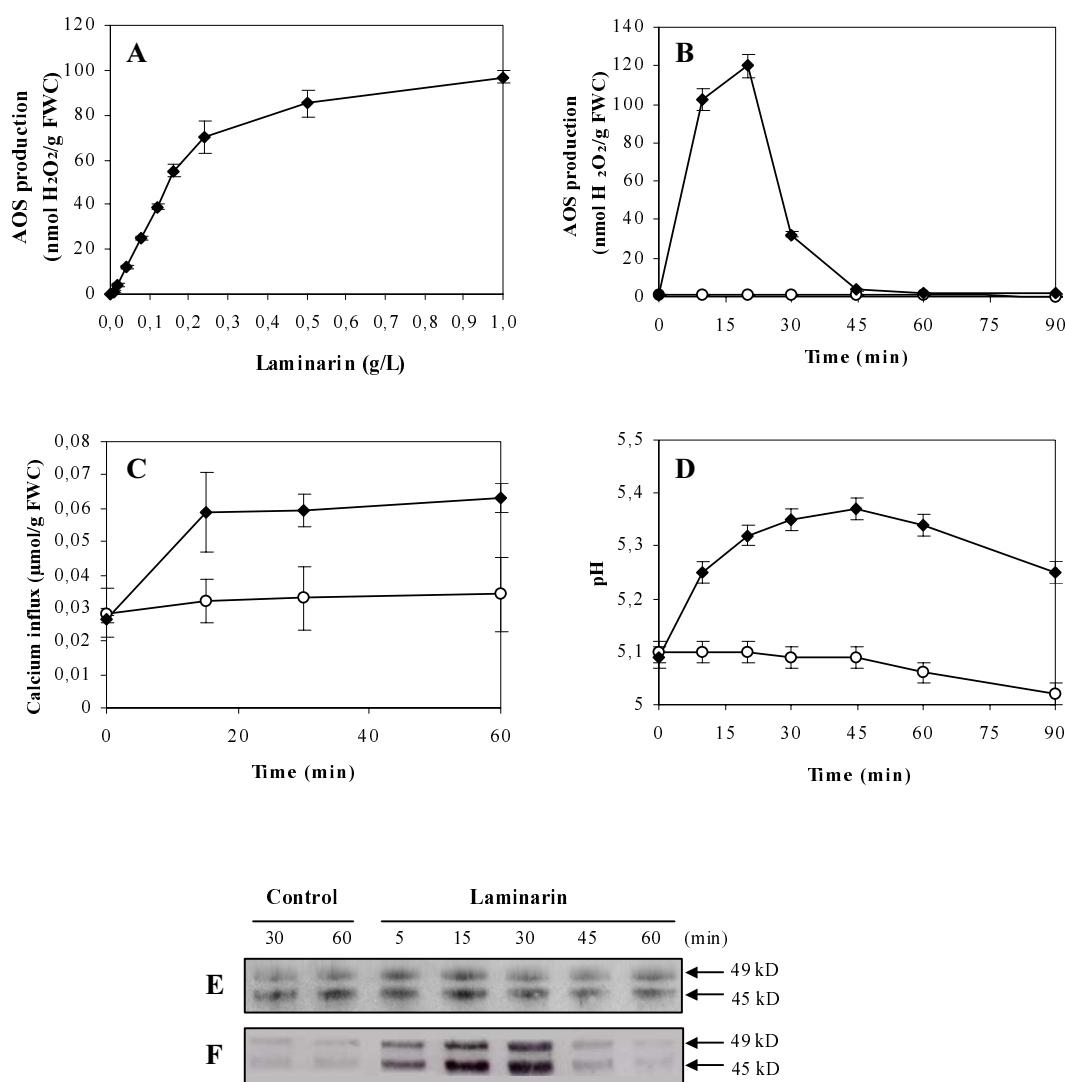


Fig. 1. Early signaling events activated in grapevine cells after elicitation with laminarin. **A**, Dose-response curve of active oxygen species (AOS) production in grapevine cell suspensions, 10 min after treatment with increasing concentrations of laminarin ($\blacklozenge$). H_2O_2 production was measured using chemiluminescence of luminol. **B**, Time-course AOS production in grapevine cell suspensions treated with laminarin at 1 g/liter ($\blacklozenge$) or in untreated cell suspensions ($\circ$). **C**, Kinetic of calcium influx in grapevine cells treated by laminarin at 1 g/liter ($\blacklozenge$) or in control cells ($\circ$). Calcium influx was measured by $^{45}Ca^{2+}$ incorporation, added 5 min before treatment (0.033 MBq/g of fresh weight of cells). **D**, Extracellular pH shift of grapevine cell suspensions treated by laminarin at 1 g/liter ($\blacklozenge$) or untreated ($\circ$). **E** and **F**, Kinetics of activation of two mitogen-activated protein kinases in control grapevine cells or treated by laminarin at 1 g/liter, **E**, analyzed by Western blot using an antibody raised against human nonactivated ERK1/2 or **F**, raised against a phosphorylated peptide contained in the human ERK1/2. Protein extracts (15 μ g) were separated on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis before transfer onto nitrocellulose membrane and Western blot analysis. Results are from one representative experiment out of three. Values represent the average data $\pm$ SD of triplicate assays.

duction was maximal after a further 10 min (Fig. 1B). Thereafter, H₂O₂ concentration in the medium declined, reaching its initial level 45 min after the beginning of the treatment.

Calcium influx has been shown to mediate elicitor-induced defense responses (Blume et al. 2000; Jabs et al. 1997; Lecourieux et al. 2002; Tavernier et al. 1995; Yang et al. 1997). Laminarin induced a rapid uptake of ⁴⁵Ca²⁺ in cultured grapevine cells (Fig. 1C) in a dose-dependent manner, with 1 g/liter being the most efficient concentration (data not shown). The increase in Ca²⁺ influx started within a few minutes, then reached a maximum value after 15 min corresponding to 60 nmol per gram of fresh weight of cells (FWC). In control cells, the basal level of Ca²⁺ remained unchanged.

Alkalinization of the incubation medium has been reported many times for elicitor-treated cell suspensions (Felix et al. 1993, 1998; Küpper et al. 2001; Mathieu et al. 1996). Treatment of grapevine cells with laminarin at 1 g/liter caused an increase in the pH of the medium from 5.12 to 5.35 within 30 min (Fig. 1D). Thereafter, the pH decreased slowly to 5.26 at 90 min after the beginning of the treatment.

A rapid activation of MAPKs has been described for different plant systems in response to elicitors (Gomez-Gomez and Boller 2002; Lebrun-Garcia et al. 1998; Romeis et al. 1999; Zhang et al. 1998). In our control and laminarin (1 g/liter)-treated grapevine cells, total MAPKs were quantified using an antibody raised against human nonactivated ERK1/2. Western blots performed with this antibody revealed two MAPKs with relative molecular masses of 49 and 45 kDa, respectively, and with comparable intensities in both control and laminarin-treated cells (Fig. 1E). Thereafter, the time course of activation of MAPKs in grapevine cells was analyzed using an antibody raised against a phosphorylated peptide contained in the human active ERK1/2. Immunodetection with this last antibody revealed a rapid and transient activation of both MAPKs (Fig. 1F) only in laminarin-treated cells. Their activation was detected within 5 min of treatment, peaked after 15 to 30 min, and then fell to undetectable levels after 60 min.

Defense-related gene expression in laminarin-treated grapevine cells and plants.

In grapevine, most elicitor- or pathogen-induced cDNA that has been cloned corresponds to genes encoding PR proteins (Busam et al. 1997; Davies and Robinson 2000; Jacobs et al. 1999; Robert et al. 2001, 2002) or enzymes involved in the synthesis of stilbene phytoalexins (Melchior and Kindl 1990, 1991; Sparvoli et al. 1994; Wiese et al. 1994). To our knowledge, many other putative defense genes, such as *PR-1* and *PDF1.2*, have not yet been identified in this species. For our study, grapevine cells were challenged with laminarin at the saturating concentration of 1 g/liter, and the expression pattern

of 11 selected defense-related genes was analyzed using real time quantitative polymerase chain reaction (rtq-PCR) and specific primers (Table 1) with an actin gene as internal standard (Bézier et al. 2002a). The rtq-PCR analysis gave reproducible results that were confirmed using RNA gel blot analysis (data not shown). In control cells, transcript accumulation of the different genes was always very low during the 25-h incubation period (data not shown).

In grapevine cells treated with laminarin, 9-lipoxygenase (*LOX*) and glutathione-S-transferase (*GST*) genes were rapidly and transiently up-regulated (Fig. 2A). The steady state levels of mRNA for *LOX* and *GST* increased 1 h after laminarin was supplied, and were maximal (35- and 65-fold higher, respectively, than in control cells at time zero) after 2 and 5 h of treatment, respectively. mRNA levels subsequently decreased slowly.

Phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) is a key enzyme of the phenylpropanoid pathway which leads to various defense-related compounds. Downstream of *PAL*, stilbene synthase 1 (*STS1*) is responsible for the synthesis of resveratrol, the main phytoalexin produced by grapevine in response to biotic or abiotic stresses (Adrian et al. 1997; Coutos-Thévenot et al. 2001; Langcake and Pryce 1977a and b). In laminarin treated-cells, *PAL* and *STS1* mRNA were detected after 1 h of treatment, and reached a 20-fold higher level than in control cells after 5 h. Thereafter, transcripts of both slowly declined (Fig. 2A).

We also focused on a *PGIP* gene for which the product, a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), interacts with extracellular endo- α -1,4-polygalacturonases (PGs) secreted by phytopathogenic fungi to inhibit their activity (Caprari et al. 1996). In laminarin-treated cells, *PGIP* transcript accumulation was detectable after 10 h of treatment and reached a 40-fold accumulation after 20 h (Fig. 2A).

The mRNA accumulation of three genes encoding chitinases has been shown to be differentially regulated in grapevine when challenged with *U. necator*, *P. viticola*, *B. cinerea*, or *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Busam et al. 1997; Jacobs et al. 1999; Robert et al. 2002). Basic class I (*CHIT1b*), acidic class III (*CHIT3*), and acidic class IV (*CHIT4c*) chitinase cDNAs were cloned from grapevine cells (Busam et al. 1997) or leaves (A. Bézier, personal communication) from various cultivars. In laminarin-treated grapevine cells, the expression of the three genes increased from 1 h of treatment and reached a maximum between 5 and 10 h, with an approximately 140-fold, 30-fold, and 700-fold increase for *CHIT1b*, *CHIT3*, and *CHIT4c*, respectively. Thereafter, transcript accumulation remained constant (*CHIT3*) or else decreased slowly (*CHIT1b* and *CHIT4c*) until the end of the experiment (Fig. 2B).

The class I β -1,3-glucanases are antifungal vacuolar proteins implicated in plant defense which exhibit developmental, hormonal, and pathogenesis-related regulation. The antifungal ac-

Table 1. Sequences of defense gene primers used for real time quantitative polymerase chain reaction^a

Names	Forward primers	Reverse primers
<i>CHIT3</i>	5'-AGATGGCATAGACTTCGACA-3'	5'-GTACTTTGACCACAGCATCA-3'
<i>CHIT4c</i>	5'-GCAACCGATGTTGACATATCA-3'	5'-CTCACTTGCTAGGGCGACG-3'
<i>CHIT1b</i>	5'-ATGCTGCAGCAAGTTTGGTT-3'	5'-CATCCTCCTGTGATGACATT-3'
<i>GLU1</i>	5'-ATGCTGGGTGTCCAAACTCG-3'	5'-CAGCCACTCTCCGACAGCAC-3'
<i>GST</i>	5'-GCATGGGGTAAGAGGTGCATG-3'	5'-GCCTTGTGTGATGTAATTGG-3'
<i>LOX</i>	5'-CTGGGTGGCTTCTGCTCTC-3'	5'-GATAAGCCGCAGATTTCATGC-3'
<i>PAL</i>	5'-TGACCACTTGACTCACAAT-3'	5'-ACTAGGTATGTGGTAGACAT-3'
<i>PIN</i>	5'-AGTTCAGGGAGAGGTTGCTG-3'	5'-GCACTAGGGTCCGTGTTTGGGTGACG-3'
<i>STS1</i>	5'-TACGCCAAGAGATTATCACT-3'	5'-CTAAAGAGTCCAAAGCATCT-3'
<i>HSR</i>	5'-GGACTACCGACATGCACCTG-3'	5'-GGTCATCACAGCCTCTTGC-3'
<i>PGIP</i>	5'-CCTAGACAATCCCTACATTC-3'	5'-GACATTGGGGTCGAATCCTC-3'

^a *CHIT1b* and *CHIT3* (Busam et al. 1997), *PAL* and *STS1* (Sparvoli et al. 1994), *HSR* (Bézier et al. 2002b), and *PGIP* (Bézier et al. 2002a). Other sequences from A. Bézier and F. Bailleul, personal communication. Accession numbers: *CHIT4c*, no. AY137377; *GLU1*, no. AF239617; *GST*, no. AY156048; *LOX*, no. AY159556; and *PIN*, no. AY156047.

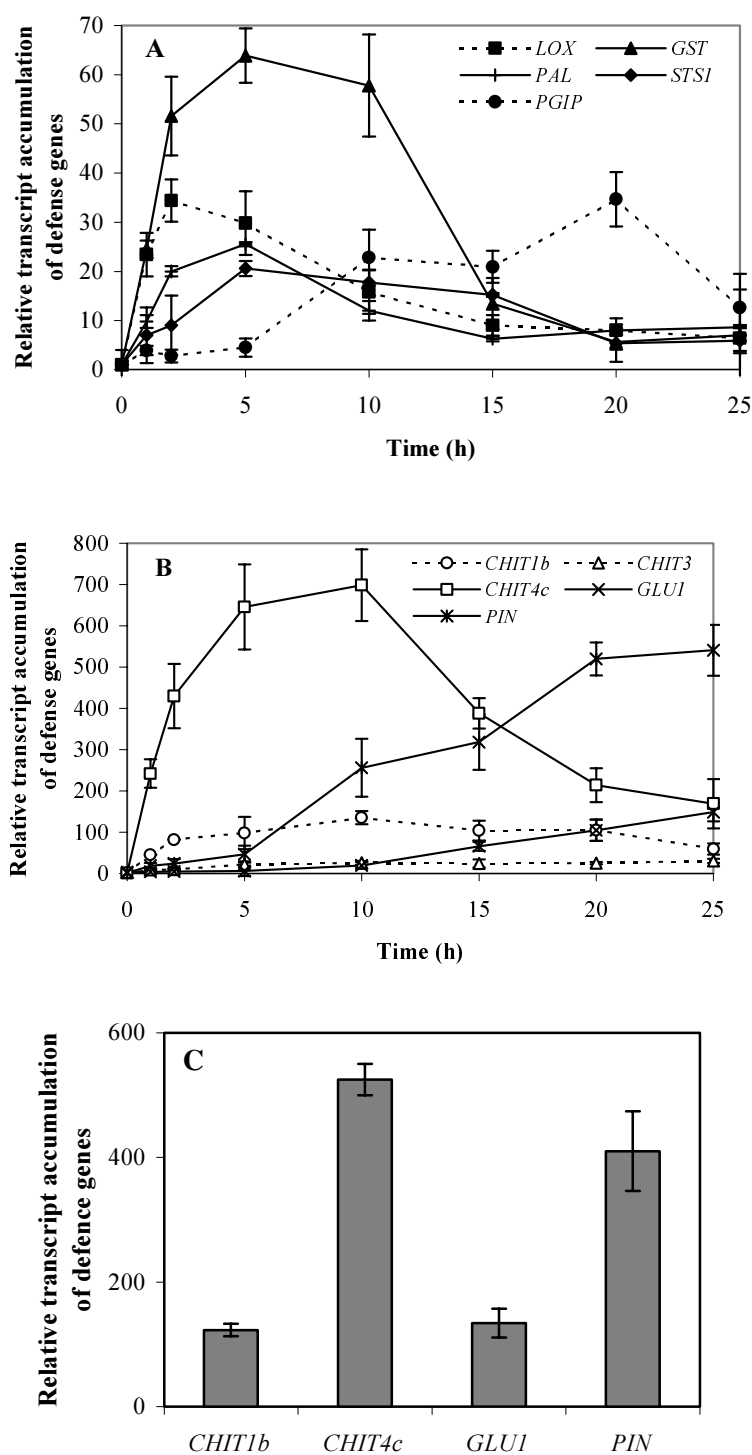


Fig. 2. Transcript accumulation of defense genes in grapevine cells after elicitation by laminarin. **A**, Expression profiles of defense-related genes encoding a lipoxigenase (*LOX*, accession no. AY159556), a glutathion-S-transferase (*GST*, accession no. AY156048), a polygalacturonase-inhibiting protein (*PGIP*; Béziers et al. 2002a), a phenylalanine ammonia lyase (*PAL*; Sparvoli et al. 1994), and a stilbene synthase (*STSI*; Sparvoli et al. 1994) in grapevine cells treated with laminarin at 1 g/liter. **B**, Expression profiles of pathogenesis-related (*PR*) genes encoding a basic β -1,3-glucanase (*GLU1*, accession no. AF239617), a serine-proteinase inhibitor (*PIN*, accession no. AY156047), a basic chitinase (*CHIT1b*; Busam et al. 1997), and two acidic chitinases of class III (*CHIT3*; Busam et al. 1997) and class IV (*CHIT4c*, accession no. AY137377) in grapevine cells treated with laminarin at 1 g/liter. Analyses were performed by real time quantitative polymerase chain reaction (rtq-PCR). Levels of transcripts were calculated using the standard curve method from triplicate data, with grapevine actin gene as internal control and nontreated cells (zero time) as reference sample. Results represent the mean fold increase of mRNA level over nontreated cells, referred as the 1 $\times$ expression level. Absolute copy number of mRNA for each target gene in the reference sample was 10 (*GLU1*), 1,633 (*PIN*), 494 (*CHIT1b*), 1,194 (*CHIT3*), 735 (*CHIT4c*), 56 (*LOX*), 13 (*GST*), 60 (*PGIP*), 64 (*PAL*), and 7 (*STSI*) $\times 10^3$ molecules/ μ g of total RNA. Results presented are means of triplicate data $\pm$ SD of one representative experiment out of three. **C**, Expression of *PR* genes in grapevine detached leaves after 24 h of treatment with laminarin at 1 g/liter. Detached leaves were incubated for 24 h on aqueous solutions containing laminarin at 1 g/liter before inoculation with a conidial suspension (5×10^5 conidia/ml) of *Botrytis cinerea*, and rtq-PCR was performed as described above. In control leaves, the transcript level of defense genes was very low. Values represent the mean $\pm$ SD of triplicates of one representative experiment out of two.

tivity of plant β -1,3-glucanases is thought to hydrolyze the structural β -1,3-glucan present in some fungal cell wall. Three cDNA clones corresponding to different β -1,3-glucanase genes from grapevine have been characterized previously (Jacobs et al. 1999). The rtq-PCR analysis (Fig. 2B) revealed that, in lami-

nar-treated grapevine cells, *GLU1* transcripts accumulated from 15 h of treatment with a 150-fold increase within 25 h.

Inhibitors of serine proteases (PIN) have emerged as a class of antifungal PR-6 proteins which have potent activity against plant and animal pathogens (Van Loon and Van Strien 1999).

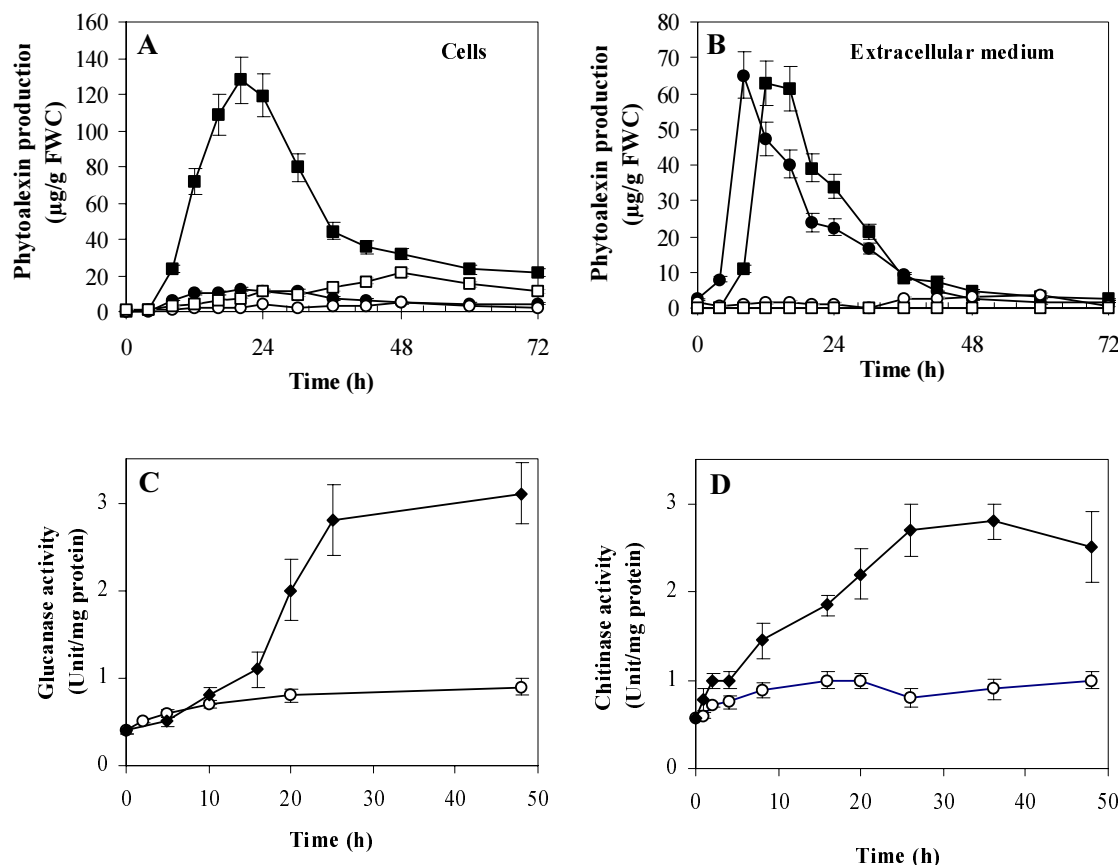


Fig. 3. Phytoalexin synthesis, glucanase, and chitinase activities in grapevine cells in response to laminarin. Resveratrol (●) and ϵ -viniferin (■) production measured in **A**, the cellular fraction or **B**, the extracellular medium of cell suspensions treated with laminarin at 1 g/liter or in control cell suspensions (resveratrol, ○ and ϵ -viniferin, □). **C**, Glucanase and **D**, chitinase activities in cell extracts from cell suspensions treated with laminarin at 1 g/liter (◆) or in untreated cells (○). Values represent the mean $\pm$ SD of duplicate assays of one representative experiment out of three.

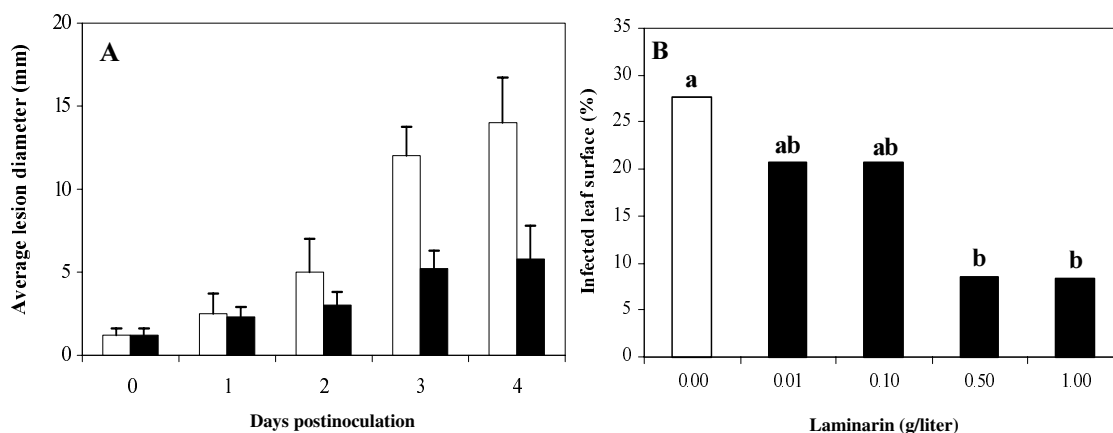


Fig. 4. Laminarin-induced protection of grapevine leaves against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. **A**, Effect of laminarin on the protection of grapevine leaves against the fungus *B. cinerea*. Detached leaves were incubated for 24 h on aqueous solutions containing laminarin at 1 g/liter before inoculation with a conidial suspension (5×10^5 conidia/ml) of *B. cinerea* (40 leaves per condition). Disease assessment was determined measuring the average diameter of lesions formed during 4 days post inoculation. Data represent the average diameter $\pm$ SD of lesions spreading on 40 elicited leaves (black bars) compared with untreated ones (open bars). Results are from one representative experiments out of four. Asterisk indicates that values are significantly different ($P < 0.05$) according to *c* test. **B**, Development of downy mildew (*P. viticola*) on grapevine plants treated with laminarin. Plants were sprayed with increasing concentrations of laminarin and inoculated 10 days later by spraying a sporangial suspension (2×10^4 sporangia/ml). Disease assessment was done 8 days post inoculation and expressed as percent infected leaf surface. Fourteen plants were used per treatment. Results with different letters are significantly different at 5% using Duncan's multiple range test. The experiment was repeated twice with similar results.

The rtq-PCR analysis revealed that the *PIN* gene was up-regulated in grapevine cells after 5 h of laminarin treatment (Fig. 2B), reaching approximately 600-fold within 20 to 25 h of elicitation.

An increase of the expression of these genes also was monitored in detached grapevine leaves treated with laminarin at 1 g/liter. Accumulation of mRNA corresponding to *CHIT1b*, *CHIT4c*, *GLU1*, and *PIN* reached a 110-, 525-, 125-, and 410-fold higher level, respectively, than in control detached leaves after 24 h of treatment (Fig. 2C).

Laminarin did not induce either *HSR* gene expression or cell death.

A cDNA showing significant homology with the tobacco *HSR203* cDNA has been isolated by differential display reverse transcriptase PCR from grapevine leaves infected with *B. cinerea* (Bézier et al. 2002b). In tobacco, *HSR203* mRNA accumulation occurs during the HR and is considered to be a marker of cell death (Pontier et al. 1998). Antisense expression of *HSR203* in tobacco triggered an accelerated cell death, suggesting that its product counteracts the cell death process (Tronchet et al. 2001). Elsewhere, *HSR203* is not expressed in response to various biotic stresses or elicitors which did not induce HR (Brederode et al. 1991; Godiard et al. 1991; Pontier et al. 1998). rtq-PCR results indicated that this grapevine *HSR* homologue was not up-regulated by laminarin (data not shown). Furthermore, grapevine cell viability, quantified by neutral red as a vital dye (Naton et al. 1996), was not significantly altered in the presence of laminarin even at a high concentration. The cells remained 95 to 97% viable after a 24-h treatment with laminarin at 1 g/liter (data not shown). These results clearly indicate that laminarin did not induce any HR in grapevine cells. When applied on whole plants, laminarin at 1 g/liter did not induce cell death (data not shown).

Laminarin induces phytoalexin production and increases chitinase and β -1,3-glucanase activities.

Resveratrol and its dimer, ϵ -viniferin, are the major phytoalexins produced by grape (*Vitis* spp.) in response to microbial attacks and UV (Adrian et al. 1997; Coutos-Thévenot et al. 2001; Langcake and Pryce 1977a and b; Pryce and Langcake 1977). Large amounts of both phytoalexins were produced by grapevine cells in response to laminarin (Fig. 3A and B). Most of the resveratrol accumulated in the extracellular medium, where it peaked 8 h after treatment (65 μ g/g FWC). ϵ -viniferin was present predominantly inside the cells, where it peaked (130 μ g/g FWC) after 20 h, though a significant amount of ϵ -viniferin (62 μ g/g FWC) was detected after 12 h in the extracellular medium. Subsequently, both compounds progressively disappeared from both the cells and the extracellular medium (Fig. 3A and B). The amounts of phytoalexins were very low in control cells and the corresponding extracellular medium (2 μ g/g FWC).

To determine if the accumulation of transcripts corresponding to chitinase and β -1,3-glucanase genes correlates with an increase of chitinase and β -1,3-glucanase activities, respectively, crude enzyme extracts were prepared from laminarin-treated as well as control grapevine cells. Results showed an increase in both intracellular chitinase and β -1,3-glucanase activities after 4 and 10 h, respectively, of laminarin treatment (Fig. 3C and D). Both activities peaked after 25 h of treatment and remained high throughout the experimental period. In control cells, both activities were very low. In detached grapevine leaves treated for 24 h with laminarin at 1 g/liter, chitinase activity increased from 0.23 ± 0.1 (control) to 2.17 ± 0.5 Unit/g of FW leaves (treated).

Laminarin-induced protection of grapevine against *B. cinerea* and *P. viticola*.

Leaves detached from in vitro cultivated grapevine plantlets were preincubated on different concentrations of laminarin for 24 h, then inoculated with a *B. cinerea* conidial suspension of 5×10^5 conidia/ml. Under these conditions, the average diameter of lesions measured 4 days post inoculation was reduced by approximately 55% in the leaves treated with laminarin at 1 g/liter (Fig. 4A). With laminarin at 0.5 and 0.2 g/liter, this reduction reached 40 and 15%, respectively (data not shown).

In a second series of assays, laminarin-triggered protection against *P. viticola* was measured using whole plants (*V. vinifera* cv. Gamay) sprayed on both leaf surfaces with different concentrations of laminarin. A first series of assays indicated that laminarin-induced protection was evident after 8 days of treatment. Thus, whole plants were used instead of detached leaves and plants were inoculated 10 days after laminarin application by spraying a sporangial suspension (2×10^4 sporangia/ml) on the lower face of leaves. Disease intensity was estimated 8 days post inoculation by measuring the leaf area covered by the oomycete and counting the sporangia. Our data (Fig. 4B) indicate that laminarin at 0.5 to 1 g/liter reduced the percentage of *P. viticola*-infected leaf surfaces from 28% in the control to 7% in the laminarin-sprayed plants, corresponding to a 75% reduction in infection.

DISCUSSION

Laminarin triggers a typical elicitor signal transduction network in grapevine cells.

When supplied to grapevine cell suspensions, laminarin triggers a series of events, within minutes of treatment, typical of those described for other, well-known elicitors (Fig. 1). In grapevine cells, laminarin (as well as oligogalacturonides; data not shown) induces a rapid calcium influx, similar to that obtained in tobacco cells, which has been reported to trigger a biphasic and transient free-calcium elevation in the cytosol (Lecourieux et al. 2002). Calcium influx and increase in free cytosolic calcium concentration have been reported to occur in response to various abiotic and biotic stimuli, particularly to elicitors (Blume et al. 2000; Knight et al. 1991; Lecourieux et al. 2002; Mithöfer et al. 1999; Tavernier et al. 1995). In common with other elicitors, laminarin induces the alkalization of the extracellular medium of grapevine cells (Boller 1995). As reported with laminarin-treated tobacco cells (Klarzynski et al. 2000), this alkalization is transient, which suggests the activation of plasma membrane (PM) H^+ -ATPases in a second step, to restore the pH gradient between the apoplast and the cytosol. Laminarin also triggers, within moments of treatment, a transient production of H_2O_2 . AOS can have antimicrobial effects (Baker and Orlandi 1995) and are assumed to be involved in lipid peroxidation (Rustérucchi et al. 1996), oxidative cross linking of cell wall proteins (Bradley et al. 1992; Brisson et al. 1994), phytoalexin production (Jabs et al. 1997), and defense gene expression related to HR and SAR (Alvarez et al. 1998; Chen et al. 1993; Costet et al. 2002; Levine et al. 1994). Nevertheless, the role of AOS, as a signal, is not restricted to plant-pathogen interactions, and their putative roles in SAR and in HR-like cell death has been the subject of debate, with the species and the level of AOS determining for the type of response (Delledone et al. 2001; Rustérucchi et al. 1996; Van Breusegem et al. 2001). In plants, many MAPK modules participate in the transduction of various biotic or abiotic stimuli (Asai et al. 2002; Hirt 1997; Lee et al. 1998). In tobacco, salicylic acid-induced protein kinase (SIPK) and wound-induced protein kinase (WIPK) are two MAPKs activated in response to various elicitors, including cryptogin and oligogalacturonides

(Lebrun-Garcia et al. 1998; Zhang et al. 1998). In grapevine cells, laminarin triggers a fast and transient phosphorylation-dependent activation of two MAPKs with relative molecular masses of 49 and 45 kDa, respectively, suggesting a conserved phosphorylation cascade in this species.

Laminarin induces defense gene expression, accumulation of phytoalexins, chitinase, and β -1,3-glucanase activities.

In elicitor- or pathogen-treated plants, important changes in the plant transcriptome pattern have been reported (Baldwin et al. 1999; Dangl and Jones 2001; Maleck et al. 2000; Schenk et al. 2000). rtq-PCR has been used to analyze the expression of 11 defense-related genes in grapevine cell suspensions and leaves treated with laminarin (Fig. 2). In cells, 10 of these genes were up-regulated in response to the algal β -1,3-glucan, whereas *HSR*, which is considered to be an HR-like marker gene of cell death in tobacco (Pontier et al. 1998), was not induced. This observation is consistent with our results, indicating that laminarin did not induce any cell death. Elsewhere, some of these genes were activated rapidly after laminarin treatment (*LOX*, *GST*, *PAL*, *STS1*, *CHIT4c*, and *CHIT1b*), whereas others were up-regulated later (*CHIT3*, *PIN*, *GLU1*, and *PGIP*). A 9-*LOX* could be essential for the resistance to fungal infection, as it was demonstrated in tobacco using an antisense strategy (Rancé et al. 1998). The gene expression of *GST*, an enzyme which takes part in the detoxification of elicitor-generated oxidants, has been reported in response to the oxidative burst (Levine et al. 1994; Mauch and Düdler 1993; Vanacker et al. 2000). The induction of *PAL* and *STS1* genes is consistent with the production of resveratrol and ϵ -viniferin, two phytoalexins involved in the protection against pathogens (Coutos-Thevenot et al. 2001; Hain et al. 1993; Stark-Lorenzen et al. 1997). PGIPs are considered to favor plant defenses by preventing plant cell wall degradation and modulating some fungal polygalacturonase activities (De Lorenzo and Ferrari 2002), thus releasing elicitor-active long-chained oligogalacturonides.

Laminarin-treated cells also exhibit an induction of genes encoding different families of *PR* proteins with antimicrobial properties (Fritig et al. 1998; Van Loon and Van Strien 1999). The expression of the three chitinase genes occurred rapidly after laminarin treatment. Moreover, the *CHIT4c* transcripts were very abundant, whereas *CHIT3* amounts were low and *CHIT1b* quantities were intermediate. The analysis of the expression of some of these genes in grapevine leaves treated with laminarin confirmed the transcript accumulation monitored in cells, and particularly *CHIT4c* (Fig. 2C). In the same manner, Derckel and associates (1998) showed that the class IV chitinase, *CHV5*, is the most abundant chitinase produced in response to fungal challenge in ripening grape berries. *CHIT1b* and *CHIT3* were activated in grapevine treated with a yeast elicitor or salicylic acid.

As expected, laminarin also triggers a large production of both phytoalexins, resveratrol and ϵ -viniferin. Interestingly, resveratrol was detected mainly in the extracellular medium, whereas its dimer, ϵ -viniferin, was much more abundant in cell extracts (Fig. 3A and B). In cells, both phytoalexins are not sequestered in vacuoles (E. Martinoia, *personal communication*) and the presence of large amounts of ϵ -viniferin suggests a rapid dimerization of resveratrol. The presence of both compounds in the extracellular medium could result from the transport or diffusion of these compounds or their conjugates through the PM to the apoplast, where, as previously reported, they exert their antibiotic activities (Coutos-Thevenot et al. 2001). Alternatively, extracellular ϵ -viniferin could result from an oxidative coupling of resveratrol triggered by a cell-wall-localized peroxidase (Calderon et al. 1992, 1994; Langcake and

Pryce 1977c). Comparisons of kinetics of accumulation of both compounds in cells and extracellular medium support this process, though further experiments are required to verify this assumption.

The activities of both chitinase and glucanase increased in laminarin-treated cells of grapevine (Fig. 3C and D), correlating to the accumulation of the corresponding transcripts (Fig. 2B). In grapevine leaves treated for 24 h with laminarin at 1 g/liter, chitinase activity was 10-fold higher than in the control. This result is in agreement with the induction of chitinase genes in laminarin-treated leaves (Fig. 2C).

Both enzyme activities should participate in the plant defense by hydrolyzing fungal cell wall components as previously reported (Van Loon and Van Strien 1999). They also should amplify the plant defense by releasing β -1,3 glucans and chitin fragments from the pathogen cell walls, both oligosaccharides being well known elicitors (Côté et al. 1998). Thus, laminarin triggers a variety of defense responses in grapevine (our results) and in tobacco (Klarzynski et al. 2000).

Defense responses induced by laminarin lead to grapevine protection against *B. cinerea* and *P. viticola*.

When applied on detached grapevine leaves or on intact plantlets, laminarin 0.5 to 1 g/liter reduced the development of *B. cinerea* and *P. viticola* by approximately 50 and 75%, respectively (Fig. 4). Further protection is conceivable by improving the penetration of the elicitor and by better characterizing the optimum time for defense activation. These assays are in progress. Laminarin also confers protection of tobacco to the soft rot disease agent, *Erwinia carotovora* (Klarzynski et al. 2000), indicating that this compound could be effective across a large spectrum of plant species and against different pathogens, although laminarin probably will not be efficient against all of them. Taken together, these data show that the activation of plant defenses using elicitors is probably a valuable alternative strategy to restrict the pathogen spread.

MATERIALS AND METHODS

Biological materials.

Grapevine (*V. vinifera* cv. Gamay) cell suspensions were cultivated in Nitsch-Nitsch medium (Nitsch and Nitsch 1969) without added hormone on a rotary shaker (150 rpm, 25°C) under continuous light (2,000 ergs/cm²). Cells were subcultured every 7 days to be maintained in exponential phase and 1-day-prior assays. Vitro-plantlets of grapevine (*V. vinifera* cv. Chardonnay 75) were grown in the Murashige and Skoog (1962) medium at 26°C with a photoperiod of 14 h of light. Grapevine plants (*V. vinifera* cv. Gamay) were obtained from cuttings cultivated in a growth chamber at 25°C with a day length of 18 h.

B. cinerea (*Botryotinia fuckeliana* p. f.) strain 630 (kind gift of Y. Brygoo, INRA, Versailles, France) was grown on potato dextrose in 250-ml flasks at 22°C.

A *P. viticola* isolate collected in Burgundy in 2001 was maintained on potted grapevine plants and subcultured every week.

Preparation of laminarin.

Laminarin was extracted and purified from the marine brown algae *L. digitata* by the firm Goëmar as described by Klarzynski and associates (2000). Thus, the same laminarin preparation was tested for elicitor activity on both tobacco (Klarzynski et al. 2000) and grapevine (this work) cells and plants. The average degree of polymerization (DP) of laminarin was estimated by molecular size chromatography coupled with a refractometric detector. Purity, size, and structure were analyzed further by

natural abundance ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy and high performance anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection (Lépagnol-Descamps et al. 1998), confirming that laminarin is an essentially linear β -1,3-glucan of a mean DP of 33.

Treatments.

Cells were collected during the exponential growth phase and washed by filtration in a suspension buffer containing 175 mM mannitol, 0.5 mM K_2SO_4 , 0.5 mM CaCl_2 , and 2 mM MES (morpholineethanesulfonic acid) adjusted to pH 5.4. Cells were resuspended at 0.1 g FW/ml with suspension buffer and equilibrated for 2 h on a rotary shaker (150 rpm, 24°C). Grapevine cells then were used for measurements of calcium influx, H_2O_2 production, extracellular pH, protein kinase activation, and cell death after treatment with laminarin. Control cells were incubated under the same conditions without elicitor.

For gene expression, chitinase activity, and resveratrol production, cells were collected during the exponential growth phase and resuspended at 0.1 g FW/ml in a freshly prepared cell culture medium and equilibrated for 2 h on a rotary shaker (130 rpm, 24°C) before the addition of elicitor.

Measurement of medium alkalization.

Grapevine cells in suspension buffer (pH 5.4) were equilibrated for 1 h with continuous stirring until a steady pH value was reached. The change in medium pH was monitored with a glass combination electrode for 70 min after laminarin supply.

H_2O_2 production measurement.

H_2O_2 production was determined using chemiluminescence of luminol as described previously (Poinssot et al. 2003). Chemiluminescence, measured within a 10-s period with a luminometer, (Lumat LB 9507, Berthold) was integrated and expressed in nanomole of H_2O_2 per gram of FWC using a standard calibration curve obtained by H_2O_2 addition in grapevine cell suspension aliquots.

Ca^{2+} influx measurement.

Five minutes before treatments, cells in the suspension buffer (pH 5.4) were incubated with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0.033 MBq g^{-1} FWC; Amersham Pharmacia Biotech). After different periods of treatment, triplicate 1.5-ml aliquots were filtered under vacuum on glass microfiber (GF/A) filters and washed three times with a total volume of 25 ml of buffer (175 mM mannitol, 0.5 mM K_2SO_4 , 5 mM LaCl_3 , and 2 mM MES, pH 5.4) before transferring the cells to scintillation vials. After a 12-h period at 65°C , dry weight was determined and 10 ml of Ready Safe cocktail (Beckman) were added to the vials before counting in a scintillation counter (TRI-CARB 2100 TR, Packard).

MAP kinase activation monitored by Western blotting assays.

Detection of nonactivated or activated MAPKs was performed as described elsewhere (Poinssot et al. 2003).

Phytoalexin quantification.

At different times after treatment, aliquots (2 ml) of cells in the culture medium were collected and filtered on GF/A glass fiber filters. Filtrates were directly analyzed, whereas stilbenes from the cell fraction were extracted in 2 ml of methanol overnight at 4°C . Each sample (40 μl) was loaded onto a Lichrocart C-18 inverse phase column (250 by 4 mm, 5 μm ; Merck) equilibrated with a 90/10 (vol/vol) H_2O /acetonitrile mobile phase. Phytoalexins were eluted with a linear gradient from 10 to 85% acetonitrile at a flow rate of 1 ml min^{-1} . Quantification of *trans*-resveratrol and ϵ -viniferin was performed with stan-

dard calibration curves using peak areas of different amounts of pure molecules fluorometrically detected ($\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 374 \text{ nm}$), as previously described (Jeandet et al. 1997).

Northern blot analysis and rtq-PCR.

Aliquots of grapevine cell suspensions (2 ml) in the culture medium were filtered and subsequently frozen in liquid N_2 . Total RNA isolation was obtained by adding 1 ml of trizol (Gibco-BRL) following the manufacturer's procedure.

For Northern blot analysis, 10 μg of total RNA were separated on a 1.2% agarose gel containing 1.1% formaldehyde, then transferred to a Hybond N^+ membrane (Amersham Pharmacia Biotech) and crosslinked by UV. The blot was hybridized at 65°C with cDNA probes labeled with 50 μCi [α - ^{32}P]-dCTP using the Ready-To-Go labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech). Blots were exposed for 24 h in a phosphorimager screen or to X-Omat AR film (Kodak).

For rtq-PCR, total RNA were incubated with 15 units of RNase-free DNase I (Promega Corp.) for 30 min at 37°C and stopped with a phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture (25:24:1, vol/vol/vol). DNase-treated RNA (2 μg) was reverse transcribed with 5 μM of oligo(dT) following the manufacturer's instructions (Life Technologies/Gibco-BRL). The transcript levels were determined by rtq-PCR using the GeneAmp 5700 Sequence Detector (Applied Biosystems) using the SYBR Green Master Mix PCR kit as recommended by the manufacturer (Applied Biosystems). PCR reactions were carried out in triplicates in 96-well plates (25 μl per well) in a reaction buffer containing 1 $\times$ SYBR Green I mix (including Taq polymerase, dNTPs, SYBR Green dye), 300 nM forward and reverse primers, and a 1:250 dilution of reverse-transcribed RNA. After denaturation at 95°C for 10 min, amplification occurred in a two-step procedure: 15 s of denaturation at 95°C and 1 min of annealing and extension at 60°C , with a total of 40 cycles. Identical thermal cycling conditions were used for all targets. The gene-specific primers are indicated in Table 1. The absence of primer-dimer formation, which could interfere with specific amplification, was checked in controls lacking templates. Transcript level was calculated using the standard curve method (User Bulletin #2; ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems). Standard curves were generated by performing rtq-PCR on serial dilutions of specific purified DNA. This latter consisted of a PCR product prepared by "classical" PCR from plasmid harboring the target gene as template. The copy number (CN) for these PCR products used as standards was calculated from their concentration measured by absorbance at 260 nm. Standard curves were constructed by plotting the threshold cycle (Ct values, PCR cycle at which the reporter fluorescence of SYBR Green above the baseline signal can be detected) versus the logarithm of the CN of specific purified PCR products. The absolute CN for each sample was calculated from standard curves using their Ct value and normalized against grapevine actin gene as internal control (Bézier et al. 2002a) and nontreated cells as reference sample. Subsequently, for each gene, the reference sample was referred as the 1 $\times$ expression level and results were expressed as the fold increase of mRNA level over the reference sample.

Chitinase and glucanase activity assays.

Chitinase activity was measured according to the procedure described by Wirth and Wolf (1992) using carboxymethylchitin/Remazol/brilliant violet 5R as a substrate. For β -1,3-glucanase assays, proteins from the crude extract (0.5 ml) were precipitated with 80% ammonium sulfate and redissolved in 0.5 ml of 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0. β -1,3-Glucanase activity was assayed according to Derckel and associates (1998) using laminarin (Flucka) as a substrate.

Cell death determination.

The vital dye neutral red was used to test for cell death. Accumulation of the dye within the vacuole was observed by light microscopy. Cells not stained by neutral red were considered dead (Naton et al. 1996). A neutral red aqueous stock solution of 1 mg ml⁻¹ was diluted for staining to a final concentration of 0.01% (wt/vol) in suspension buffer, pH 7.5. Aliquots of 1 ml of cell suspension were examined in triplicates for each laminarin concentration.

Protection assays.

For *B. cinerea* infections, conidia were collected with 10 ml of sterile water on a 10-day-old potato dextrose liquid culture, filtered to remove mycelia and counted. For each treatment, 40 leaves were excised from 10-week-old grapevine vitro-plantlets and pre-incubated on a standard buffer (2 mM MES, 0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM K₂SO₄, pH 5.9) containing various concentrations of laminarin (0.01, 0.1, 0.2, 0.5, and 1.0 g/liter). After 24 h, the leaves were wrapped in wet absorbing paper and placed on plastic petri dishes. One needle-prick wound was applied to each leaf, and the fresh wounds were covered with 5-µl drops of a suspension of 5 × 10⁵ conidia/ml. Quantification of disease development in grapevine leaves after inoculation with *B. cinerea* was measured as average diameter of lesions formed during infection.

For *Plasmopara viticola* infections, plants carrying 12 to 15 expanded leaves were first sprayed on both leaf surfaces with solutions of laminarin at various concentrations (0.01, 0.1, 0.5 and 1.0 g/liter). Héliosol (Samabiol), a tensio-active additive, was added at 0.1% (vol/vol) in all sprayed solutions, including water control. Fourteen plants were used per treatment. Treated plants were kept in a growth chamber (25°C, 18 h of daylight, 60 to 70% relative humidity [RH]) for 10 days, then inoculated by spraying a sporangial suspension of 2 × 10⁴ sporangia/ml onto the lower face of leaves. Inoculated plants were transferred to a dew chamber (100% RH, 20°C, darkness) for one night and then in a growth chamber (23°C, 18-h photoperiod, 60 to 70% RH) for 8 days. Sporulation was induced afterward by placing plants in the dew chamber as described above. Disease intensity was estimated 8 days post inoculation by measuring the leaf area covered with mycelia and counting the sporangia. In the latter method, leaves were washed with 50% ethanol and sporangia were counted with a hemacytometer. Both methods gave similar results.

Statistical analysis was performed by analysis of variance and Duncan's multiple range test.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne and the Regional Councils of Burgundy and Champagne. We thank F. Baillieul for providing the sequences of primers used for real time quantitative PCR and helpful discussions, K. Gould for reviewing the English manuscript, and A. Klinguer for excellent technical assistance.

LITERATURE CITED

Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L. A., and Bessis, R. 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. J. Chem. Ecol. 23:1689-1702.

Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P. J., Ishikawa, A., Dixon, R. A., and Lamb, C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell 92:773-784.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., and Sheen, J. 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. Nature 415:977-983.

Bais, A. J., Murphy, P. J., and Dry, I. B. 2000. The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. Aust. J. Plant Physiol. 27:425-433.

Baker, C. J., and Orlandi, E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 33:299-321.

Baldwin, D., Crane, V., and Rice, D. 1999. A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 2:96-103.

Bézier, A., Lambert, B., and Baillieul, F. 2002a. Study of defense-related gene expression in grapevine leaves infected with *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol. 108:111-120.

Bézier, A., Lambert, B., and Baillieul, F. 2002b. Cloning of a grapevine *Botrytis*-responsive gene that has homology to the tobacco hypersensitivity-related *hsr203J*. J. Exp. Bot. 53:2279-2280.

Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., and Scheel, D. 2000. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. Plant Cell 12:1425-1440.

Boller, T. 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46:489-214.

Bouarab, K., Potin, P., Correa, J., and Kloareg, B. 1999. Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte. Plant Cell 11:1635-1650.

Bradley, D. J., Kjellbom, P., and Lamb, C. J. 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. Cell 70:21-30.

Brady, K. P., Darvill, A. G., and Albersheim, P. 1993. Activation of a tobacco glycine-rich protein gene by a fungal glucan preparation. Plant J. 4:517-524.

Brederode, F. T., Linthorst, H. J., and Bol, J. F. 1991. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. Plant Mol. Biol. 17:1117-1125.

Brisson, L. F., Tenhaken, R., Lamb, C. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. Plant Cell 6:1703-1712.

Busam, G., Kassemeyer, H. H., and Matern, U. 1997. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. Plant Physiol. 115:1029-1038.

Calderon, A., Zapata, J. M., and Barcelo, A. R. 1994. Peroxidase-mediated formation of resveratrol oxidation products during the hypersensitive-like reaction of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 44:289-299.

Calderon, A., Zapata, J. M., Pedreno, M., Munoz, R., and Barcelo, A. R. 1992. Levels of 4-hydroxystilbene-oxidizing isoperoxidases related to constitutive disease resistance in *in vitro*-cultured grapevine. Plant Cell Tissue Organ Cult. 29:63-70.

Caprari, C., Mattei, B., Basile, M. L., Salvi, G., Crescenzi, V., De Lorenzo, G., and Cervone, F. 1996. Mutagenesis of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*: histidine residue 234 is critical for enzymatic and macerating activities and not for binding to polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP). Mol. Plant-Microbe Interact. 9:617-624.

Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., and Hirt, H. 2000. Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. J. Biol. Chem. 275:36734-36740.

Chen, Z., Silva, H., and Klessig, D. F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science 262:1883-1886.

Cheong, J. J., and Hahn, M. G. 1991. A specific, high-affinity binding site for the hepta-β-glucoside elicitor exists in soybean membranes. Plant Cell. 3:137-147.

Costet, L., Dorey, S., Fritig, B., and Kauffman, S. 2002. A pharmacological approach to test the diffusible signal activity of reactive oxygen intermediates in elicitor-treated tobacco leaves. Plant Cell Physiol. 43:91-98.

Côté, F., and Hahn, M. G. 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. Plant Mol. Biol. 26:1379-1411.

Côté, F., Laflamme, L., Payet, M. D., and Gallot-Payet, N. 1998. Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions. Generation, perception, and signal transduction. Subcell. Biochem. 29:385-432.

Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R., and Boulay, M. 2001. In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *VstI* gene under the control of a pathogen-inducible PR10 promoter. J. Exp. Bot. 358:901-910.

Dangl, J. L., and Jones, J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. Nature 411:826-833.

Darvill, A., Augur, C., Bergmann, C., Carlson, R. W., Cheong, J. J., Eberhard, S., Hahn, M. G., Lo, V. M., Marfa, V., Meyer, B., Mohnen

- D., O'Neill, M. A., Spiro, M. D., van Halbeck, H., York, W. S., and Albersheim, P. 1992. Oligosaccharins-oligosaccharides that regulates growth, development and defense responses in plants. *Glycobiology* 2:181-198.
- Davies, C., and Robinson, S. P. 2000. Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol.* 122:803-812.
- Delledone, M., Zeier, J., Marocco, A., and Lamb, C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:13454-13459.
- De Lorenzo, G., and Ferrari, S. 2002. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:295-299.
- Derckel, J. P., Audran, J. C., Haye, B., Lambert, B., and Legendre, L. 1998. Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and β -1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiol. Plant.* 104:56-64.
- Derckel, J. P., Legendre, L., Audran, J. C., Haye, B., and Lambert, B. 1996. Chitinase of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in others tissues. *Plant Sci.* 119:31-37.
- Ebel, J., and Cosio, E. G. 1994. Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148:1-36.
- Felix, G., Baureithel, K., and Boller, T. 1998. Desensitization of the perception system for chitin fragments in tomato cells. *Plant Physiol.* 117:643-650.
- Felix, G., Regenass, M., and Boller, T. 1993. Specific perception of sub-nanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of refractory state. *Plant J.* 4:307-316.
- Fritig, B., Heitz, T., and Legrand, M. 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10:16-22.
- Godiard, L., Froissard, D., Fournier, J., Axelos, M., and Marco, Y. 1991. Differential regulation in tobacco cell suspensions of genes involved in plant-bacteria interactions by pathogen-related signals. *Plant Mol. Biol.* 17:409-413.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T. 2002. Flagellin perception : a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7:251-256.
- Hain, R., Reif, H., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P. H., Stocker, R. H., and Stenzel, K. 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361:153-156.
- Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:285-306.
- Hirt, H. 1997. Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* 2:11-15.
- Inui, H., Yamaguchi, Y., and Hirano, S. 1997. Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61:975-978.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D. 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4800-4805.
- Jacobs, A. K., Dry, I. B., and Robinson, S. P. 1999. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathol.* 48:325-336.
- Jeandet, P., Bessis, R., and Gautheron, B. 1991. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydrostilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.* 42:41-46.
- Jeandet, P., Breuil, A. C., Adrian, M., Weston, L. A., Debord, S., Meunier, P., Maume, G., and Bessis, R. 1997. HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorimetry. *Anal. Chem.* 69:5172-5177.
- John, M., Schmidt, J., Walden, R., Czaja, I., Dulz, M., Schell, J., and Rohrig, H. 1997. Lipo-chitooligosaccharide-induced tobacco cells release a peptide as mediator of the glycolipid signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:10178-10182.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J. M., Yvin, J. C., Kopp, M., Kloareg, B., and Fritig, B. 2000. Linear β -1,3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* 124:1027-1037.
- Knight, M. R., Campbell, A. K., Smith, S. M., and Trewavas, A. J. 1991. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352:524-526.
- Küpper, F. C., Kloareg, B., Guern, J., and Potin, P. 2001. Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* 125:278-291.
- Langcake, P., and Pryce, R. J. 1977a. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33:151-152.
- Langcake, P., and Pryce, R. J. 1977b. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* 16:1193-1196.
- Langcake, P., and Pryce, R. J. 1977c. Oxidative dimerisation of 4 hydroxystilbenes *in vitro*: production of a grapevine phytoalexin mimic. *J. C. S. Chem. Comm.* 7:208-210.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., and Pugin, A. 1998. Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J.* 15:773-781.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., and Pugin, A. 2002. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14:2627-2641.
- Lee, J. Y., Yoo, B. C., and Harmon, A. C. 1998. Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean. *Biochemistry* 37:6801-6809.
- Lépagnot-Descamps, V., Richard, C., Lahaye, M., Potin, P., Yvin, J. C., and Kloareg, B. 1998. Purification and determination of the action of *Halotia tuberculata* laminarinase. *Carbohydr. Res.* 310:283-289.
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., and Gredt, M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Prot.* 18:687-697.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. 1994. H_2O_2 from the oxidatif burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L., and Dietrich, R. A. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* 26:403-410.
- Mathieu, Y., Sanchez, F. J., Droillard, M. J., Lapous, D., Lauriere, C., and Guern, J. 1996. Involvement of protein phosphorylation in the early steps of transduction of the oligogalacturonide signal in tobacco cells. *Plant Physiol. Biochem.* 34:399-408.
- Mauch, F., and Dudler, R. 1993. Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 102:1193-1201.
- Melchior, F., and Kindl, H. 1990. Grapevine stilbene synthase cDNA only slightly differing from chalcone synthase cDNA is expressed in *Escherichia coli* into a catalytically active enzyme. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 268:17-20.
- Melchior, F., and Kindl, H. 1991. Coordinate- and elicitor- dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis* cv. Optima. *Arch. Biochem. Biophys.* 288:552-557.
- Mithöfer, A., Ebel, J., Bhagwat, A. A., Boller, T., and Neuhaus, G. 1999. Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta* 207:566-574.
- Murashige, T., and Skoog, A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Naton, B., Hahlbrock, K., and Schmelzer, E. 1996. Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. *Plant Physiol.* 112:433-434.
- Nitsch, J. P., and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 169:85.
- Poinssot, B., Vandelle, E., Bentéjac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thévenot, P., and Pugin, A. 2003. The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defence reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:553-564.
- Pontier, D., Tronchet, M., Rogowsky, P., Lam, E., and Roby, D. 1998. Activation of *hsv203*, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:544-554.
- Potin, P., Bouarab, K., Kupper, F., and Kloareg, B. 1999. Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:276-283.
- Pryce, R. J., and Langcake, P. 1977. alpha-viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry* 16:1452-1454.
- Rancé, I., Fournier, J., and Esquerré-Tugay, M. T. 1998. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:6554-6559.
- Robert, N., Ferran, J., Breda, C., Coutos-Thévenot, P., Boulay, M., Buffard, D., and Esnault, R. 2001. Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* : expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *Eur. J. Plant Pathol.* 107:249-261.
- Robert, N., Roche, K., Lebeau, Y., Breda, C., Boulay, M., Esnault, R., and Buffard, D. 2002. Expression of grapevine chitinase genes in ber-

- ries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Sci.* 162:389-400.
- Robinson, S. P., Jacobs, A. K., and Dry, I. B. 1997. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiol.* 114:771-778.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D. F., Hirt, H., and Jones, J. D. G. 1999. Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11:273-287.
- Rouhier, P., Kopp, M., Begot, V., Bruneteau, M., and Fritig, B. 1995. Structural features of fungal beta-D-glucans for the efficient inhibition of the initiation of virus infection on *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 39:57-62.
- Rustérucci, C., Stallaert, V., Milat, M. L., Pugin, A., Ricci, P., and Blein, J. P. 1996. Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* 111:885-891.
- Salzman, R. A., Tikhonova, I., Bordelon, B. P., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.* 117:465-472.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., and Manners, J. M. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:11655-11660.
- Sharp, J. K., Valent, B., and Albersheim, P. 1984. Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* 259:11312-11320.
- Somssich, I. E., and Hahlbrock, K. 1998. Pathogen defense in plants—a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3:86-90.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., and Tonelli, C. 1994. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.* 24:743-755.
- Stark-Lorenzen, P., Nelke, B., Hänssler, G., Mühlbach, H. P., and Thomzik, J. E. 1997. Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* 16:668-673.
- Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J. P., and Pugin, A. 1995. Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol.* 109:1025-1031.
- Tronchet, M., Ranty, B., Marco, Y., and Roby, D. 2001. *HSR203* antisense suppression in tobacco accelerates development of hypersensitive cell death. *Plant J.* 27:115-127.
- Vanacker, H., Carver, T. L. W., and Foyer, C. H. 2000. Early H_2O_2 accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiol.* 123:1289-1300.
- Van Breusegem, F., Vranova, E., Dat, J. F., and Inzé, D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 161:405-411.
- Van Loon, L. C., and Van Strien, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:85-97.
- Wiese, W., Vornam, B., Krause, E., and Kindl, H. 1994. Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 Kb grapevine cDNA fragment. *Plant Mol. Biol.* 26:667-677.
- Wirth, S. J., and Wolf, G. A. 1992. Microplate colorimetric assay for endo-acting cellulase, xylanase, chitinase, β -1,3-glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil Biol. Biochem.* 24:511-519.
- Yang, K. Y., Shah, J., and Klessig, D. F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11:1621-1639.
- Zhang, S., Du, H., and Klessig, D. F. 1998. Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10:435-449.

RESUME

La lutte contre les pathogènes de la vigne s'effectue principalement par des produits phytosanitaires dont l'utilisation continue est néfaste pour l'environnement et la santé des utilisateurs et des consommateurs. Les principaux organismes en charge de la viticulture fixent comme priorité la recherche et l'utilisation de moyens de lutte alternatifs à la lutte chimique. Or, l'amélioration génétique de la vigne est interdite dans les vignobles d'AOC pour préserver la typicité variétale, en partie responsable de la qualité des crus. Par ailleurs, des recherches engagées il y a une quinzaine d'années révèlent que les plantes ont des moyens de défense propres, qu'elles activent au contact des micro-organismes qu'elles reconnaissent *via* des molécules appelées éliciteurs. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était à la fois de rechercher et d'identifier des éliciteurs actifs sur la vigne, de caractériser les événements de signalisation et les réactions de défense activés par ces éliciteurs et enfin de vérifier que l'application d'éliciteurs sur la vigne pouvait conduire à une résistance accrue aux pathogènes.

Nous avons purifié, à partir des filtrats de culture d'une souche de *Botrytis cinerea* peu virulente sur la vigne, un éliciteur protéique qui induit un ensemble de réactions de défense dans des suspensions cellulaires de *Vitis vinifera* cv Gamay : influx de calcium, efflux de nitrate, activation de deux MAPK, production d'H₂O₂, activation de gènes de défense, production de phytoalexines. Ces résultats sont les premiers à décrire un ensemble de réactions de défense chez la vigne. Ils révèlent des similitudes mais aussi des différences avec les mécanismes de défense mis en jeu et identifiés dans des plantes modèles comme le tabac. La spectrométrie de masse a permis d'identifier cet éliciteur de *Botrytis cinerea* ; il s'agit de l'endopolygalacturonase 1 (BcPG1), jusque là considérée comme un facteur de virulence. Ce résultat est une contribution originale à la compréhension du dialogue moléculaire entre les plantes et les microbes au cours de l'évolution. Deux autres éliciteurs se sont révélés efficaces sur la vigne : la laminarine, polymère linéaire de β -1,3-glucane extrait de l'algue *Laminaria digitata*, et les oligogalacturonates (OG), polymères α -1,4 d'acide galacturonique notamment produits par l'hydrolyse de la paroi végétale par les endopolygalacturonases. La comparaison au plan qualitatif, quantitatif et cinétique des événements activés par BcPG1 et les OG laissaient supposer que l'activité élicitrice de BcPG1 ne provenait pas uniquement de la libération d'OG *via* son activité enzymatique. Des expériences de désensibilisation ont confirmé que BcPG1 et les OG étaient perçus par les cellules de vigne comme deux *stimuli* distincts. Des traitements chimiques ou physiques de la protéine ont permis de discriminer les activités élicitrice et enzymatique de BcPG1, montrant ainsi que l'activité élicitrice de cette protéine ne provient pas de son activité enzymatique, mais vraisemblablement de motifs structuraux propres à BcPG1 et reconnus par la plante.

Différents tests de protection ont été développés pour évaluer la protection de la vigne induite par des éliciteurs vis à vis de deux agents pathogènes : *Botrytis cinerea* (l'agent de la pourriture grise) et *Plasmopara viticola* (l'agent du mildiou). Les résultats montrent que le développement de ces pathogènes est réduit de plus de 50% lorsque la vigne est pré-traitée par des éliciteurs. Ces résultats sont très prometteurs dans la perspective d'une application en viticulture raisonnée.

Mots clefs : éliciteurs, signalisation cellulaire, réactions de défense, endopolygalacturonase 1 de *Botrytis cinerea*, oligogalacturonates, laminarine, virulence, avirulence, protection, vigne, *Vitis vinifera*, *Botrytis cinerea*.