



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Interaction hôte-pathogène chez *Nicotiana tabacum*.

SCOUMANNE, Ariane

Award date:
1995

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



0807153 28J
FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES

Interaction hôte-pathogène chez *Nicotiana tabacum*

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques

SCOUMANNE Ariane
1995

Interaction hôte-pathogène chez *Nicotiana tabacum*

SCOUMANNE Ariane

Résumé

L'effet des fragments pectiques a été étudié chez des cellules en suspension de *Nicotiana tabacum*. Une analyse des flux ioniques a été réalisée par imagerie de fluorescence. Aucune variation du pH cytosolique moyen n'est décelée. Une mobilisation du calcium libre cytosolique est déclenchée quelques minutes après l'élicitation et se maintient pendant les 30 minutes d'exposition aux fragments pectiques. L'influx en calcium est une première réponse cytosolique rapide suivie par l'induction de réponses nucléaires. En effet, les éliciteurs pectiques induisent une activation enzymatique de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), maximale après 24 heures de traitement. Celle-ci est précédée d'une activation transcriptionnelle du gène correspondant. Une enzyme hydrolytique, la β -1,3-glucanase est activée d'une façon similaire à la PAL pendant l'élicitation. L'utilisation de modulateurs nous a permis d'identifier certains intermédiaires de la voie de transduction du signal menant à l'induction de ces réponses cytosoliques et nucléaires. Des canaux calcium et la voie des phosphoinositides sont impliqués dans l'influx calcique nécessaire à l'activation enzymatique de la PAL et de la β -1,3-glucanase. La calmoduline joue également un rôle dans l'activation de ces deux enzymes. L'identification de nouveaux gènes dont la transcription est régulée par le signal pectique a été envisagée par la technique du "differential display".

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1995

Promoteur : P. Van Cutsem

Co-promoteur : J. Messiaen

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Van Cutsem de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, ainsi que pour ses précieux conseils tout au long de ce mémoire.

Merci à Johan Messiaen pour m'avoir initiée aux joies de la microscopie et de l'analyse d'images et pour sa constante disponibilité.

Je remercie Monsieur Letesson ainsi que Mesdemoiselles Noël et Tibor d'avoir accepté de lire ce mémoire.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire de biotechnologie pour leur accueil et leur bonne humeur journalière.

Ce mémoire est dédié à mes parents pour leur soutien pendant ces cinq années d'études.

Table des matières

Introduction

I.Considérations générales.....	1
II.Relations hôte-pathogène.....	2
III.Les oligogalacturonides comme éliciteurs endogènes.....	4
IV.Reconnaissance de l'éliciteur.....	7
V.Transduction du signal chez les végétaux.....	9
A. Voie des phosphoinositides.....	9
B. Rôle du calcium cytosolique.....	10
C. Les phosphorylations.....	11
D. La voie de l'AMPc.....	12
E. Autres voies de transduction.....	13
F. Fragments pectiques et transduction du signal.....	14
VI.Mécanismes de défense de la plante.....	16
A. Substances à activité antimicrobienne.....	16
1. Les phytoalexines.....	16
2. Les inhibiteurs de protéinases.....	18
3. Les enzymes hydrolytiques.....	19
B. Protéines liées aux propriétés de la paroi.....	20
1. La lignine.....	20
2. La callose.....	21
3. Les glycoprotéines riches en hydroxyproline.....	21
4. Les protéines riches en glycine.....	22
VII.But du travail.....	23

Matériel et méthodes

I.Techniques relatives à la production et au dosage des oligogalacturonides.....	24
A. Obtention d'oligogalacturonides par précipitation au chlorure de baryum.....	24
B. Séparation par HPLC des oligogalacturonides.....	24
C. Dosage des acides uroniques au métahydroxybiphényle.....	25

II. Technique relative aux cultures de cellules.....	26
A. Culture en suspension de <i>Nicotiana tabacum</i>	26
III. Techniques relatives aux protéines.....	27
A. Dosage de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL).....	27
B. Dosage des protéines.....	28
C. Dosage de la glucanase.....	28
IV. Techniques relatives à l'ADN.....	30
A. Isolement de plasmides (mini-prep).....	30
B. Restriction des plasmides.....	31
C. Dosage de l'ADN par fluorimétrie.....	31
V. Techniques relatives à l'ARN.....	33
A. Isolement d'ARN total par la méthode du Trizol.....	33
VI. Techniques relatives à l'analyse d'ARN en dot-blot.....	35
A. Marquage de l'ADN par random priming.....	35
B. Dénaturation de l'ARN total par le Diméthyl Sulfoxyde et le glyoxal.....	35
C. Préparation des filtres d'hybridation.....	36
D. Hybridation des filtres avec la sonde.....	36
VII. Techniques relatives à l'analyse de l'ARN total par la méthode du "fingerprinting".....	38
A. Synthèse du premier brin d'ADNc.....	38
B. Réaction PCR.....	39
C. Electrophorèse et autoradiographie.....	40
D. Purification des fragments d'ADN.....	40
E. Réamplification des bandes d'intérêt.....	41
VIII. Techniques relatives au "Northern".....	42
A. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	42
B. Transfert du gel sur membrane.....	42
C. Marquage de l'ADN à la biotine.....	43
D. Hybridation.....	44
E. Détection.....	44
IX. Techniques relatives à l'étude des flux ioniques en imagerie de fluorescence.....	47
A. Isolement de protoplastes de <i>Nicotiana tabacum</i>	47
B. Chargement des sondes fluorescentes.....	48
C. Méthode d'élicitation des protoplastes (ou cellules).....	49
D. Mesure des intensités de fluorescence émises par la sonde.....	49

Résultats et discussion

I. Modèle simple de l'interaction "hôte-pathogène".....	52
A. Le choix de la plante-hôte.....	52
B. Le choix de l'éliciteur.....	53
II. Etude de flux ioniques induits par les oligogalacturonides.....	54
A. Introduction.....	54
B. Modèle utilisé pour l'étude des flux ioniques.....	55
C. Analyse du pH cytosolique.....	56
1. <i>Mesure du pH cytosolique des protoplastes</i>	56
2. <i>Mesure du pH externe</i>	57
D. Analyse du calcium libre cytosolique.....	57
E. Effet de modulateurs sur l'activité en calcium.....	59
1. <i>Mesure de l'activité en calcium libre cytosolique en présence d'un ionophore calcique</i>	59
2. <i>Mesure de l'activité en calcium libre cytosolique en présence d'antagonistes de canaux calciques</i>	60
3. <i>Mesure de l'activité en calcium libre cytosolique en présence d'antagonistes de la voie des phosphoinositides</i>	61
4. <i>Mesure de l'activité en calcium libre cytosolique en présence d'antagonistes de la calmoduline</i>	62
F. Conclusions générales concernant l'étude des flux ioniques.....	63
III. Etude de l'effet des oligogalacturonides sur l'activation transcriptionnelle de gènes liés à la défense.....	64
A. Introduction.....	64
B. Résultats et conclusion.....	65
IV. Etude de l'effet des oligogalacturonides sur l'activation enzymatique de la PAL et de la β -1,3-glucanase.....	67
A. Introduction.....	67
B. Dosage de l'activité PAL.....	68
1. <i>Introduction</i>	68
2. <i>Résultats</i>	68
3. <i>Conclusion</i>	69
C. Dosage de l'activité glucanase.....	70
1. <i>Introduction</i>	70
2. <i>Résultats</i>	70
3. <i>Conclusion</i>	71

D. Effet des modulateurs sur l'activation enzymatique de la PAL et de la glucanase.....	71
1. <i>Introduction</i>	71
2. <i>Résultats</i>	71
E. Conclusion concernant l'activation enzymatique de la PAL et de la β -1,3-glucanase.....	72
V. Identification de nouveaux gènes par la méthode du "fingerprinting" sur l'ARN total.....	73
A. Introduction.....	73
B. Résultats.....	74
C. Vérification des produits obtenus.....	74
1. <i>Introduction</i>	74
2. <i>Résultats</i>	74
D. Conclusion.....	75

Conclusions et perspectives

I. Conclusions.....	76
II. Perspectives.....	79

Bibliographie

Introduction

I. Considérations générales

Les plantes entretiennent des relations particulières avec leur environnement immédiat. Pour obtenir les nutriments nécessaires à leur croissance, les plantes ont dû maximiser leur surface de contact avec l'extérieur. Ces nouvelles frontières aériennes et souterraines avec l'environnement sont cependant vulnérables aux attaques de tout genre.

La survie de la plante dans un environnement changeant nécessite donc une réponse rapide aux signaux extérieurs. La plante doit être capable de percevoir des signaux de deux types différents :

* Les facteurs climatiques ou abiotiques (la température, la luminosité, et l'humidité) qui influencent la croissance et la morphologie de la plante.

* Les facteurs biotiques (attaques pathogènes par des champignons, des insectes, des bactéries ou des blessures diverses) qui peuvent mettre en péril la survie même de la plante.

Au cours de ce travail, nous porterons notre intérêt sur la perception des facteurs de type biotique par la plante. Nous étudierons, en particulier, comment la plante perçoit la présence d'un pathogène.

L'immobilité rend les plantes incapables de fuir devant un danger. Elles ne possèdent pas de cellules spécialisées dans la défense comme chez les animaux. Les plantes ont donc mis en place toute une série de mécanismes de défense efficaces pour se protéger des agresseurs.

Lorsqu'une plante et un organisme pathogène entrent en contact, un dialogue s'établit entre les deux partenaires. Dans les chapitres suivants, nous nous placerons du côté de la plante en analysant les événements menant à la production d'une défense efficace. Nous étudierons donc successivement le signal généré par le pathogène, la perception de ce signal par la plante, la transduction de celui-ci au niveau cytosolique et finalement l'activation de défenses.

II. Relations hôte-pathogène

Lorsque la plante est soumise à l'attaque d'un pathogène, deux types de relations peuvent s'installer. Une relation est dite compatible quand elle mène à la prolifération du pathogène (virulent) et à l'invasion de la plante dont les défenses ne sont pas efficaces. Une relation est dite incompatible quand la plante réagit en arrêtant la progression du pathogène (avirulent) par des mécanismes de défense efficaces. La plante est alors résistante aux pathogènes (Dixon et Lamb, 1990).

Dans une relation hôte-pathogène, la première barrière de protection rencontrée par l'agent infectieux est la paroi cellulaire. C'est de part et d'autre de cette paroi que va s'installer le premier dialogue moléculaire entre la plante et son agresseur. Cette paroi végétale est constituée de 90% de polysaccharides (microfibrilles de cellulose formant une armature rigide, hémicellulose et pectine composant la matrice) et de 10% de glycoprotéines. Dans la plupart des relations hôte-pathogène, les polysaccharides pariétaux sont les cibles privilégiées d'enzymes hydrolytiques sécrétées par l'agent infectieux.

Ce premier contact entre la plante et le pathogène provoque entre autres le relarguage de molécules-signal (dont des fragments de polysaccharides) qui doivent ensuite être reconnues par la plante. Ces molécules appelées encore éliciteurs constituent le premier signal d'activation des voies de transduction qui mèneront à la mise en place rapide de défense par la plante (relation hôte-pathogène incompatible).

Le terme d'éliciteurs sera employé ici dans un sens général pour toutes substances capables de stimuler des réactions de défense dans les tissus de la plante (Scheel et Parker, 1990). On peut distinguer deux grandes classes d'éliciteurs :

* Les éliciteurs exogènes provenant de la dégradation de la paroi du pathogène (glycoprotéines et autres composants extracellulaires) et pouvant être aussi des éléments abiotiques comme les métaux lourds et les UV.

* Les éliciteurs endogènes provenant de la dégradation de la paroi végétale (glycoprotéines et polysaccharides de l'hôte).

Durant tout notre travail, nous utiliserons toujours le même type d'éliciteurs. Il s'agit des éliciteurs endogènes et plus particulièrement de fragments pectiques dont nous détaillerons la structure dans le chapitre suivant.

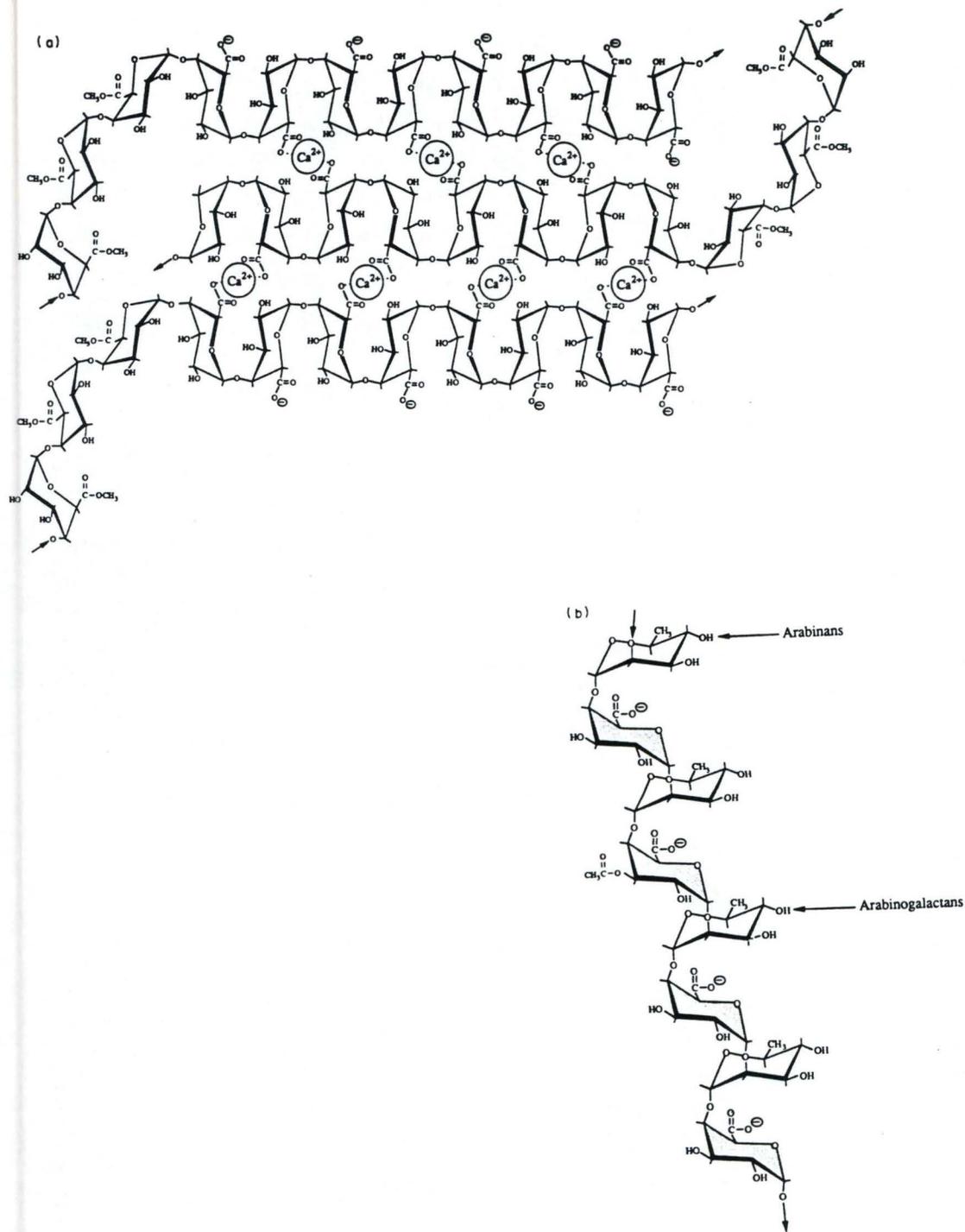


fig. 1.1 : Structure de la pectine pariétale :

(a) Structure en "egg-box" des chaînes d'homopolygalacturonides.

(b) Structure des rhamnogalacturonides I. Ils sont formés d'une alternance d'acides galacturoniques (plus foncé) et de résidus rhamnoses porteurs de chaînes latérales de type arabinogalactane.

III. Les oligogalacturonides pectiques comme éliciteurs endogènes

La pectine est un des constituants majoritaires de la paroi primaire de nombreuses plantes supérieures. Elle permet le maintien de l'hydratation et de la structure de la paroi. Il n'est donc pas étonnant que les pathogènes en fassent une cible privilégiée de leur attaque.

Elle est un polysaccharide complexe constitué d'homopolygalacturonanes (homopolymères hélicoïdaux d'acide (1--->4) α -D-galacturonique) et de rhamnogalacturonides I (hétéropolymères de répétition (1--->2) α -L-rhamnosyl-(1--->4) α -D-galacturonides) (Carpita et Gibeaut, 1993) (fig. 1.1). Les chaînes d'homopolygalacturonides s'associent en complexes intermoléculaires en présence de calcium. Ces empilements de chaînes pectiques créent une structure dite en "egg-box" (fig. 1.2). Dans cette structure, le calcium est lié par des ponts ioniques avec les oxygènes portés par les sucres des chaînes d'oligogalacturonides.

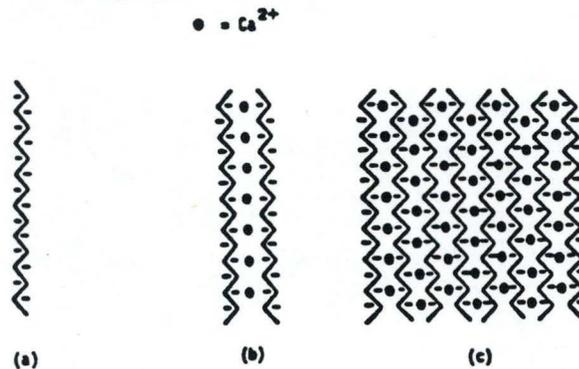


fig 1.2 : Modèle en deux étapes d'association coopérative entre les chaînes homopolygalacturoniques à travers la liaison au calcium :

- (a) chaîne pectique isolée.
- (b) formation de dimères en présence de calcium.
- (c) multimérisation.

Une fois dégradée par des enzymes pectolytiques, la pectine relargue des fragments de deux types : les oligogalacturonides et les oligorhamnogalacturonides. Ces deux fractions ont une activité biologique (Aldington et Fry, 1994). Les oligogalacturonides pectiques sont cependant les éliciteurs endogènes les plus étudiés et les mieux connus actuellement. Il est donc important de remarquer ici que les pectines liées à la paroi sont incapables d'agir comme éliciteurs. Ce

n'est que lorsqu'elles sont solubilisées qu'elles peuvent jouer le rôle de signal (Aldington et Fry, 1993).

De nombreuses études faites récemment montrent que les fragments pectiques sont capables d'activer un large spectre de gènes impliqués dans les réponses de défense de la plante (tableau 1).

Matériel végétal	Taille des oligopectates actifs	Concentration (mg/ml)	References
• Accumulation de glycéolline dans des cotylédons de soja	DP 12	0.28	Nothnagel <i>et al.</i> (1983)
	DP > 10	1.0	Mau et West (1993)
	DP 10-11	0.06	Forrest et Lyon (1990)
• Activation de la casbéne synthétase dans des cotylédons de soja	DP > 8	1.0	Jin et West (1984)
• Accumulation d'inhibiteurs de protéinases dans des plants de tomate	DP 10-20	1.0	Doherty et Bowles (1990)
• Activation de la casbéne synthétase chez le ricin	DP 13 moyen	1.0	Lois et West (1990)
• Accumulation de chitinase dans des feuilles de tabac	DP 14 moyen	0.04	Broekaert et Peumans (1988)
• Lignification dans des suspensions cellulaires de ricin	DP 7 moyen	0.3	Bruce et West (1989)
• Production d'H ₂ O ₂ dans des suspensions cellulaires de soja	DP 12	0.01	Legendre <i>et al.</i> (1993)
	DP 9-16	0.1	Svalheim et Robertsen (1993)
• Endocytose dans des suspensions cellulaires de soja	DP 12	0.06	Low <i>et al.</i> (1993)

Table 1 : Réponses de défense élicitées par des fragments pectiques. Ce tableau reprend le degré de polymérisation (DP) et la concentration des oligomères pectiques utilisés pour induire ces réponses de défense.

Les oligogalacturonides ont non seulement de multiples rôles dans les mécanismes de défense mais interviennent aussi dans les processus de différenciation en induisant des réponses de type morphogène (tableau 2).

Matériel végétal	Taille des oligopectates actifs	Concentrations (mg/ml)	References
- Inhibition de la formation de racine dans des couches cellulaires minces de tabac	DP 10-14	0.001-0.01	Bellincampi <i>et al.</i> (1993)
- Induction de la formation de fleurs dans des couches cellulaires minces de tabac	DP 10-14	0.001-0.01	Marfa <i>et al.</i> (1991)
- Synthèse d'éthylène dans des suspensions cellulaires de poire	DP 12	0.001-0.1	Campbell et Labavitch (1991)
- Induction du mûrissement des fruits chez la tomate	DP > 8	< 0.05	Brecht et Huber (1988)
- Inhibition de l'élongation de segments caulinaires de pois en présence d'auxine	DP > 8	0.15	Branca <i>et al.</i> (1988)

Table 2 : Effets morphogénétiques induits par des fragments pectiques. Ce tableau reprend les DP et la concentration des oligomères pectiques utilisés pour induire ces réponses morphogènes.

Toutes ces études mettent en évidence un rôle pléiotrope des fragments pectiques chez la plante. Un même signal spécifique est capable d'activer différentes réponses physiologiques suivant le stade de développement de la plante.

Nous venons ainsi de passer en revue quelques-uns des nombreux rôles physiologiques des fragments pectiques en tant qu'éliciteurs chez la plante. Nous envisagerons maintenant de comprendre ce que devient cet éliciteur dans le cadre d'une relation hôte-pathogène.

IV. Reconnaissance de l'éléciteur

On a observé expérimentalement que l'induction de la plupart des réponses de défense nécessite des fragments pectiques de $DP \geq 9$ (Messiaen et Van Cutsem, 1993). En effet, il semble que seuls des oligogalacturonides d'une longueur minimale de $DP = 9$ sont capables de s'associer, en présence de calcium, et de créer une structure en "egg-box".

Il est fort probable que ces structures tri-dimensionnelles soient les signaux actifs qui interagiraient avec la cellule végétale, via des sites de liaison spécifiques, pour initier une réponse de défense ou une réponse morphogène (Farmer et Ryan, 1990). L'utilisation d'un anticorps monoclonal contre des dimères d'acide polygalacturonique (Liners *et al.*, 1989) a en effet permis d'inhiber certaines réponses de défense normalement induites en présence d'oligogalacturonides (Messiaen et Van Cutsem, 1994).

L'existence à la surface des cellules de sites de liaison aux éléciteurs (de type récepteurs) a été suggérée depuis longtemps. Ces sites ne sont pas situés dans la paroi cellulaire puisque des protoplastes (cellules dépourvues de paroi) se montrent capables de répondre aux éléciteurs d'une façon similaire aux cellules (Scheel et Parker, 1990).

Par exemple, des protoplastes de *Petroselinum crispum* fraîchement isolés accumulent les ARNm et synthétisent les enzymes de la voie des phénylpropanoïdes suite à l'ajout d'une glycoprotéine de la paroi de *Phytophthora megasperma* (Dangl *et al.*, 1987). Ou encore, des protoplastes dérivés de cellules en suspension de *Daucus carota* répondent d'une façon similaire aux carbohydrates solubles (paroi de *Phythium aphanidermatum*) en sécrétant de l'acide 4-hydroxybenzoïque dans le milieu de culture (Schnitzler et Seitz, 1989).

On ne sait cependant pas si le site de liaison spécifique à l'éléciteur est situé dans la membrane plasmique ou si une étape d'internalisation est nécessaire dans le processus de reconnaissance (Scheel et Parker, 1990). Un tel récepteur n'est donc pas encore près d'être isolé. Toutefois, on a montré qu'une internalisation des fragments pectiques se produit (Horn *et al.*, 1989).

Néanmoins, les fragments pectiques activent manifestement les cellules de façon spécifique. Comment ce signal venant de la paroi est-

il "traité" par la cellule? Quels sont les mécanismes de transduction du signal activés par la reconnaissance de fragments pectiques ?

Dans le chapitre suivant, nous tenterons d'apporter quelques réponses à ces questions en décrivant les principales voies de transduction du signal connues chez les végétaux supérieurs. Nous poursuivrons ensuite par une description plus approfondie des mécanismes de transduction du signal activés spécifiquement par les fragments pectiques.

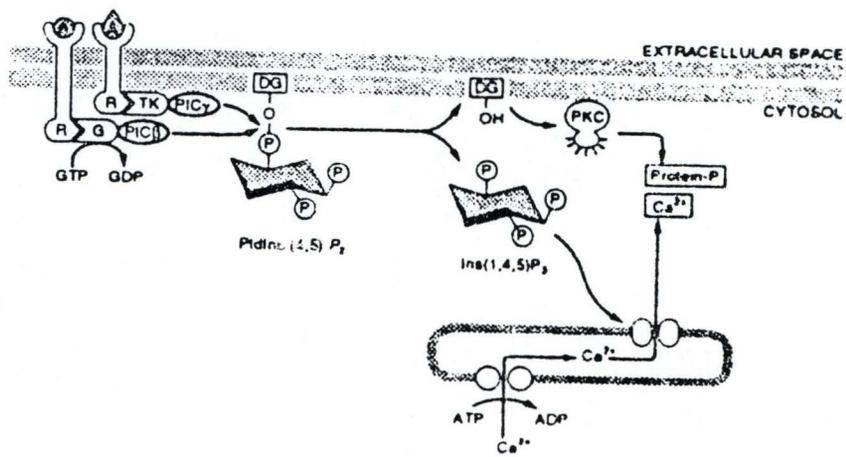


fig. 1.3 : Schéma de la voie des phosphoinositides chez les cellules animales. A, agoniste; R, récepteur; TK, tyrosine kinase; G, protéine G hétérotrimérique; PIC, phospholipase C; PKC, protéine kinase C.

V. Transduction du signal chez les végétaux

Pour que la perception du signal pectique (via l'interaction entre l'éliciteur et son récepteur) puisse mener à l'activation de gènes de défense, celui-ci doit être "traduit" au niveau du cytosol végétal. Jusqu'à présent, très peu de choses étaient connues sur la transduction du signal chez les végétaux supérieurs comparativement aux travaux menés dans ce domaine chez les cellules animales. Des études récentes suggèrent, cependant, que les éléments-clé des voies de transduction des cellules animales se retrouvent aussi chez les végétaux.

A. Voie des phosphoinositides

Chez les animaux, les niveaux en calcium peuvent être régulés par les phosphoinositides (PI). Lorsqu'un agoniste se fixe à un récepteur, une phospholipase C (PLC) est activée via l'interaction soit avec une protéine G, soit avec un récepteur à tyrosine kinase. Cela mène à l'hydrolyse d'un phospholipide membranaire, le phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (Ptd Ins(4,5)P₂) en produisant deux messagers secondaires : l'inositol (1,4,5) triphosphate (Ins(1,4,5)P₃) et le 1,2-diacylglycérol (DAG). L'Ins(1,4,5)P₃ est libéré dans le cytoplasme où il mobilise le calcium de stocks intracellulaires. Le DAG reste dans la membrane et module l'activité de protéines kinases dépendantes (PKC) du calcium en présence de calcium (fig. 1.3).

Beaucoup de composants de la voie des PI ont leur équivalent structural et fonctionnel chez la plante. Le phosphatidylinositol (PtdIns) est un des phospholipides majeurs de la membrane plasmique (15-20%), mais le PtdIns(4,5)P₂ est présent en plus faible quantité (0,05% des phospholipides cellulaires) que chez les animaux (Drøbak, 1993). Une PLC existe dans la membrane plasmique des végétaux et permettrait la production rapide de l'Ins(1,4,5)P₃ (Drøbak *et al.*, 1994).

Plusieurs preuves expérimentales confirment l'idée que l'Ins(1,4,5)P₃ peut être utilisé pour relarguer du Ca²⁺ chez les végétaux. Par la technique du patch-clamp, sur des vacuoles isolées de betteraves rouges, Alexandre et Lassalles (1992) ont montré que l'Ins(1,4,5)P₃ libère spécifiquement du calcium par ouverture de canaux vacuolaires.

La plante sait métaboliser l'Ins(1,4,5)P₃ en Ins(1,4)P₂ ou en Ins(4,5)P₂. Ces produits peuvent ensuite être phosphorylé en Ins(4)P puis en Inositol libre. La plante est aussi capable de produire de l'Ins(1,4,5,6)P₄. On ne connaît pas encore la fonction de ces autres PI (Drøbak, 1993). Ont-ils un rôle de messager secondaire ?

B. Rôle du calcium cytosolique

Il est bien connu que le calcium est un élément régulateur central de beaucoup de processus cellulaires chez les animaux. L'interaction entre un signal et son récepteur mène, à travers plusieurs étapes alternatives, à la régulation de transporteurs de calcium et à une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Cette augmentation induit la formation de complexes Ca²⁺-protéines cibles qui, à terme, régule l'activité de protéines effectrices déterminant la réponse cellulaire. Le complexe Ca²⁺/calmoduline est le plus connu et active d'autres protéines comme les protéines kinases.

La présence de tous les composants de la voie de transduction basée sur le calcium n'est pas encore prouvée chez la plante. Des protéines cibles ont cependant été identifiées comme la calmoduline, des protéines kinases dépendantes du calcium (PKC), des phosphatases et des phospholipases activées par le calcium (Bush, 1993).

La concentration en calcium dans la cellule végétale est maintenue entre 30 et 200 nM par des transporteurs membranaires (Sussman et Harper, 1989). Le transporteur majeur de la membrane plasmique est la pompe Ca²⁺-ATPase responsable de l'homéostasie calcique (Evans *et al.*, 1991). La vacuole occupe 90% du volume cellulaire et est le compartiment majeur de stockage du Ca²⁺ (concentration de 1 à 10 mM) grâce à l'action d'un antiport Ca²⁺/H⁺ (Martinoia, 1992). Elle sert donc de réservoir capable de relarguer du calcium lors d'une stimulation par la lumière, la salinité du milieu extérieur ou les éliciteurs.

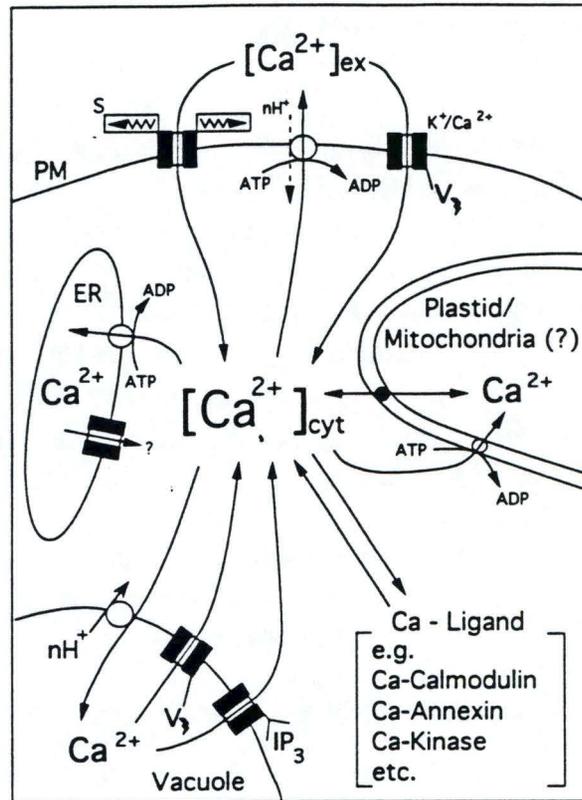


fig. 1.4 : Ensemble des transporteurs qui régulent le niveau cytosolique en calcium chez les cellules végétales. Les principaux transporteurs qui conduisent un efflux de Ca^{2+} vers l'extérieur sont les Ca^{2+} ATPases (large cercle avec ATP) et l'antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ au niveau du tonoplaste. L'influx en calcium vers le cytosol est régulé par des canaux calciques contrôlés par le voltage (V), la concentration en inositol triphosphate (InsP_3) et la tension membranaire (S).

La mobilisation d'ions calcium dans le cytosol, quant à elle, se réalise via l'ouverture de canaux calciques (fig. 1.4). Trois types de canaux calciques ont été identifiés :

* Les **canaux Ca^{2+} dépendants du potentiel de membrane** sont présents dans la membrane plasmique et le tonoplaste (Johannes *et al.*, 1992).

* Les **canaux Ca^{2+} dépendants de l'Ins(1,4,5)P₃** sont présents dans le tonoplaste (Johannes *et al.*, 1992).

* Les **canaux Ca^{2+} sensibles à la tension membranaire** sont présents au niveau de la membrane plasmique (Bush, 1993).

Le mécanisme par lequel la plante peut distinguer deux types de signaux calciques n'est pas encore connu. Une possibilité serait que les changements de concentration en calcium soient accompagnés de changements de concentration d'autres messagers secondaires dont la nature est déterminée par le stimulus. La production de ces autres messagers pourrait être le résultat de phospholipases ou de kinases. Une combinaison de signaux serait donc requise pour une réponse cellulaire particulière (Bush, 1993).

Le mécanisme par lequel un stimulus spécifique induit une augmentation du calcium cytosolique dans les cellules de garde de stomates de *Commelina communis* a été étudié. L'augmentation du calcium cytosolique est reliée directement avec la concentration en calcium extérieur et les deux sont corrélés avec le degré de fermeture des stomates (Mc Ains et al., 1995). Ces résultats suggèrent qu'un mécanisme d'encodage de l'information est requis pour distinguer des stimulus différents. La mobilisation du calcium dans les cellules de garde utilise un pattern d'oscillation du calcium spécifique au stimulus.

C. Les phosphorylations

La phosphorylation de protéines joue un rôle primordial dans de nombreux processus de transduction du signal. Des **protéines kinases** sont présentes dans tous les compartiments cellulaires de la plante. Cependant, les événements intracellulaires survenant suite à la reconnaissance d'un éliciteur ou un microorganisme sont très peu définis.

Récemment, des expériences de marquage *in vivo* avec le [³²P] orthophosphate et d'analyse des phosphoprotéines en gel à deux dimensions ont été réalisées sur des cellules de persil traitées avec un éliciteur fongique (paroi de *Phytophthora megasperma*). Elles ont

permis d'identifier au moins 16 protéines qui sont spécifiquement phosphorylées en réponse à l'éliciteur.

Ces phosphorylations séquentielles, rapides (en quelques minutes) et transitoires dépendent du calcium. Cela confirme l'hypothèse que la phosphorylation de protéines est impliquée dans le processus de transduction du signal suite à la reconnaissance de l'éliciteur ainsi que la présence de protéines kinases calcium dépendantes (PKC) (Dietrich *et al.*, 1990).

Des PKC dépendantes de phospholipides sont présentes chez les animaux et impliquées dans les premiers événements suivant la transduction du signal. Une PKC phosphatidylsérine dépendante a aussi été trouvée chez les végétaux (Dietrich *et al.*, 1990). L'activation par la phosphatidylsérine est perdue lorsque la PKC est éluée de la membrane. Il a donc été suggéré que ce lipide est nécessaire à l'activation complète de la kinase liée à la membrane pendant son induction par le calcium (Einspahr et Thompson, 1990).

D. La voie de l'AMPC

Un second messager important chez les cellules animales est l'AMPC. Lorsqu'un récepteur est activé, il induit la libération du GDP associé à l'unité α d'une protéine G hétérotrimérique ($G \alpha, \beta, \gamma$) en échange de GTP. La protéine G se dissocie alors en $G \alpha$ GTP et $G \beta, \gamma$. Le $G \alpha$ GTP active alors une adénylate cyclase qui génère de l'AMPC capable d'activer des protéines kinases AMPC dépendantes (PKA) qui amplifieront le signal.

L'AMPC ainsi que l'adénylate cyclase sont présentes chez la plante (Pacini *et al.*, 1993). Le $GTP\gamma S$, GTP non hydrolysable, est capable de réguler une adénylate cyclase présente dans la membrane de *chlorogonium*, ce qui indiquerait la participation de protéines G dans sa régulation chez les plantes (Gromes et Zetsche, 1992). La présence d'une protéine G fonctionnelle n'est toute fois pas encore prouvée. Le rôle de la voie de transduction via l'AMPC lors de l'élicitation est encore très discuté actuellement.

En effet, la voie de l'AMPC ne semble pas impliquée dans la transduction du signal et l'activation de défense chez les cellules de persil. Lorsque les cellules sont élicitées par une glycoprotéine fongique, le niveau d'AMPC et de protéines liants le GTP reste inchangé (Renelt *et al.*, 1993). L'équipe de Bolwell (1991), quant à elle, montre

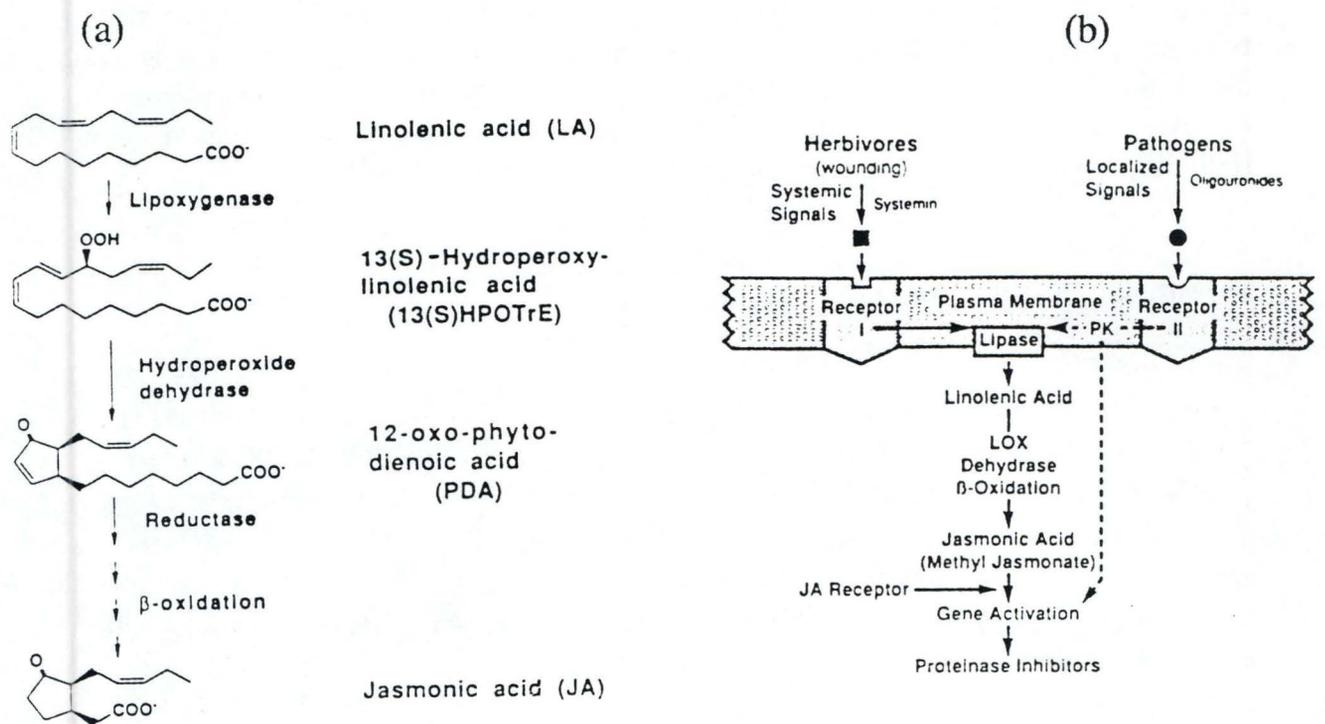


fig. 1.5 : (a) Schéma de la biosynthèse de l'acide jasmonique. (b) Modèle de la voie de transduction du signal induite suite à une blessure (herbivore) ou à un pathogène. PK, protéine kinase; LOX, lipoxygénase; JA, acide jasmonique.

par l'utilisation d'antagonistes, capable d'interagir avec les protéines G des animaux, qu'une éventuelle protéine G serait impliquée dans la transduction du signal chez l'haricot. De plus, la forskoline, qui se lie directement à la protéine G en provoquant une activation de l'adénylate cyclase, induit une activation de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), une enzyme-clé de la voie des phénylpropanoïdes et donc de la synthèse d'une série d'antibiotiques végétaux.

E. Autres voies de transduction

La synthèse de méthyl jasmonate se réalise à partir de l'acide linoléique membranaire via l'introduction d'un oxygène sur la chaîne carbonée suivie d'une déshydratation, d'une réduction et finalement d'une série de β -oxydations (fig. 1.5). Farmer et Ryan (1992) ont montré que l'acide jasmonique et ses précurseurs sont capables d'induire des inhibiteurs de protéinases chez la tomate. Un modèle de transduction du signal a été proposé par Bottin *et al.* (1994) où une lipase est activée et libère l'acide linoléique.

L'acide jasmonique ressemble aux prostaglandines synthétisées à partir de l'acide arachidonique (AA) chez les cellules animales. L'AA est cependant rare chez les végétaux et a des effets controversés. Il est toutefois capable d'induire la synthèse de phytoalexines chez le poivre vert (Hoshino *et al.*, 1994).

La biosynthèse de l'éthylène est réalisée à partir d'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) par une ACC synthase. Chez le persil, on a observé une accumulation d'ACC et une production d'éthylène dans les 2 heures après élicitation. Le pic d'activité de l'ACC synthase précède l'activité PAL (Chappell *et al.*, 1984). La synthèse d'éthylène est surtout considérée comme un symptôme de stress, une conséquence de l'élicitation. Cependant, Raz et Fluhr (1993) ont montré que l'éthylène serait un signal pouvant médier la phosphorylation de protéines et, par conséquent, la synthèse de protéines liées à la défense.

La libération d'intermédiaires actifs de l'oxygène est un des processus mis en route rapidement après une attaque pathogène. Ces intermédiaires toxiques sont principalement : O_2^- , H_2O_2 et le radical hydroxyl OH^\bullet . Ils sont produits suite à la réduction de l' O_2 moléculaire (Mehdy, 1994). Les oligogalacturonides sont connus, chez le soja, pour activer cette production. La formation de ces

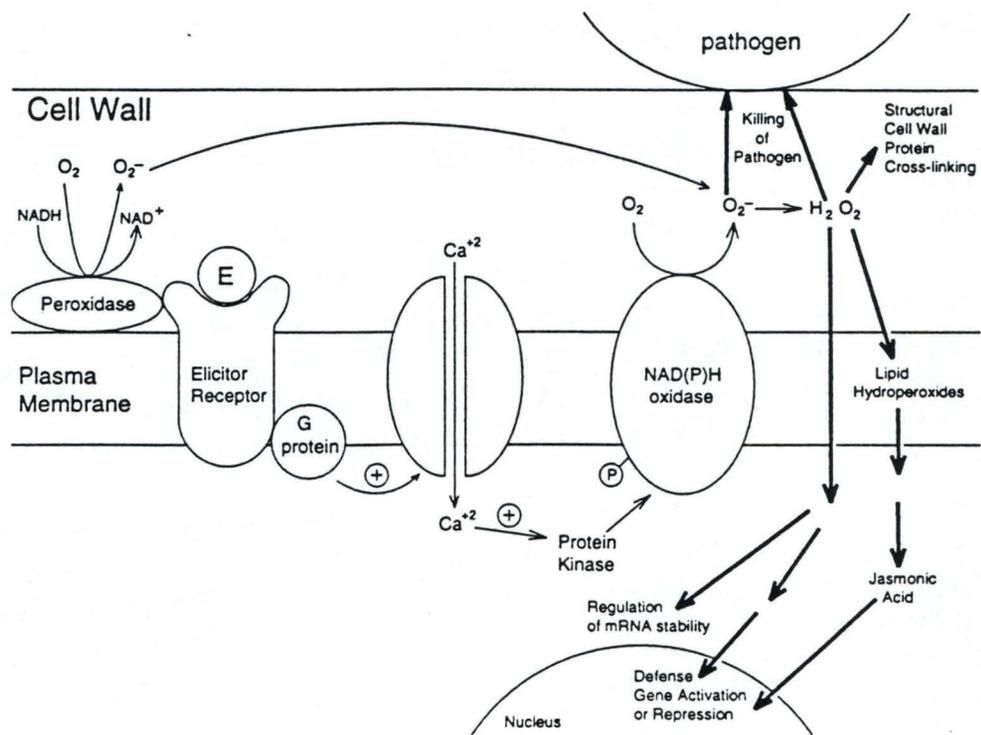


fig. 1.6 : Modèle explicatif de la production d'intermédiaires actifs de l'oxygène (H_2O_2 et O_2^-) et les effets toxiques de ces substances sur le pathogène.

intermédiaires dépend du calcium intracellulaire et de protéines kinases.

La voie de transduction impliquerait un récepteur couplé à une protéine G (Legendre *et al.*, 1992) menant à un influx en calcium. Celui-ci activerait une protéine kinase qui agirait sur une oxydase génératrice d'O₂⁻ (fig. 1.6).

F. Fragments pectiques et transduction du signal

La transduction du signal en réponse aux oligogalacturonides semble être assez complexe et nous ne connaissons pas encore tous les mécanismes mis en place durant l'élicitation. Récemment, plusieurs études ont été réalisées sur les flux ioniques accompagnant la transduction du signal pectique. Des cellules en suspension de tabac élicitées par des DP 9-16 montrent, en plus d'un influx en Ca²⁺, un efflux de K⁺ accompagné d'une dépolarisation membranaire et d'une alcalinisation du milieu extérieur (Mathieu *et al.*, 1991).

Chez la tomate, la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane plasmique a été décomposée en deux parties : une composante insensible au cyanure et une composante sensible au cyanure (produite par une pompe à proton, H⁺-ATPase). Les oligogalacturonides et le traitement au cyanure induisent une dépolarisation similaire de la membrane, ce qui suggère que les éliciteurs pectiques provoquent la dépolarisation membranaire en inhibant une H⁺-ATPase (Thain *et al.*, 1995).

Au laboratoire, Messiaen et Van Custem (1994) ont étudié les réponses membranaires et cytosoliques d'oligogalacturonides sur des cellules en suspension (et des protoplastes) de *Daucus carota*. L'application de ces éliciteurs pectiques déclenche une mobilisation de calcium cytosolique, une dépolarisation membranaire et une acidification cytosolique qui précèdent la transcription de la PAL.

La mobilisation du calcium et l'activation de la PAL sont bloquées par des antagonistes des canaux calciques (vérapamil et nifédipine) sans affecter l'acidification cytosolique et la dépolarisation membranaire. Des antagonistes de la calmoduline n'ont pas d'effet sur la mobilisation du calcium mais inhibent l'activité PAL en réduisant l'acidification cytosolique. Des inhibiteurs de la voie du phosphatidylinositol (néomycine et lithium) diminuent le taux de mobilisation en calcium.

Le calcium serait donc mobilisé via l'ouverture de canaux indépendants du voltage ou de canaux dépendants de l'InsP₃. La calmoduline jouerait un rôle après cette mobilisation calcique. Les éliciteurs pectiques induiraient aussi une autre voie indépendante du calcium mais qui dépend de la dépolarisation membranaire et de l'acidification cytosolique (Messiaen et Van Cutsem, 1994).

Des oligogalacturonides causent, chez la tomate et la pomme de terre, la phosphorylation *in vitro* d'une protéine plasmique de 34 kD suivie d'une induction d'inhibiteurs de protéinases. Des protéines kinases membranaires ont donc un rôle dans l'activation de réponses de défense (Farmer *et al.*, 1990) suite à l'ajout d'oligogalacturonides.

Nous avons ainsi examiné les mécanismes actuellement connus et qui permettraient à la plante d'être alertée de la présence d'un pathogène dans sa paroi végétale. Il reste maintenant à explorer les défenses principales que la plante a à sa disposition pour se protéger et éliminer l'intrus.

VI. Mécanismes de défense de la plante

La dernière étape dans la transduction du signal est l'induction d'une série de réponses de défense (tableau 1, p. 5). La plupart de ces réponses consiste en une activation transcriptionnelle rapide de gènes spécifiques que l'on classe comme gènes liés à la défense. Les produits de ces gènes liés à la défense peuvent être divisés en 3 classes (Bowles, 1990) :

- * Les substances ayant une activité antimicrobienne: les inhibiteurs de protéinases, les hydrolases (chitinase et β 1-3 glucanase) et les phytoalexines.
- * Les substances changeant les propriétés de la matrice extracellulaire : les glycoprotéines riches en hydroxyproline, les protéines riches en glycine et les enzymes renforçant la paroi par dépôt de lignine et de callose.
- * Des protéines appelées "pathogenesis-related" dont la fonction n'est pas encore connue (Somssich *et al.*, 1986). Certaines d'entre elles ont été définies récemment comme des formes acides de glucanase et de chitinase différentes des formes vacuolaires basiques bien connues.

Toutes ces défenses sont activées localement (à l'endroit d'infection par l'agent pathogène), mais elles peuvent aussi l'être dans des tissus non infectés, à distance du site initial d'attaque pathogène. Cette activation est caractéristique d'une "induced systemic resistance" ou réponse systémique (Ryals *et al.*, 1994).

A. Substances à activité antimicrobienne

1. Les phytoalexines

Beaucoup de plantes répondent aux attaques pathogènes en accumulant de petites molécules lipophiles ayant une activité antibiotique à faible concentration et qui sont appelées phytoalexines (Nothnagel *et al.*, 1983). Elles sont absentes chez une plante saine. Leurs niveaux d'accumulation, après quelques heures d'induction,

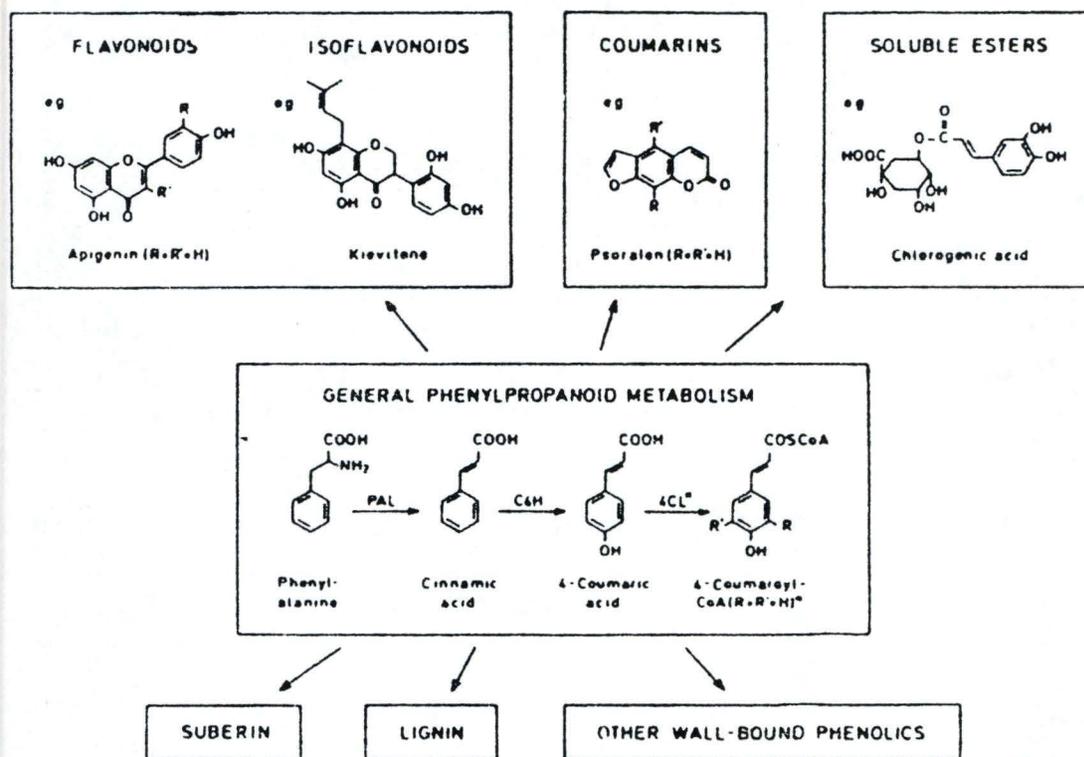


fig. 1.7 : Schéma illustrant les nombreux dérivés de la phénylalanine à partir de la réaction générale du métabolisme des phénylpropanoïdes jusqu'aux principales branches annexes.

peuvent être tels qu'elles constituent un composant majeur de la plante.

La synthèse de ces phytoalexines est induite par de nombreux stimulus comme la lumière, les blessures, les éliciteurs fongiques, l'infection et les stades de développement de la plante. La production de ces substances est un des mécanismes physiologiques de défense les plus étudiés (fig. 1.7). La voie générale des phénylpropanoïdes génère, en plus des phytoalexines isoflavonoïdes, une grande variété de produits telles que la lignine, les pigments flavonoïdes, les protectants UV et les furacoumarines.

La régulation des gènes impliqués dans la synthèse des phytoalexines est très complexe. Nous nous intéresserons ici aux gènes impliqués dans la voie générale des phénylpropanoïdes transformant la L-phénylalanine en esters substitués d'acide cinnamique-CoA.

La phénylalanine ammonia-lyase (PAL), enzyme le plus étudié, catalyse la première réaction de cette voie. Chez le haricot, il existe trois gènes PAL et chacun encode des isoformes distinctes. Les transcrits correspondants ont des patterns d'accumulation différents, ce qui mène à la synthèse sélective de variants fonctionnels de l'enzyme dans différentes situations biologiques. Cela reflète la grande diversité des fonctions biologiques de la PAL. Dans une culture de cellules de soja traitée avec un éliciteur fongique (paroi de *Phytophthora megasperma*), les enzymes comme la PAL et la CHS (chalcone synthase) sont activées et provoquent une accumulation de phytoalexine maximale après 7 heures de traitement (Habederer *et al.*, 1989).

L'expression du gène rapporteur Gus (β -glucuronidase) sous le contrôle du promoteur d'un gène appelé PAL2 dans des tabacs transgéniques montre un pattern spatial de l'activité GUS différent lorsque le promoteur est induit par une blessure que lors du développement. Le promoteur traduit donc les données développementales et environnementales en programme spatial et temporel de l'expression de la PAL (Dixon et Lambert, 1990).

L'équipe de Yamada (1992) a étudié la séquence nucléotidique de clones génomiques appelés PSPAL1 et PSPAL2. Ils ont pu déterminer une séquence de -340 à +140 pb suffisante pour induire la transcription de la PAL en présence d'éliciteurs fongiques. Cette région contient des éléments régulateurs cis (comme un élément riche en AT, TAATTAAT) qui pourraient être responsables de l'induction de la PAL par les éliciteurs fongiques.

La 4-coumarate : Co A ligase (4CL) est la dernière enzyme de la réaction principale des phénylpropanoïdes. Elle a deux isoformes chez le persil (chacun encodé par un gène). Les deux gènes diffèrent seulement par 10 nucléotides. Ils sont tous les deux exprimés de la même manière par une stimulation UV ou par des éliciteurs. La synthèse de la 4CL est aussi rapidement induite suite à une infection fongique au niveau de feuilles de persil et coordonnée à celle de la PAL (Hahlbrock et Scheel, 1989).

Des études récentes (Preisig et Moreau, 1994) ont pu déterminer que l'élicitation par la cellulase de cellules de tabac en suspension implique au moins deux étapes dans la transduction du signal menant à l'accumulation de phytoalexines : la nécessité d'un influx en calcium et l'implication d'une calmoduline et/ou d'une protéine kinase calcium/calmoduline dépendante. Cela confirme les résultats obtenus par Vögeli *et al.*, (1992) où des antagonistes calcium/calmoduline inhibaient la biosynthèse de phytoalexines chez des cellules de tabac activées par un éliciteur fongique.

2. Les inhibiteurs de protéinases (PI)

Les inhibiteurs de sérine protéinase végétales sont les plus connus des PI. Ils inhibent les protéinases telle que la trypsine et la chymotrypsine qui sont communes chez les animaux. Ces PI ont donc une fonction de défense phytochimique contre les prédateurs (insectes herbivores) mais aussi contre les champignons pathogènes. Ils exercent leur activité fongicide en disruptant l'intégrité de la paroi, ce qui provoque un écoulement du contenu intracellulaire chez certaines espèces de champignons (Lorito *et al.*, 1994).

Thain *et al.* (1990) ont constaté que deux préparations d'oligogalacturonides (DP 1-7) et (DP 10-20) étaient capables d'induire l'accumulation d'inhibiteurs de protéinase précédée d'une dépolarisation membranaire rapide et réversible dans des explants de tomate. Récemment, des gènes codant pour des inhibiteurs de protéinase ont été isolés et caractérisés chez le maïs. L'activation de ces gènes et l'accumulation des RNAm correspondants sont induites suite à la blessure produite lors d'une infection fongique (Cordero *et al.*, 1994). Ce type de blessure provoque une accumulation locale mais aussi systémique de l'expression du gène chez le maïs.

3. Les enzymes hydrolytiques

Beaucoup de microorganismes pathogènes attaquent leur plante-hôte en sécrétant des hydrolases, comme la pectinase et la cellulase, capables de dégrader la paroi cellulaire. La plante possède aussi des hydrolases qui dégradent la paroi fongique et bactérienne en inhibant ainsi la croissance de beaucoup de pathogènes potentiels. Il s'agit principalement des chitinases et des β -1,3-glucanases.

Chez le tabac, elles existent sous une forme acide ou une forme basique. Les hydrolases acides sont sécrétées dans la paroi tandis que les hydrolases basiques sont accumulées dans la vacuole. Les hydrolases pariétales constituent la première ligne de défense et les formes vacuolaires sont les défenses secondaires. Les hydrolases seraient en outre impliquées dans une réponse à long terme de type systémique (Bowles, 1990). Il a été montré que les chitinases et les β -1,3-glucanases sont parmi les protéines induites par le stress les plus abondantes en réponse à une attaque pathogène (Mauch *et al.*, 1988).

La chitinase hydrolyse la chitine, un homopolymère de N-acétyl-D-glucosamine lié en β -1,4, qui est un des composants majeurs de la paroi cellulaire de la plupart des champignons et de l'exosquelette des arthropodes. La β -1,3-glucanase hydrolyse les β -1,3-glucanes de la paroi fongique. La dégradation de ces polymères libère ainsi de nouveaux éliciteurs capables d'induire, entre autres, des réponses de défense systémique.

Un grand nombre de preuves indiquent que les chitinases sont impliquées dans la défense de la plante. Les chitinases sont capables d'inhiber la croissance des champignons *in vitro*. En effet, elles se trouvent en faible quantité dans les plantes saines et leur expression est fortement augmentée pendant une attaque pathogène (Oppenheim et Chet, 1992). Lors de l'infection d'une feuille de tabac par *Erwinia carotovora*, le niveau de chitinase augmente jusqu'à 12X en 48 heures par rapport au contrôle. De jeunes plants de tabac auxquels on a ajouté des polysaccharides pectiques montrent une activité chitinase du même ordre de grandeur (Broekaert et Peumans, 1988).

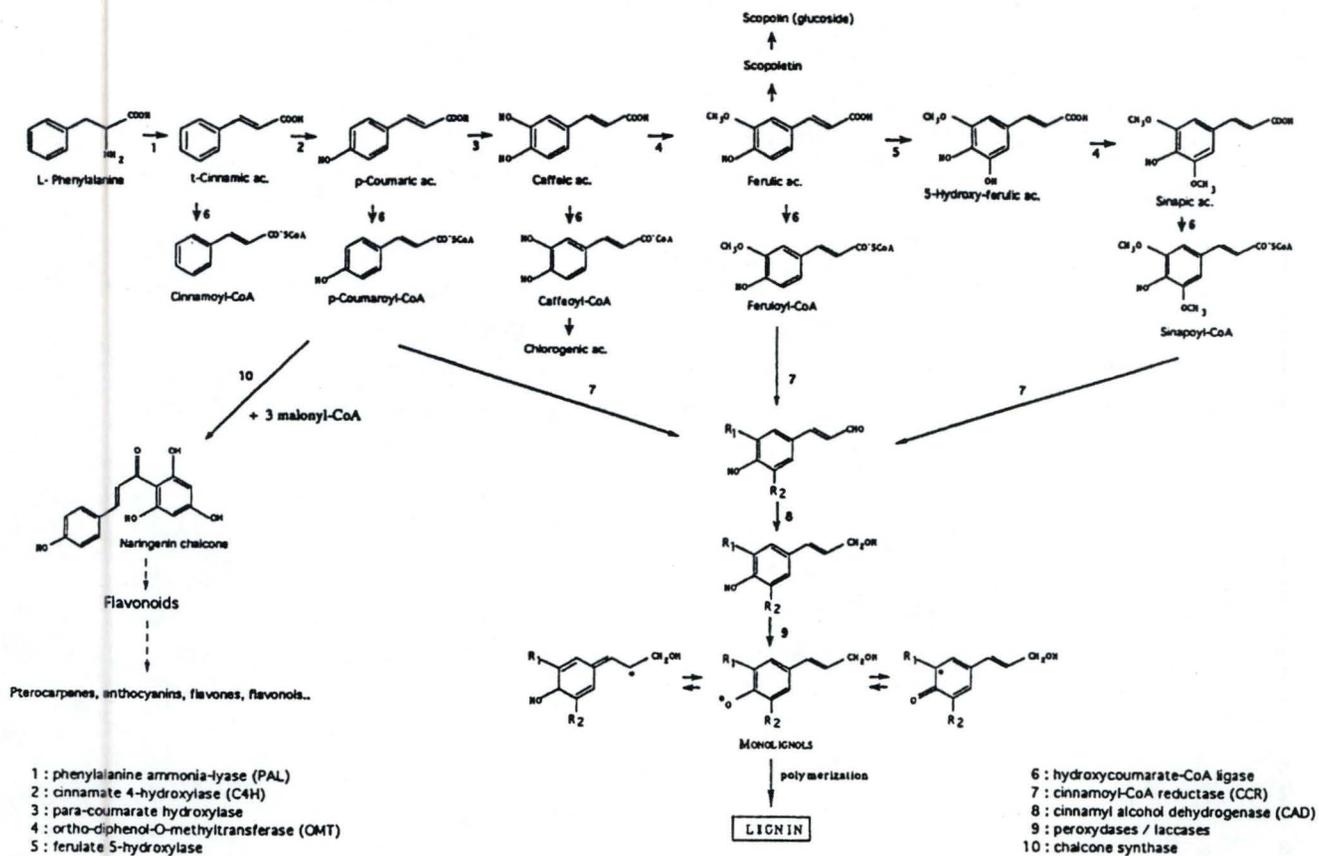


fig. 1.8 : Voie de biosynthèse de la lignine.

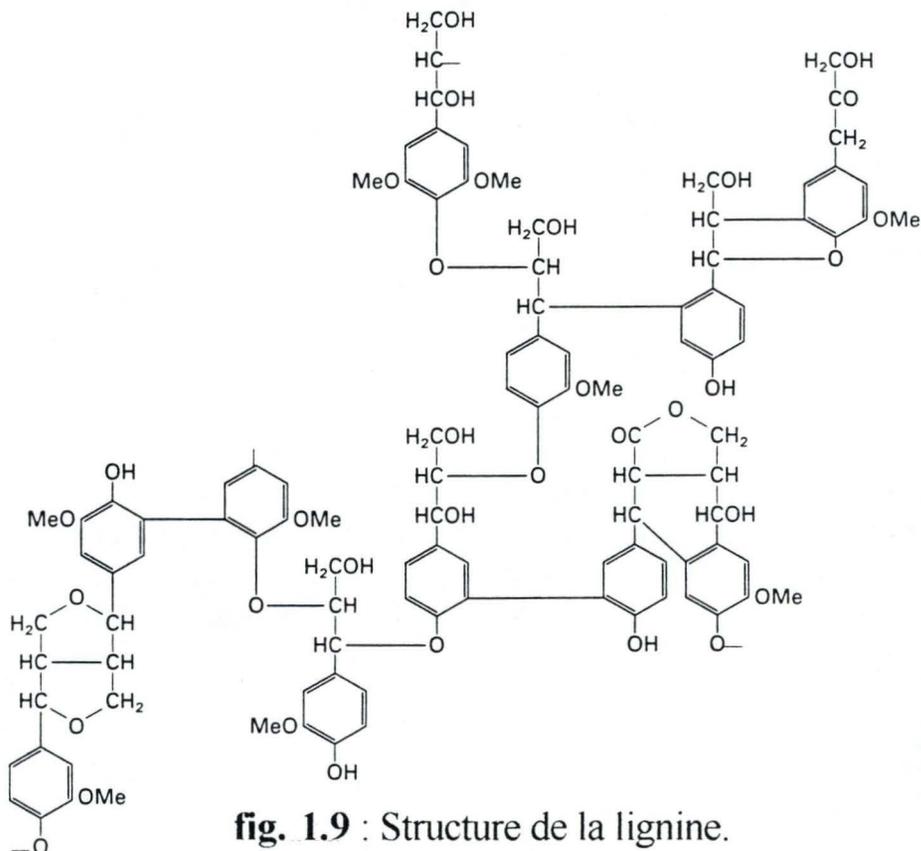


fig. 1.9 : Structure de la lignine.

Récemment, Suzuki *et al.* (1995) ont pu identifier certains composants menant à l'expression de la β -1,3-glucanase et de la chitinase. Une augmentation de la concentration extracellulaire en calcium avec un traitement à l'ionophore calcique induit l'accumulation de RNAm codant pour la chitinase, mais pas celle de β -1,3-glucanase. Un influx en calcium extracellulaire serait nécessaire, mais pas suffisant, pour activer l'expression du gène de la β -1,3-glucanase chez les cellules de tabac traitées par un éliciteur fongique (Suzuki *et al.*, 1995).

B. Protéines liées aux propriétés de la paroi

1. La lignine

La lignine est un polymère phénolique de structure tridimensionnelle très complexe. Les précurseurs monomériques de la lignine sont des alcools cinnamyl hydrolysés et méthoxylés, synthétisés en 2 étapes à partir des esters de coenzyme A correspondants par la cinnamoyl CoA réductase et l'alcool cinnamyl déhydrogénase (CAD) (fig. 1.8).

Ces alcools coumaryl, coniferyl et sinapyl sont polymérisés dans la paroi. Par des liaisons covalentes avec les protéines pariétales, ils rendent la paroi très résistante à une dégradation mécanique ou enzymatique. Une peroxidase a été proposée comme catalyseur de la dernière étape enzymatique qui convertit les alcools cinnamyls en leur forme radicaliques libres qui polymérisent spontanément en lignine (fig. 1.9). La lignine constitue donc une barrière structurale qui interfère avec l'hydrolyse enzymatique de la paroi et la pénétration mécanique du pathogène (Bruce et West, 1989).

La lignine est synthétisée très rapidement lors d'une attaque pathogène. On a pu montrer, en effet, que le gène de CAD est très rapidement activé. Les ARNm s'accumulent déjà 1,5 heure après l'élicitation de cultures de cellules d'haricot (Hahlbrock et Scheel, 1989). L'accumulation de lignine a été également montrée chez le ricin suite à un traitement aux fragments pectiques. La quantité de lignine augmente après 3 heures de traitement et atteint sa valeur maximale après 4-10 heures (Bruce et West, 1989).

2. La callose

La callose est un polymère de D-glucose en liaison β -1,3-. Sa synthèse est catalysée par une enzyme membranaire, la callose synthase. Le dépôt de callose est une réaction rapide de la plante face à une agression. La callose synthase est en effet présente dans la membrane plasmique sous forme latente (Bowles, 1990). Il existe deux types de callose synthase :

* Une callose synthase dépendante du calcium. Il a été montré *in vitro* que l'activation de cette callose synthase est associée à un efflux de K^+ , une alcalinisation externe et un influx local de calcium. Cette activation peut être induite par un traitement au chitosan (composant de la paroi fongique et de l'exosquelette d'insecte) (Kauss *et al.*, 1991).

* Une callose synthase indépendante du calcium. Cette callose synthase a été identifiée chez des cellules de carotte traitées avec une saponine de type spirostanol (Messiaen *et al.*, 1995), et dans des tubes polliniques chez le tabac (Schlöpman *et al.*, 1993).

3. Les glycoprotéines riches en hydroxyproline ou extensines

Les extensines ont été purifiées chez de nombreuses espèces de plantes. Elles s'accumulent suite à une attaque pathogène. Il s'agit de protéines basiques hautement glycosylées. Les monomères protéiques sont composés de pentapeptides Sérine-(Hydroxyproline)₄ glycosylés avec de petits oligomères (3-4 résidus) d'L-arabinose et d'L-galactose liés sur le résidu sérine, renforçant la structure de l'extensine. Le polypeptide d'extensine est synthétisé sous forme de monomères solubles dans la matrice extracellulaire. Ceux-ci sont ensuite rendus insolubles en augmentant le nombre de liaisons inter- et intramoléculaires ("ponts isodityrosines") via l'action de peroxydases. Les extensines forment un réseau complexe qui ralentirait la progression du pathogène dans la paroi (Bowles, 1990).

4. Les protéines riches en glycine (GRPs)

Ces protéines pariétales sont caractérisées par une forte teneur en glycine (60 %). La structure prédite du peptide est une séquence de (Gly-Gly-X)_n. Le X étant le plus souvent une glycine. La régulation de l'expression des gènes GRPs par des signaux développementaux et environnementaux a été montrée chez le pétunia. Le niveau de transcrits est plus grand dans les jeunes feuilles et la tige que dans les organes vieux mais croît rapidement (dans les 5 minutes) dans tous les tissus en réponse à une blessure (Bowles, 1990).

Avec ce dernier exemple, nous avons ainsi parcouru les mécanismes de défense actuellement les mieux connus dont la plante dispose pour lutter contre un pathogène. Ils permettent à la plante de se protéger en renforçant la paroi végétale, mais aussi de contrer l'invasion du pathogène en excréant des substances antimicrobiennes. La plupart du temps, l'issue finale de l'interaction "hôte-pathogène" est un arrêt de la prolifération du pathogène et une victoire de la plante sur son agresseur (relation incompatible).

L'interaction "hôte-pathogène" est un sujet d'étude vaste et complexe : On commence à comprendre la physiologie de la plante attaquée. Il reste toutefois de nombreux points à éclaircir. Quel est le mode de perception des éliciteurs pectiques ? Dans quelle mesure les différentes voies de transduction sont-elles activées ? Comment se fait l'activation nucléaire de gènes impliqués dans la défense ?

VII. But du travail

Une plante saine doit, à tout instant, être susceptible de se défendre contre des attaques diverses. Il est primordial qu'elle perçoive les changements de l'environnement extérieur et dispose de mécanismes de défense prêts à être activés rapidement.

Le but de ce travail est une meilleure compréhension de la façon dont la plante réagit à la présence d'un pathogène. Nous utiliserons pour cela un modèle simplifié de relation hôte-pathogène : une suspension cellulaire de tabac dans laquelle nous simulerons une attaque pathogène en ajoutant des fragments pectiques.

Nous analyserons d'abord la transduction du signal aux travers des flux ioniques que sont le pH cytosolique et l'activité en calcium libre cytosolique. Cette étude sera réalisée sur base des techniques (imagerie de fluorescence et analyse d'images) mises au point au laboratoire (Messiaen et al., 1994).

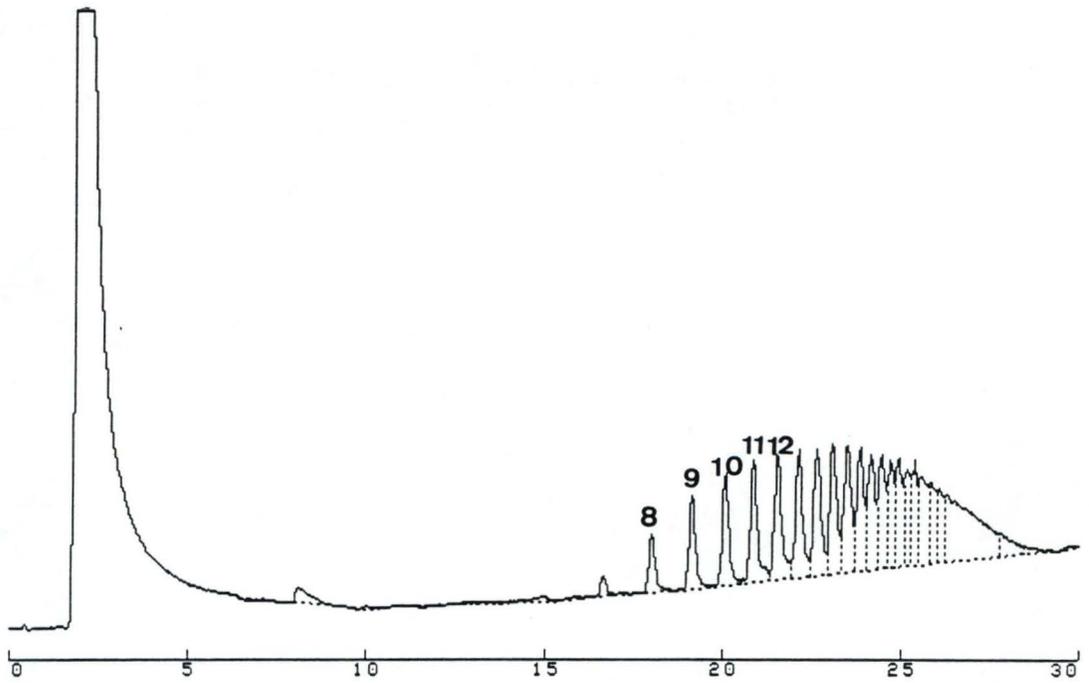
Cette étude sera ensuite complétée par l'examen de l'influence de ces mêmes éliciteurs sur l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (enzyme-clé de la production de phytoalexines) et de la β -1,3-glucanase.

Nous tenterons ensuite, grâce à l'utilisation de la technique du "fingerprinting", d'identifier de nouveaux gènes dont la transcription est augmentée (ou diminuée) suite au signal pectique.

Matériel

et

méthodes



Temps d'élution (minutes)

fig. 2.1 : Profil d'élution sur colonne TSK-DEAE 5PW de polygalacturonides obtenus par hydrolyse acide de pectate de Na.

I. Techniques relatives à la production et au dosage des oligogalacturonides

A. Obtention d'oligogalacturonides par précipitation au chlorure de baryum

Les oligogalacturonides utilisés dans ce travail ont un degré de polymérisation (DP) ≥ 9 . Ils ont été obtenus par hydrolyse acide de pectate de Na comme décrit ci-dessous.

Méthode

- Dissoudre 10 g/l de pectate de Na dans de l'eau désionisée et ajuster le pH à 3,2. Chauffer l'ensemble à reflux pendant 5 heures à 100°C.
- Après refroidissement, porter le pH de la solution à 5,2.
- Centrifuger à 6000 rpm pendant 15 minutes (centrifugeuse Beckman modèle J2-21).
- Récupérer le surnageant.
- Précipiter les oligogalacturonides de DP ≥ 9 avec un léger excès de BaCl₂ (Debonnie, 1991).

B. Séparation par HPLC des oligogalacturonides

Principe

La séparation des oligogalacturonides sur une colonne d'HPLC nous renseigne sur la composition en différents DP de la solution de polygalacturonides obtenue par précipitation au chlorure de baryum (fig. 2.1).

Méthode

- Eliminer les substances colorées accumulées pendant l'hydrolyse acide en incubant la solution dans du charbon actif pendant 1 heure.
- Eliminer le charbon actif par filtration sur fibres de verre.
- Evaporer la solution au rotavapor à 40°C jusqu'à obtenir un volume de 3-10 ml.

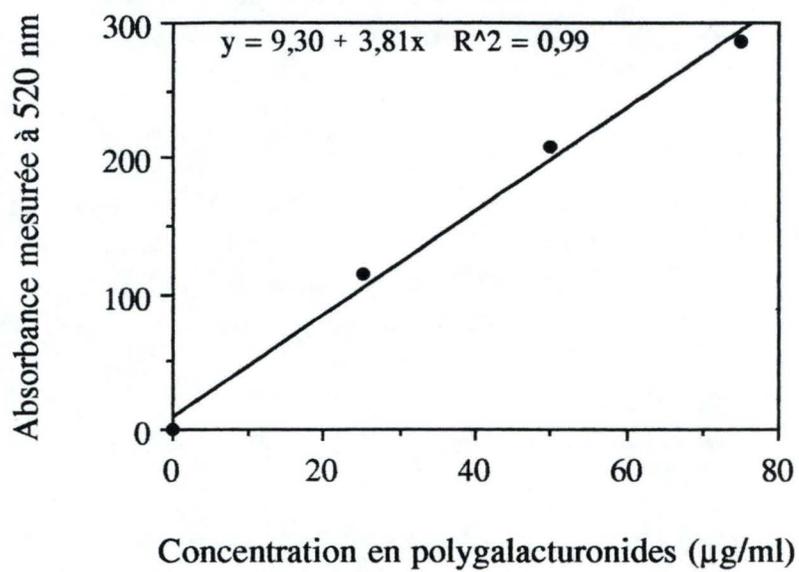


fig. 2.2 : Droite de calibration utilisée pour le dosage d'oligogalacturonides.

- Dialyser les oligogalacturonides (Spectra Por Membrane MW CO : 3500) contre le tampon d'HPLC (tampon acétate de sodium 20 mM à pH 5,2).
- Filtrer l'échantillon sur 0,2 μm et l'injecter à raison de 2 ml/injection sur colonne semi-préparative TSK DEAE 5PW équilibrée dans du tampon acétate de sodium 20 mM pH 5,2.
- Séparer les différents degrés de polymérisation avec un gradient de NaCl (0-250 mM) étalé sur 3 heures.
- Détecter les sucres directement à la sortie de la colonne par ampérométrie pulsée (PAD).

C. Dosage des acides uroniques au métagydroxybiphényle

Principe

Le dosage des acides uroniques permet de déterminer le contenu en oligogalacturonides d'un échantillon en utilisant de l'acide sulfurique et du métagydroxybiphényle. L'acide sulfurique agit en dégradant les polyosides en oses neutres et acides uroniques. Les monomères ainsi libérés sont dégradés en dérivés furfuroïques qui forment un complexe rose avec le métagydroxybiphényle. Ce complexe a un maximum d'absorbance à 520 nm que l'on mesure au spectrophotomètre.

Méthode

- A 200 μl d'échantillon maintenu dans la glace, ajouter 1,2 ml d'acide sulfurique concentré.
- Chauffer à 100°C pendant 5 minutes.
- Refroidir dans la glace et ajouter 20 μl de réactif au métagydroxybiphényle contenant 0,15% de métagydroxybiphényle et 0,5% de NaOH.
- Incuber à température ambiante pendant 15 minutes.
- Lire l'absorbance à 520 nm au spectrophotomètre.

Remarque

Pour pouvoir déterminer la concentration en oligogalacturonides d'un échantillon, nous réalisons une droite de calibration en utilisant des standards de concentrations connues en acides polygalacturoniques (25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$) (fig. 2.2).

II. Technique relative aux cultures de cellules

A. Culture en suspension de *Nicotiana tabacum*

Méthode

Les suspensions cellulaires de tabac sont maintenues en milieu Murashige et Skoog (MS) dans des erlenmeyers stériles de 250 ml, à une température de 25°C, sur un agitateur orbital VKS 75 Edmund Bühler (110 rpm).

Composition du milieu de culture

- 4,49 g/l de sels de Murashige et Skoog (sans vitamines)
- 0,2 g/l de KH_2PO_4
- 30 g/l de sucrose
- 0,2 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) à pH 5,8
- 100 mg/l d'inositol
- 0,1 mg/l de thiamine

Les cellules de tabac sont repiquées tous les 7 jours en prélevant stérilement 2 ml de cellules d'une ancienne culture et en les resuspendant dans 50 ml de nouveau milieu MS stérile. Les repiquages des cellules ont été décalés de telle manière à disposer régulièrement de cellules âgées de 6 jours pour les expériences d'élicitation.

III. Techniques relatives aux protéines

A. Dosage de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL)

Principe

Le dosage de la PAL est basé sur une mesure spectrophotométrique (à 290 nm) de la quantité d'acide cinnamique produite par action de la PAL sur la L-phénylalanine (L-Phe).

Méthode

Stimulation des cellules

- Prélever un volume de 5 ml de suspension cellulaire de tabac âgée de 6 jours à laquelle on a ajouté 0,5 mM en CaCl_2 et 150 mM en NaCl.
- Ajouter 175 μl de la solution d'oligogalacturonides (concentration finale de 0,2 mg/ml).
- Incuber pendant 24 heures à température ambiante.

Obtention d'homogénat cellulaire

- Centrifuger les cellules élicitées à 2500 rpm pendant 15 minutes (centrifugeuse BHG Hermle ZK364).
- Retirer le surnageant et resuspendre le culot de cellules dans 1 ml de tampon borate de Na 0,1 M pH 8,8 + β -mercaptoéthanol 2 mM.
- Homogénéiser l'échantillon à l'ultra-turrax pendant 30 secondes à 4°C.
- Centrifuger l'homogénat à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C (centrifugeuse Heraeus Biofuge A).
- Prélever le surnageant et le stocker dans la glace.

Dosage l'activité PAL

- Mélanger 0,5 ml d'homogénat avec 3 ml de tampon borate de Na 0,3 mM pH 8,8 + 30 μM L-Phe et incuber à 37°C pendant 1 h.
- Mesurer la quantité d'acide cinnamique produite par lecture de l'absorbance à 290 nm (ϵ_{290} acide cinnamique = 10^4 l/mole.cm).

Remarque

Le dosage de la PAL sera accompagné d'un dosage de protéines afin d'exprimer l'activité spécifique de la PAL en $\mu\text{moles}/\mu\text{g}$ de protéines/h.

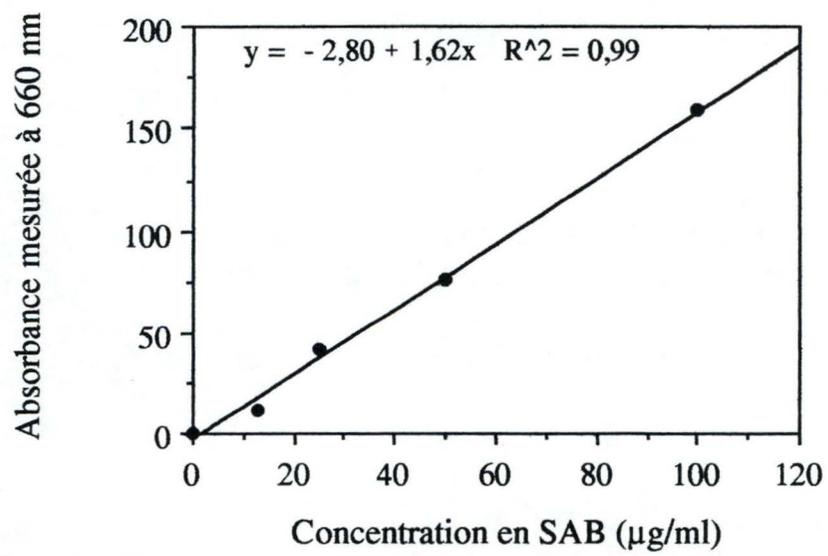


fig. 2.3 : Droite de calibration utilisée pour le dosage des protéines.

B. Dosage des protéines

Principe

Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Ce dosage est réalisé à partir d'un homogénat cellulaire obtenu de la même manière que pour le dosage de la PAL.

Méthode

solution A : Na_2CO_3 2% dans NaOH 0,1 N

solution B : $\text{Cu SO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% dans du tartrate Na-K 1%

solution C : 50 ml de A + 1 ml de B (ajouter au dernier moment)

solution D : réactif de Folin

- A 0,2 ml d'homogénat, ajouter 1 ml de la solution C et vortexer.
- Laisser reposer 30 minutes à température ambiante.
- Ajouter 0,1 ml de la solution D de minute en minute dans chaque tube.
- Après 30 minutes, lire l'absorbance à 660 nm de minute en minute.

Remarque

La quantité de protéines contenue dans un échantillon est déterminée grâce à l'utilisation d'une droite d'étalonnage (fig. 2.3). Celle-ci est réalisée à partir de standards ayant des concentrations connues de 12,5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ en SAB (sérum albumine bovine).

C. Dosage de la glucanase

Principe

Le dosage de la glucanase est basé sur l'apparition des sucres réducteurs suite à l'hydrolyse de la laminarine (Sigma Chemical CO, L-9634). Le dosage de ces sucres réducteurs a été réalisé suivant la méthode au cyanoacétamide (Mauch *et al.*, 1988). Les cellules utilisées ont été homogénéisées de la même manière que pour le dosage de la PAL.

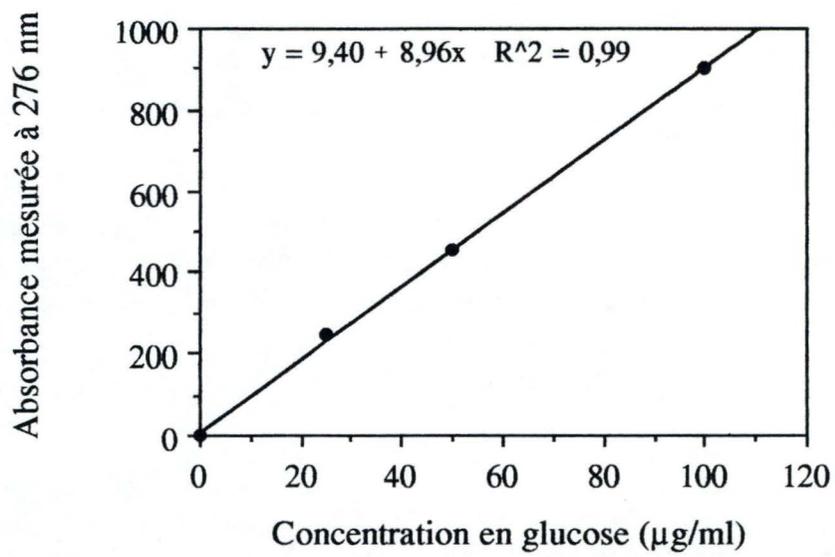


fig. 2.4 : Droite de calibration utilisée pour le dosage de la glucanase.

Méthode

Préparation de l'homogénat

- Enlever les sucres réducteurs présents dans l'échantillon (pouvant interférer avec le test) par précipitation des protéines avec de l'ammonium sulfate (95% de saturation) à 4°C pendant 2 heures.
- Collecter ensuite le précipitat par centrifugation pendant 40 minutes à 13000 rpm (Centrifugeuse *Heraeus Biofuge A*).
- Resuspendre le culot dans 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0.

Dosage de la glucanase

- Ajouter dans un Eppendorf, pour un volume total de 250 µl :
 - 200 µl de solution protéique
 - 0,5 mg de laminarine
 - 5 µM de sodium acétate (pH 5,5)
 - 50 µg de SAB
- Incuber à 37°C pendant 20 minutes.
- Ajouter aux 250 µl de solution, 250 µl de 2-cyanoacétamide 1% et 500 µl de tampon borate 0,1 M (pH 9,0).
- Chauffer l'échantillon à 100°C pendant 10 minutes.
- Refroidir l'échantillon dans un bain eau-glace et mesurer l'absorbance à 276 nm.

Remarque

La quantité de sucres réducteurs contenus dans un échantillon protéique est calculée sur base d'une droite d'étalonnage (fig. 2.4). Celle-ci est obtenue en utilisant des standards de glucose (0,25,50,100 µg/ml).

IV. Techniques relatives à l'ADN

A. Isolement de plasmides (mini-prep)

Méthode

- Mettre les clones bactériens en culture dans 10 ml d'un milieu LB + Ampicilline (30 µl/10 ml) et incubé pendant une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de suspension bactérienne à 13000 rpm (Centrifugeuse *Heraeus* Biofuge A, 2 minutes, 4°C). Éliminer le surnageant et répéter cette opération 2-4 fois.
- Ajouter au culot 150 µl d'une solution de glucose 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM (pH 8,0) + lysosyme 4 mg/ml (ajouter le lysosyme juste avant l'utilisation).
- Resuspendre le culot de bactéries le plus rapidement possible en pipettant plusieurs fois l'échantillon et incubé pendant 5 minutes dans la glace.
- Dénaturer l'ensemble de l'échantillon avec 300 µl de NaOH 0,2 M + SDS 0,1% (ajouter le SDS au NaOH juste avant l'utilisation). Incuber 5 minutes dans la glace.
- Ajouter 150 µl d'acétate de potassium 3 M + acide acétique glacial 10%. Vortexer et incubé 5 minutes dans la glace.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C (Centrifugeuse *Heraeus* Biofuge A).
- Au surnageant, ajouter 400 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1) et mélanger au vortex.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 2 minutes à 4°C (Centrifugeuse *Heraeus* Biofuge A).
- Au surnageant, ajouter 1000 µl d'éthanol et incubé 10 minutes à -70°C.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C (Centrifugeuse *Heraeus* Biofuge A).
- Sécher le culot pendant 10 minutes (Centrifugeuse à vide "Speed-vac") et le resuspendre complètement dans 20 µl de tampon Tris-EDTA pH 8,0 + 5 µg/ml RNase.
- Incuber pendant 60 minutes à 37°C.
- Stocker les échantillons à -20°C avant utilisation.

B. Restriction des plasmides

On effectue la restriction en digérant 1 µg d'ADN plasmidique avec 1 unité de l'enzyme de restriction et 2 µl de tampon de restriction dans un volume total de 20 µl. La restriction est réalisée pendant 1 h 30 à 37°C.

C. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose

Méthode

- Préparer un gel d'agarose 1,2% (ultra pure DNA grade agarose, BioRad, Belgium) dans du tampon TAE (4 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA pH 8) et chauffer jusqu'à obtenir une solution limpide.
- Ajouter le bromure d'éthidium dans le gel à une concentration de 0,25 µg/ml juste avant solidification.
- Couler le gel et attendre son refroidissement.
- Déposer 5 µl d'un mélange contenant 5 volumes d'échantillon et 1 volume de bleu de bromophénol (bleu de bromophénol 0,25%, bleu de xylencyanol 0,25%, glycérol 50%, EDTA 0,1 M, urée 6 M, pH 8,0).
- Faire migrer pendant 1 heure à 80 mA dans du tampon TAE.
- Visualiser les bandes au transilluminateur à une longueur d'onde de 320 nm.

D. Dosage de l'ADN par fluorimétrie

Principe

L'ADN plasmidique est dosé en utilisant un agent intercalant appelé l'HOECHST 33258. Celui-ci va s'intercaler spécifiquement entre les bases A et T de l'ADN. La quantité d'ADN présente est mesurée par un fluorimètre (Hoefler TKO 100).

Méthode

Solutions utilisées

Tampon TNE : Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4

Tampon TNE + HOECHST : 10 µl de la solution HOECHST 33258 (10 mg/ml) par 100 ml de tampon TNE (à tenir à l'obscurité). Cette concentration en HOECHST 33258 permet de doser de 100 à 2000 ng

d'ADN (longueur d'onde d'excitation de 365 nm, longueur d'onde d'émission de 460 nm).

Calibration de l'appareil

- Régler l'appareil sur 000 à l'aide du bouton ZÉRO en présence de 2 ml de tampon TNE + HOECHST 33258.
- Régler l'appareil sur 1000 avec le bouton SCALE en présence de 2 ml de tampon TNE + HOECHST 33258 + 2 µl de la solution stock d'ADN de thymus de veau (1 mg/ml).
- Recommencer trois fois cette opération en nettoyant bien la cuvette avec de l'eau désionisée entre chaque réglage.

Quantification de l'ADN d'un échantillon

- Régler l'appareil sur 000 à l'aide du bouton ZÉRO en présence de 2 ml de tampon TNE + HOECHST 33258.
- Retirer la cuvette de l'appareil et y ajouter 2 µl de l'échantillon à doser. Homogénéiser par inversion.
- Remettre la cuvette dans l'appareil. La valeur indiquée correspond à la concentration en ADN exprimée en ng/µl d'échantillon.

V. Technique relatives à l'ARN

A. Isolement d'ARN total par la méthode du Trizol

Méthode

Préparation des cellules

- Prélever 5 ml de suspension cellulaire dans un tube Falcon de 50 ml.
- Centrifuger à 2500 rpm pendant 10 minutes pour éliminer le maximum de milieu de culture (centrifugeuse BHG Hermle ZK364).
- Éliminer le surnageant et plonger le culot dans l'azote liquide.
- Conserver à -70°C jusqu'à l'extraction proprement dite.

Extraction de l'ARN total

- Ajouter 5 ml de Trizol (Tripure™ Isolation Reagent, Boehringer Mannheim) le plus rapidement possible aux cellules encore gelées.
- Homogénéiser les cellules à l'ultra-turrax (RNase-free) jusqu'à obtenir une solution sans amas cellulaires.
- Laisser reposer l'échantillon pendant 5 minutes dans la glace.
- Ajouter 5 ml de chloroforme et agiter pendant 15 secondes. Laisser reposer pendant 5 minutes à 4°C.
- Centrifuger l'échantillon à 4000 rpm pendant 30 minutes à 4°C (centrifugeuse BHG Hermle ZK364).
- Récolter la phase aqueuse supérieure dans un nouveau tube Falcon de 50 ml.
- Ajouter 15 ml d'isopropanol et incubé à 4°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger l'échantillon à 4000 rpm pendant 30 minutes à 4°C (centrifugeuse BHG Hermle ZK364).
- Retirer le surnageant et laver le culot d'ARN total avec 10 ml d'éthanol 75% en agitant légèrement.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C (centrifugeuse BHG Hermle ZK364).
- Éliminer le surnageant et sécher le culot d'ARN total à l'air libre.
- Resuspendre le culot dans 9 ml d'H₂O RNase-free.
- Ajouter 3 ml de LiCl 8 M et incubé à 4°C pendant une nuit.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 30 minutes à 4°C (centrifugeuse BHG Hermle ZK364).
- Laver le culot d'ARN total en ajoutant 5 ml de LiCl 2 M.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C (centrifugeuse BHG Hermle ZK364).

- Laver le culot avec 5 ml d'éthanol 80% et centrifuger à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C (centrifugeuse BHG Hermle ZK364).
- Resuspendre l'ARN total dans un volume minimal d'eau désionisée RNase-free.

Remarque

En fin de préparation, l'ARN total est dosé au spectrophotomètre en utilisant la formule : $[\text{RNA}] = (A_{260}) \cdot (0,04 \mu\text{g} / \mu\text{l}) \cdot \text{facteur de dilution}$
La qualité de l'ARN isolé est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (TAE).

VI. Techniques relatives à l'analyse d'ARN en dot-blot

A. Marquage de l'ADN par random priming

Principe

Ce type de marquage est basé sur une hybridation entre un mélange de tous les hexanucléotides possibles et l'ADN à marquer (Random Primed DNA Labeling Kit, Boehringer Mannheim Biochemica). Le brin d'ADN complémentaire est alors synthétisé par l'enzyme Klenow à partir de l'extrémité 3'-OH de l'hexanucléotide fixé. Les déoxynucléotides (dGTP, dATP, dTTP et [α^3 25 P] dCTP) présents dans la réaction, vont ainsi être incorporés dans le nouveau brin d'ADN synthétisé.

Méthode

- Dénaturer 100 ng d'ADN linéarisé au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes.
- Refroidir immédiatement l'ADN dans l'eau glacée.
- Ajouter 1 μ l de dGTP, 1 μ l de dATP, 1 μ l de dTTP (0,5 mM/l).
- Ajouter 2 μ l de tampon de réaction avec les hexanucléotides.
- Ajouter 50 μ Ci (5 μ l) d' α^3 25 P] dCTP (3000 Ci/mmmole).
- Compléter avec de l'eau RNase-free pour obtenir un volume total de 19 μ l.
- Ajouter 1 μ l de l'enzyme de Klenow (2 unités/ μ l).
- Incuber 30 minutes à 37°C.
- Stopper la réaction en ajoutant 2 μ l d'EDTA 0,2 M (pH 8,0) puis chauffer à 95°C pendant 10 minutes.
- Refroidir rapidement l'échantillon dans l'eau glacée.

B. Dénaturation de l'ARN total par le Diméthyl Sulfoxide et le glyoxal

Principe

Le glyoxal et le diméthyl sulfoxide (DMSO) servent à dénaturer l'ARN total isolé par la méthode du Trizol. Le glyoxal réagit avec les

acides nucléiques en s'associant à la guanosine, empêchant ainsi la reformation des liaisons G≡C (McMaster et Carmichael, 1977). L'ARN dénaturé se lie plus fortement sur les filtres de nylon et s'hybride aux sondes marquées radioactivement avec une plus grande efficacité.

Méthode

- Dans un Eppendorf stérile, mélanger :
 - 50 µl de glyoxal 6 M
 - 148 µl de DMSO
 - 28 µl de phosphate de sodium 0,1 M (pH 7,0)
 - 50 µl d'ARN (correspondant à 10 µg)

Remarque

La solution de glyoxal doit être désionisée avant utilisation par passage à travers une résine (Bio-Rad AG 501-X8) jusqu'à ce que son pH soit supérieur à 5,0. On peut le stocker à -20°C sous forme de petites aliquotes.

Le phosphate de sodium est préparé en mélangeant 3,9 ml de NaH₂PO₄ 1 M, 6,1 ml de Na₂HPO₄ et 90 ml d'H₂O. Cette solution doit être traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC) et ensuite stérilisée par autoclavage.

- Incuber l'échantillon pendant 60 minutes à 50°C.
- Mettre l'échantillon immédiatement dans la glace pour empêcher une éventuelle renaturation.
- Stocker l'échantillon à -20°C avant utilisation.

C. Préparation des filtres d'hybridation

On dépose 10 µg d'ARN total dénaturé par dot sur les filtres de nylon (Bio-Dot®, Bio-Rad). Les filtres sont séchés pendant 30 minutes à l'air libre puis cuits pendant 15 minutes à 80°C. On les passe enfin sous UV pendant 4 minutes.

D. Hybridation des filtres avec la sonde

1. Pré-hybridation

Les filtres de nylon sont saturés à 65°C pendant 30 minutes dans une solution RNase-free contenant :

- SDS 1%
- NaCl 1 M
- dextran sulfate 10%
- ARNt 100 µg/ml
- polyA 100 µg/ml

ADN de sperme de saumon 100 µg/ml

Cette solution de saturation doit être préalablement chauffée à 95°C pendant 10 minutes.

2. Hybridation

On incube les filtres à 65°C pendant toute une nuit dans la solution de saturation à laquelle on a ajouté le plasmide radiomarqué.

3. Lavage

Les filtres sont lavés 4 fois à 65°C pendant 30 minutes avec du tampon 2x SSC/0,5% SDS, 2 fois à 65°C pendant 30 minutes avec du tampon 0,5x SSC/0,5% SDS et 2 fois à 65°C avec du tampon 0,2x SSC/0,5% SDS.

Les solutions de lavage sont préparés à partir d'un stock de SSC 20x composé de NaCl 3 M et citrate de Na 0,3 M à pH 7,0.

4. Autoradiographie

Les filtres sont exposés durant plusieurs jours à -70°C sur pellicule Kodak en utilisant les écrans à intensification (Hyperscreen™, Amersham)

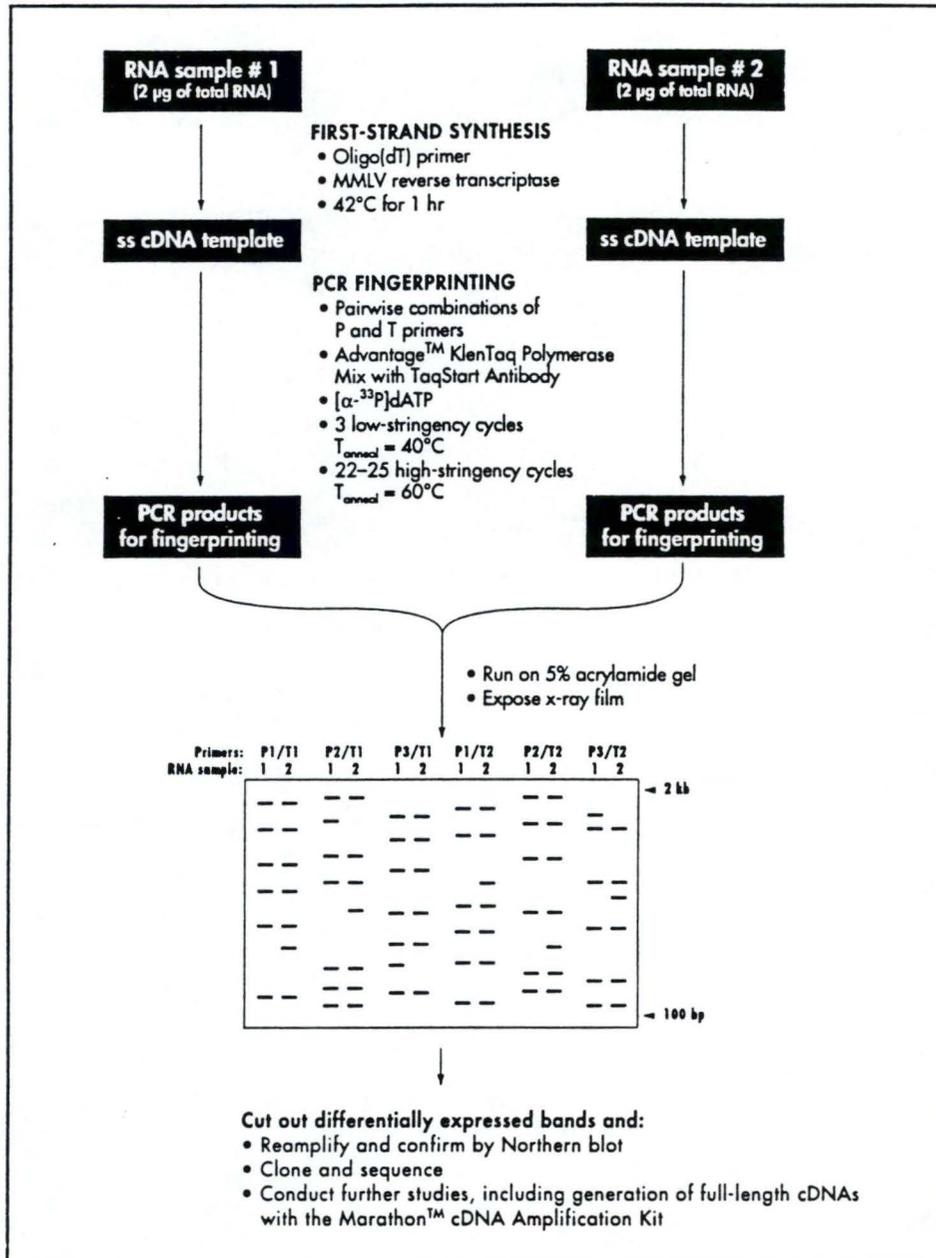


fig. 2.5 : Aperçu général de la méthode du "fingerprinting".

VII. Techniques relatives à l'analyse de l'ARN total par la méthode du "fingerprinting"

Cette méthode permet d'identifier des ARNm dont l'expression est différente dans les cellules stimulées par rapport aux cellules non stimulées. Elle ne requiert que 2 µg d'ARN total (ou de l'ARN messenger) et se décompose en deux étapes : la synthèse d'un premier brin d'ADNc à partir de l'ARN total isolé par la méthode du Trizol et la réaction d'amplification par PCR (fig. 2.5). Quand ils sont examinés sur gel de polyacrylamide suivi d'une autoradiographie, les échantillons d'ADNc produisent des "fingerprints" c-à-d des empreintes caractéristiques de l'ARN de départ (Delta RNA Fingerprinting Kit, Clontech).

A. Synthèse du premier brin d'ADNc

Méthode

- Combiner, dans un tube PCR de 0,5 ml, 2 µg d'ARN total avec 1 µl d'amorce oligo(dT) (1 µM).
- Ajouter de l'eau stérile pour obtenir un volume final de 5 µl.
- Mélanger en pipettant.
- Incuber à 70°C pendant 3 minutes.
- Refroidir immédiatement dans l'eau glacée pendant 2 minutes.
- Mélanger en pipettant.
- Préparer un mélange comprenant :
 - 2 µl de tampon (250 mM Tris (pH 8,3), 30 mM MgCl₂, 375 mM KCl)
 - 2 µl de dNTP (5 mM)
 - 1 µl de transcriptase réverse MMLV (200 unités/µl)
- Ajouter les 5 µl de ce mélange au tube PCR.
- Mélanger le contenu du tube en pipettant doucement.
- Incuber le tube à 42°C pendant une heure.
- Terminer la réaction en mettant les tubes à 75°C pendant 10 minutes.
- Refroidir les tubes dans l'eau glacée.
- Mélanger en pipettant.
- Diluer 10X l'ADNc obtenu dans de l'eau stérile.
- Stocker l'échantillon à -20°C.

PCR primers for RNA fingerprinting

- 10 x 90 μ l Arbitrary primers (20 μ M)

P1: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA-3'
 P2: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGAGG-3'
 P3: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG-3'
 P4: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG-3'
 P5: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG-3'
 P6: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG-3'
 P7: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG-3'
 P8: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG-3'
 P9: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG-3'
 P10: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC-3'

- 9 x 90 μ l Oligo(dT) primers (20 μ M)

T1: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAA-3'
 T2: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAC-3'
 T3: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAG-3'
 T4: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCA-3'
 T5: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCC-3'
 T6: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCG-3'
 T7: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGA-3'
 T8: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGC-3'
 T9: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGG-3'

fig. 2.6 : Séquence des amorces utilisées lors de la réaction PCR

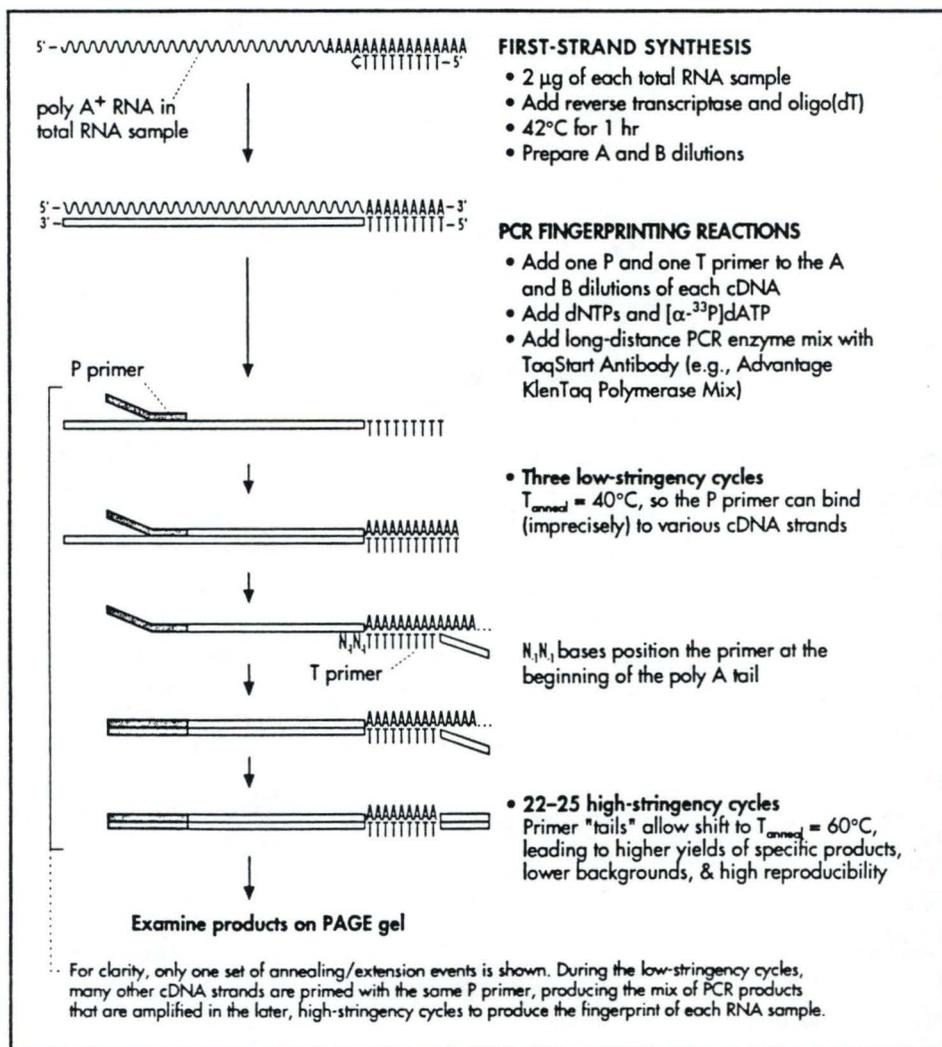


fig. 2.7 : Détails des réactions de synthèse d'ADNc et de PCR. La réaction de PCR utilise une amorce arbitraire P et une amorce oligo(dT).

B. Réaction PCR

Principe

La réaction d'amplification nous permet d'amplifier les séquences d'ADNc en présence de [$\alpha^{33}\text{P}$] dATP (Amersham) et est basée sur l'homologie avec une amorce arbitraire. Les amorces que nous utiliserons pour la réaction PCR sont de deux types : des amorces arbitraires (de 25 nucléotides) que nous appellerons **amorce P** et des amorces oligo(dT) (de 29 nucléotides) que nous appellerons **amorce T** (fig. 2.6). Le programme de PCR comprend trois cycles initiaux de faible stringence (température faible) permettant à l'amorce P de s'hybridiser et d'initier la synthèse d'ADN. L'amorce P se lie à des sites sur beaucoup d'ADNc de façon incomplète. Ces produits de PCR sont ensuite amplifiés (amorce P et amorce T) pendant 22 à 25 cycles de haute stringence (fig. 2.7).

Méthode

- Pour chaque combinaison d'amorce, mettre dans un tube PCR de 0,5 ml :
 - 1 μl d'ADNc dilué
 - 1 μl de l'amorce P (20 μM)
 - 1 μl de l'amorce T (20 μM)
- Préparer un mélange contenant :
 - 2 μl de tampon PCR 10X contenant 15 mM de MgCl_2
 - 14,2 μl d'eau stérile
 - 0,2 μl de dNTP (5 mM)
 - 0,2 μl d' [$\alpha^{33}\text{P}$] dATP (1000-3000 Ci/mmmole)
 - 0,7 μl d'ADN polymérase (3,5 unités/ μl ; ExpandTM High Fidelity PCR System, Boehringer Mannheim)
- Vortexer ce mélange puis l'ajouter au tube PCR.
- Placer le tube dans l'appareil PCR (Programmable Thermal Controller PTC-100 MJ Research, Inc.).
- Commencer le cycle thermique en utilisant le programme suivant :
 - Un cycle de :
 - 94°C pendant 5 minutes,
 - 40°C pendant 5 minutes,
 - 68°C pendant 5 minutes,
 - suivi de 2 cycles de :
 - 94°C pendant 2 minutes,
 - 40°C pendant 5 minutes,
 - 68°C pendant 5 minutes,
 - suivi de 22-25 cycles de :

- 94°C pendant 1 minute,
- 40°C pendant 5 minutes,
- 68°C pendant 5 minutes,
- suivi par 68°C pendant 7 minutes.
- Stocker les tubes contenant le mélange PCR à -20°C.

C. Electrophorèse et autoradiographie

Méthode

- Préparer un gel polyacrylamide 6% (non dénaturant) dans du tampon TBE 1X (10mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM d'EDTA) :
 - 20 ml d'acrylamide/bis-acrylamide 30%
 - 69,3 ml d'eau désionisée
 - 10 ml de TBE 10X
 - 700 µl d'APS 10%
 - 35 µl de Temed
- Couler le gel et attendre sa polymérisation. Le gel a une taille de 31 X 38,5 cm et une épaisseur de 0,4 mm
- Faire une "pré-électrophorèse" à 33 mA pendant 20 minutes dans du tampon TBE 1X.
- Combiner 20 µl du mélange PCR avec 5,7 µl de "bleu" (0,3% de bleu de xylencyanol, 0,3% de bleu de bromophénol, 0,37% d'EDTA à pH 8,0) dans un tube PCR de 0,5 ml.
- Déposer 6 µl de ce mélange par puits.
- Faire migrer à 70 W jusqu'à ce que le bleu de xylencyanol ait migré à travers tout le gel.
- Transférer le gel sur un papier Whatman.
- Sécher le gel à l'air libre pendant toute une nuit.
- Exposer le gel à température ambiante sur un film Kodak sans utiliser d'écrans intensificateurs.

D. Purification des fragments d'ADN

Méthode

- Découper les bandes d'intérêt au niveau de l'autoradiogramme.
- Aligner l'autoradiogramme sur le gel.
- Exciser les bandes différentiellement exprimées du gel en utilisant une lame de rasoir propre.
- Placer ensuite chaque fragment dans un tube PCR de 0,5 ml.
- Ajouter 40 µl de tampon TE (10mM de Tris-HCl à pH 8,0 et 1 mM d'EDTA).

- Additionner 3 gouttes d'huile minérale.
- Chauffer à 100°C pendant 5 minutes.
- Retirer doucement le papier Whatman en laissant un maximum de liquide.
- Stocker l'ADNc élué à -20°C.

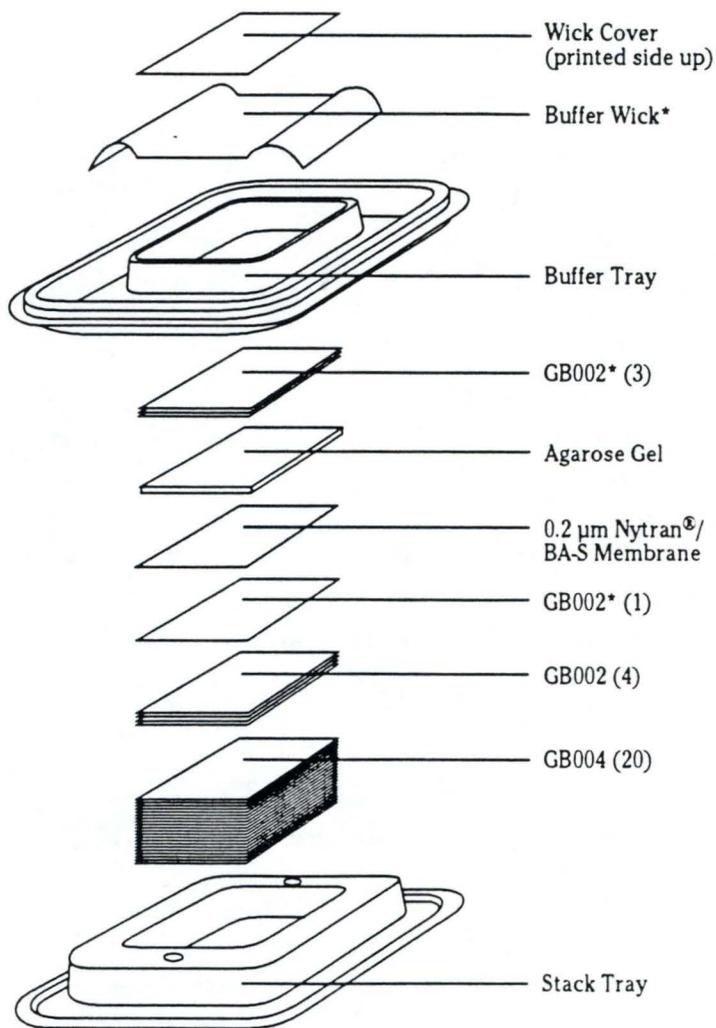
E. Réamplification des bandes d'intérêt

Méthode

- Pour chaque bande, combiner les réactifs suivants dans un tube PCR de 0,5 ml :
 - 7 µl de l'ADNc élué
 - 5 µl de tampon PCR 10X
 - 0,5 µl de dNTP (5 mM)
 - 2,5 µl de l'amorce P (20 µM)
 - 2,5 µl de l'amorce T (20 µM)
 - 0,7 µl d'ADN polymérase (3,5 unités/µl; Expand™ High Fidelity PCR System, Boehringer Mannheim)
 - 31,5 µl d'eau désionisée
- Placer le tube dans l'appareil PCR (Programmable Thermal Controller PTC-100 MJ Research, Inc.).
- Commencer le cycle thermique en utilisant le programme suivant :
 - 20 cycles de :
 - 94°C pendant 1 minute,
 - 60°C pendant 1 minute,
 - 68°C pendant 2 minutes.
- Analyser 10 µl du produit sur un gel d'agarose 2% /EtBr.
- Stocker le matériel restant à -20 °C.

Remarque

La réamplification des bandes différenciellement exprimées utilise les mêmes amorces T et P qu'au départ. Le produit réamplifié peut maintenant être utilisé comme sonde pour une analyse en Northern.



*Prewet in transfer buffer.

fig. 2.8 : Montage de l'appareil servant au transfert des ARNt du gel d'agarose sur la membrane (Turboblotter™, Schleicher et Schuell).

VIII. Techniques relatives au "Northern"

A. Electrophorèse sur gel d'agarose

Méthode

- Dénaturer l'ARN total par la méthode du glyoxal et DMSO (voir p. 42).
- Laver la cuve à électrophorèse avec du NaOH 1 M et la rincer à l'eau DEPC.
- Préparer un gel d'agarose 1,5% dans du tampon TAE (120 mM Tris, 60 mM acétate et 3 mM d'EDTA à pH 7,0).
- Déposer un mélange comprenant 10 µg d'ARN total dénaturé et 17,5 µl de "bleu" (Ficoll 5% dans le tampon TAE à pH 7,0).
- Faire migrer l'ARN total pendant 2 heures à 90 mA en faisant circuler constamment le tampon TAE.

B. Transfert du gel sur membrane

Méthode

- Nettoyer l'appareil (Turboblotter™, Schleicher et Schuell) avec du NaOH 1 M et rincer avec de l'eau DEPC.
- Tremper la membrane (S&S Maximum Strength Nytran® 0,2 µm) dans de l'eau désionisée pendant 15 minutes.
- Monter l'appareil (fig. 2.8) et y déposer la membrane.
- Couvrir la membrane avec le gel d'agarose en s'assurant qu'il n'y a pas de bulles entre les deux.
- Refermer l'appareil et remplir le puits avec du tampon de transfert (3 M NaCl et 8 mM NaOH).
- Transférer pendant 2 heures.
- Retirer doucement la membrane et la placer pendant 5 minutes dans un tampon de neutralisation 0,2 M Phosphate à pH 6,8 (stock 5X : 79,25 g de Na₂HPO₄ et 60,25 g de NaH₂PO₄ dans 1 l d'H₂O).
- Sécher la membrane sur du papier Whatman pendant 30 minutes à 80°C puis au transilluminateur (320 nm) pendant 4 minutes.
- Stocker la membrane à 4°C.

C. Marquage de l'ADN à la biotine

Principe

L'incorporation de la biotine dans les sondes d'hybridation se fait via une réaction dite de "random priming". Des octamères aléatoires biotinylés sont utilisés pour initier la synthèse d'ADN *in vitro* à partir d'ADN double-brin dénaturé. Le dUTP biotinylé est incorporé pendant la réaction d'extension. La sonde résultante est hautement biotinylée et donc permet une détection d'une grande sensibilité (NEBlot Phototope Random Primer Biotin Labeling Kit 6K, Biolabs).

Méthode

- Diluer 100 ng d'ADN dans l'eau stérile pour obtenir un volume total de 34 μ l.
- Dénaturer l'ADN dans l'eau bouillante pendant 5 minutes.
- Mettre rapidement l'ADN dans l'eau glacée pendant 5 minutes.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C (centrifugeuse *Heraeus Biofuge A*).
- Ajouter dans l'ordre :
 - 10 μ l de labelling mix 5X contenant les octamères biotinylés
 - 5 μ l de dNTP mix contenant les dNTPs (1 mM) et le Bio-dATP (1 mM)
 - 1 μ l d'ADN polymérase Klenow (5 unités/ μ l)
- Incuber à 37°C pendant 1 heure.
- Ajouter 5 μ l d'EDTA 0,2 M à pH 8,0.
- Précipiter la sonde en ajoutant 5 μ l de LiCl 4 M et 150 μ l d'éthanol. Incuber à -70°C pendant 30 minutes.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C (centrifugeuse *Heraeus Biofuge A*).
- Retirer le surnageant et laver le culot avec 70% d'éthanol.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C (centrifugeuse *Heraeus Biofuge A*).
- Resuspendre le culot dans 80 μ l de tampon de resuspension (10 mM Tris-HCl, 1 mM d'EDTA à pH 8,0).
- Stocker la sonde à -20°C.

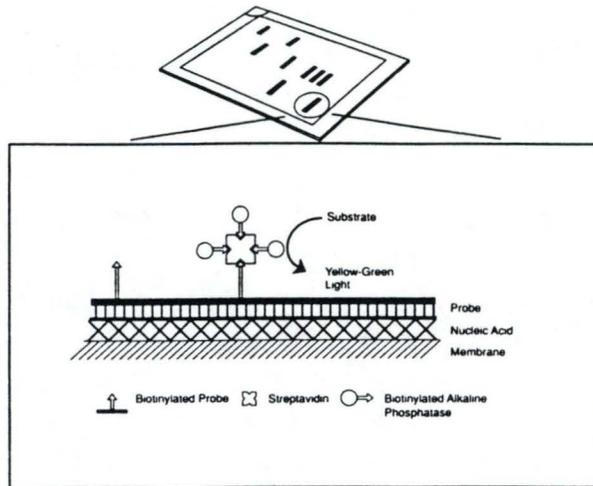


fig. 2.9 : Après l'hybridation de la sonde avec l'ADN cible fixé sur membrane, la réaction de chimiluminescence est initiée. La streptavidine et la phosphatase alcaline biotinyllée sont séquentiellement liées à la sonde. Le Luminogène-PPD est ajouté. Sa déphosphorylation provoque une émission de lumière.

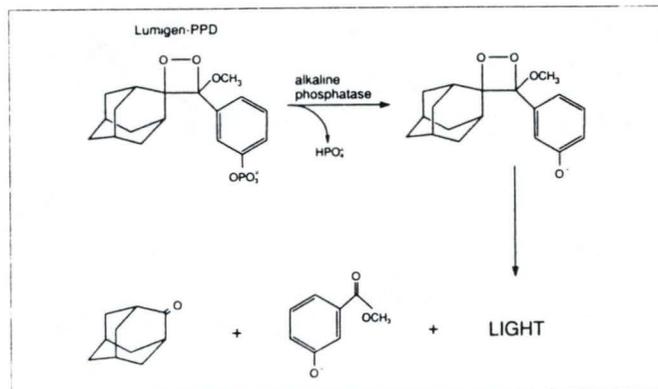


fig. 2.10 : La phosphatase alcaline clive un groupement phosphate du substrat, le Lumigène-PPD ce qui provoque une émission de lumière.

D. Hybridation

Méthode

- Mettre la membrane dans un sac d'hybridation.
- Préparer une solution de préhybridation contenant :
 - 0,25 M Phosphate de Na à pH 7,4
 - 7% SDS
 - 1 mM EDTA
 - 1% BSA

Remarque

La solution de 0,25 M Phosphate de Na à pH 7,4 est réalisée à partir de 2,26 ml Na_2HPO_4 1 M et 7,74 ml NaH_2PO_4 1 M.

- Pré-hybrider la membrane avec 2 ml cette solution pendant 1 heure à 65°C.
- Dénaturer la sonde biotinylée en la mettant 5 minutes dans l'eau à 100°C et puis immédiatement 5 minutes dans la glace.
- Ajouter 40 μl de la sonde biotinylée et incuber la membrane toute la nuit à 65°C.
- Laver la membrane pendant 5 minutes à température ambiante dans une solution 2X SSC/0,1% SDS.
- Recommencer une deuxième fois cette opération.
- Laver la membrane pendant 20 minutes à 65°C dans une solution 1X SSC/ 0,1% SDS.
- Recommencer une deuxième fois cette opération.
- Placer la membrane dans un sac d'hybridation.

E. Détection

Principe

La détection est basée sur la liaison entre la sonde biotinylée et la phosphatase alcaline à travers à un pont streptavidine. La phosphatase alcaline clive alors le substrat (le Lumigène-PPD) (fig. 2.9). Le Lumigène-PPD est déstabilisé par la déphosphorylation et décomposé en émettant localement de la lumière (fig. 2.10). Cette lumière est alors capturée sur un film Kodak (NEBlot Phototope Detection Kit 6K, Biolabs).

Méthode

1. Etape de saturation

- Préparer une solution de Blocking contenant 5% SDS et 25 mM de phosphate à pH 7,2 (17 mM Na₂HPO₄, 8 mM NaH₂PO₄).
- Ajouter dans le sac d'hybridation, 0,1 ml de solution de Blocking par cm² de membrane.
- Incuber pendant 5 minutes à température ambiante (sous légère agitation).
- Retirer la solution avant l'étape suivante.

2. Incubation à la Streptavidine

- Ajouter 0,05 ml de streptavidine par cm² de membrane (concentration finale de 1 µg/ml).
- Incuber pendant 5 minutes à température ambiante (sous légère agitation).
- Retirer la solution avant l'étape suivante.

3. Premier lavage

- Préparer une solution de lavage contenant 0,5% SDS, 2,5 mM phosphate, pH 7,2 (1,7 mM Na₂HPO₄ et 0,8 mM Na H₂PO₄).
- Laver pendant 5 minutes à température ambiante, avec 0,5 ml de cette solution par cm² de membrane (sous légère agitation).
- Refaire cette opération une deuxième fois.
- Retirer la solution avant l'étape suivante.

4. Incubation avec la phosphatase alcaline biotinylée

- Ajouter la phosphatase alcaline biotinylée (concentration finale de 0,5 µg/ml).
- Incuber pendant 5 minutes à température ambiante (sous légère agitation).
- Retirer la solution avant l'étape suivante.

5. Second lavage

- Préparer une solution de lavage contenant 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl et 10 mM MgCl₂ à pH 9,5.
- Laver pendant 5 minutes à température ambiante avec 0,5 ml de cette solution par cm² de membrane (sous légère agitation).
- Refaire cette opération une deuxième fois.

- Retirer la solution avant l'étape suivante.

6. Détection de l'ADN

- Préparer une solution de Lumigène-PPD 1X (solution stock 100X) dans le diluant approprié (DEA 1 M, MgCl₂ 1 mM à pH 9,6).
- Incuber pendant 5 minutes à température ambiante (sous légère agitation) en présence de 0,025 ml de Lumigen PPD 1X par cm² de membrane.
- Retirer tout le liquide et sceller le sac.

7. Autoradiographie

La chémilunescence commence immédiatement pour atteindre un maximum après 0,5-2 heures. Elle reste ensuite constante pendant plusieurs jours. Nous attendons donc pendant 30 minutes avant d'exposer le filtre sur une pellicule Kodak (voir p. 17)

IX. Techniques relatives à l'étude des flux ioniques en imagerie de fluorescence

A. Isolement de protoplastes de *Nicotiana tabacum*

Principe

Les protoplastes sont des cellules végétales dépourvues de parois végétales. Dans le cas des cellules de tabac, la paroi végétale est dégradée par l'action de diverses enzymes : la drisérase, le macérozyme (pectinase) et la cellulase (D. A Evans *et al.*, 1983). Sans paroi végétale, les protoplastes éclatent rapidement. Il faut donc veiller à maintenir une pression osmotique suffisante dans le milieu de culture pour éviter un déséquilibre lytique fatal.

Méthode

Composition de la solution enzymatique

- 4,708 g/l de sels de Murashige et Skoog
- 30 g/l de sucrose
- 100 g/l de mannitol
- 20 g/l de cellulase Onozuka RS
- 10 g/l de macérozyme R10
- 10 g/l de drisérase
- 1 mg/l de 2,4-D (pH 5,6)

Cette solution enzymatique est filtrée sur une membrane stérilisante millipore de 0,2 μm .

- Prélever stérilement 10 ml de suspension cellulaire âgée de 6 jours et les centrifuger à 400 rpm pendant 5 minutes dans un tube Falcon de 50 ml (centrifugeuse BHG Hermle ZK364).
- Enlever le surnageant et ajouter 10 ml de la solution enzymatique stérile.
- Incuber les cellules à l'obscurité pendant une nuit à 25°C, sous légère agitation.
- Filtrer la suspension de protoplastes sur une membrane de 80 μm pour éliminer les amas de cellules non digérées par les enzymes et ne garder que les protoplastes. Il s'agit d'une étape dite de purification selon la taille.

- Récupérer les protoplastes par centrifugation à 400 rpm pendant 5 minutes à température ambiante (centrifugeuse BHG Hermle ZK364).
- Eliminer le surnageant et resuspendre dans 10 ml d'une solution de sucrose 0,4 M. Ce milieu de flottaison nous permet de séparer les protoplastes des débris pariétaux. C'est une étape de purification selon la densité.
- Verser les protoplastes dans un tube Falcon de 15 ml et centrifuger pendant 5 minutes à 400 rpm (centrifugeuse BHG Hermle ZK364).
- Récolter les protoplastes qui flottent à la surface avec une pipette Pasteur et les mettre dans un nouveau tube Falcon de 15 ml.
- Resuspendre les protoplastes dans 10 ml de milieu MS/mannitol sans enzymes et les laver par centrifugation à 400 rpm (centrifugeuse BHG Hermle ZK364) pendant 5 minutes à température ambiante.
- Recommencer 2 fois cette dernière opération.

B. Chargement des sondes fluorescentes.

L'ajout de la sonde fluorescente se fait sur des protoplastes fraîchement préparés que nous avons laissé reposer pendant 2 heures à température ambiante pour qu'ils retrouvent leur sensibilité aux fragments pectiques et donc leur capacité de répondre aux éliciteurs.

Incorporation de la sonde SNARF-1/AM.

Cette sonde estérifiée est capable de rentrer par simple diffusion à travers la membrane cytosolique. Les estérases présentes dans la cellule vont la désestérifier et lui rendre sa propriété de fluorescence en l'empêchant de quitter le cytosol.

- Resuspendre les protoplastes dans un volume total de 20 ml de milieu MS/mannitol.
- Ajouter 5 μ l de sonde SNARF-1/AM, ce qui correspond à 425 nM.
- Incuber à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.
- Centrifuger les protoplastes à 400 rpm (centrifugeuse BHG Hermle ZK364) pendant 3 minutes.
- Eliminer le surnageant et ajouter 5 ml de milieu MS/mannitol.
- Recommencer 3 fois l'opération de lavage et enfin ajouter 5 ml de milieu MS/mannitol.

Incorporation de la sonde Indo-1

L'Indo-1 est une sonde désestérifiée qui est chargée dans les protoplastes par électroporation (perméabilisation artificielle de la membrane).

- Mettre 800 μ l de protoplastes dans une cuvette d'électroporation de 0,4 cm avec 50 μ l de sonde Indo-1, ce qui correspond à 83 μ M.
- Au moyen d'un électroporateur Gene pulser (Bio-Rad, Brussels, Belgium), perméabiliser les protoplastes par une décharge électrique de 1250 Volt/cm et avec une capacitance de 0,25 μ F.
- Laisser ensuite reposer les protoplastes pendant 2 heures à l'obscurité et à température ambiante.
- Eliminer l'excédent de sonde par 3 lavages dans le milieu MS/mannitol.

Remarque

La sonde Indo-1 peut aussi être incorporées par diffusion en milieu acide en utilisant du milieu MS/mannitol à pH 4,5. Durant notre travail, l'incorporation de cette sonde dans le cytoplasme des protoplastes de tabac s'est faite exclusivement par électroporation.

Les concentrations en sondes ont été définies de manière à obtenir un chargement optimal des protoplastes pour avoir une bonne image de fluorescence.

C. Méthode d'élicitation des protoplastes (ou cellules)

Les protoplastes sont resuspendus dans du milieu MS/mannitol contenant de 0,5 mM en CaCl_2 et de 150 mM en NaCl. Ces concentrations en sels permettent aux oligogalacturonides d'adopter une conformation tri-dimensionnelle responsable de leur activité biologique.

Les oligogalacturonides sont ajoutés ensuite aux protoplastes à la concentration finale désirée. Le mélange est déposé entre deux lamelles sous le microscope. On laisse les protoplastes sédimenter puis on commence la procédure d'acquisition d'images. Avec cette méthode, il n'est pas possible d'obtenir un véritable "temps 0". Cela ne pose pas de problème majeur car les cellules végétales répondent généralement avec lenteur à l'élicitation.

D. Mesure des intensités de fluorescence émises par les sondes

Principe

Les sondes fluorescentes que nous utilisons (Indo-1 et SNARF-1/AM) sont ce qu'on appelle des sondes à "ratio". Il s'agit de sondes à simple excitation et double émission. La sonde Indo-1, par exemple,

Intensité de l'émission
(unités relatives)

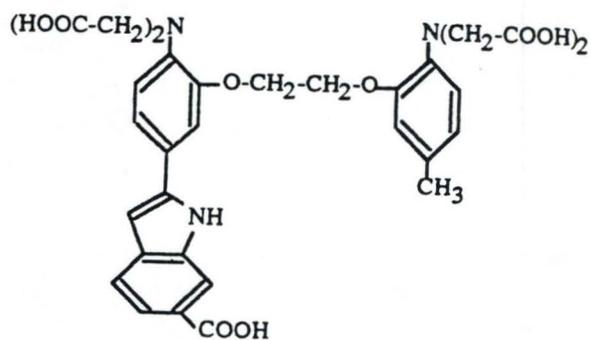
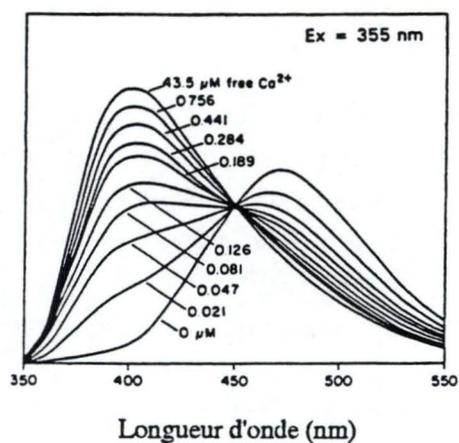


fig. 2.11 : Structure et spectre d'émission de l'Indo-1.

Intensité de l'émission
(unités relatives)

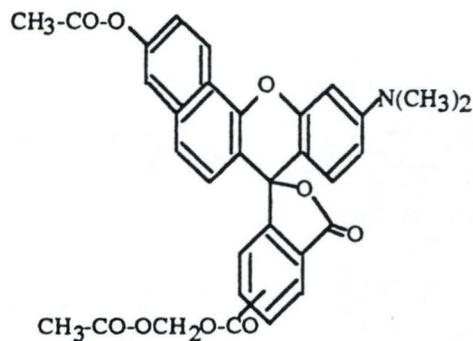
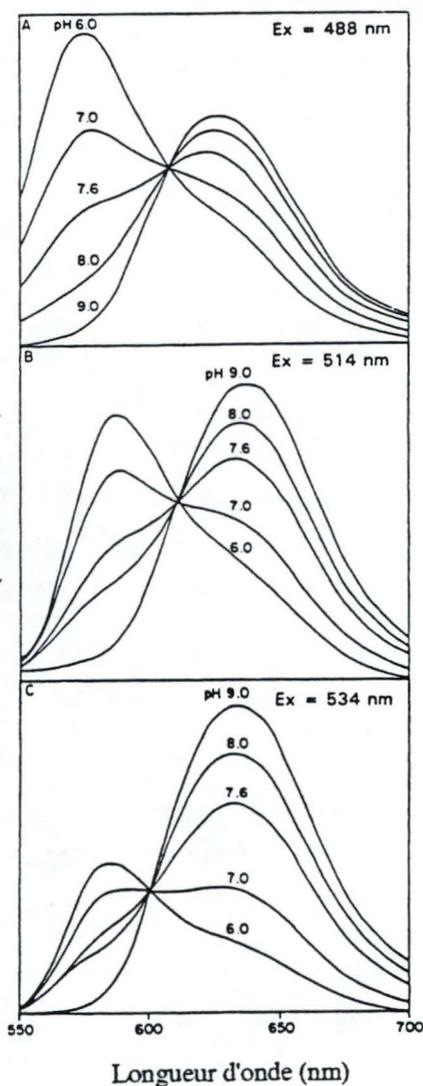


fig. 2.12 : Structure et spectre d'émission du SNARF-1/AM.

lorsqu'elle est excitée à 355 nm, émet de la fluorescence à une longueur d'onde de 488 nm en absence de calcium (fig. 2.11).

L'Indo-1 est capable de se lier au calcium libre avec une certaine spécificité. Cette liaison change le spectre d'émission de la sonde vers les longueurs d'onde plus faibles (405 nm). Un accroissement en calcium cytosolique provoque une augmentation de la fluorescence émise à 405 nm en diminuant celle à 488 nm.

Pour connaître la concentration en calcium, on mesure en même temps la fluorescence émise par la sonde à 405 nm et à 488 nm. Le rapport des 2 intensités (405 nm/488 nm) est proportionnel à la quantité en calcium libre dans le cytosol. Ce ratio est converti en activité en calcium au moyen d'une droite de calibration établie avec un tampon EGTA-Ca²⁺.

Le principal avantage des sondes "ratio" est que les mesures faites sont indépendantes de la concentration en sonde dans les cellules. On ne se souciera donc pas des phénomènes de dégradation par les UV et de déchargement de la sonde (Wahl *et al.*, 1990).

Pour la sonde SNARF-1/AM, c'est exactement le même principe mais avec une longueur d'onde d'excitation de 514 nm, un maximum d'émission à 580 nm lorsque le pH est acide et un maximum d'émission à 640 nm en milieu plus basique (fig. 2.12). Le ratio correspond au rapport d'intensité à 580/640 nm et est d'autant plus élevée que le pH est acide.

Méthode

Pour mesurer les différences d'intensités de fluorescence, nous avons besoin d'un microscope à fluorescence inversé (Nikon TMD, objectif CF fluor 40 X), d'une caméra (CCD ISIS-M) et d'un logiciel informatique d'analyse d'image (fig. 2.13). Une lampe à xénon (100 W) montée en épifluorescence nous fournit toute une gamme de lumière blanche et UV.

Les protoplastes ayant incorporé la sonde doivent d'abord être excités à la longueur d'onde donnée. Pour cela, on utilise un changeur de filtres (*Lambda 10, Sutter Instruments Novato, USA*) qui sélectionne le filtre d'excitation adéquat. Ce changeur de filtres peut accueillir 10 filtres (diamètre 25 mm, épaisseur 7,2 mm). La lumière émise est réfléchiée par le miroir dichroïque spécifique de la sonde avant d'arriver sur l'échantillon. La sonde excitée émet de la lumière de longueur d'onde variable. Le miroir dichroïque et les filtres

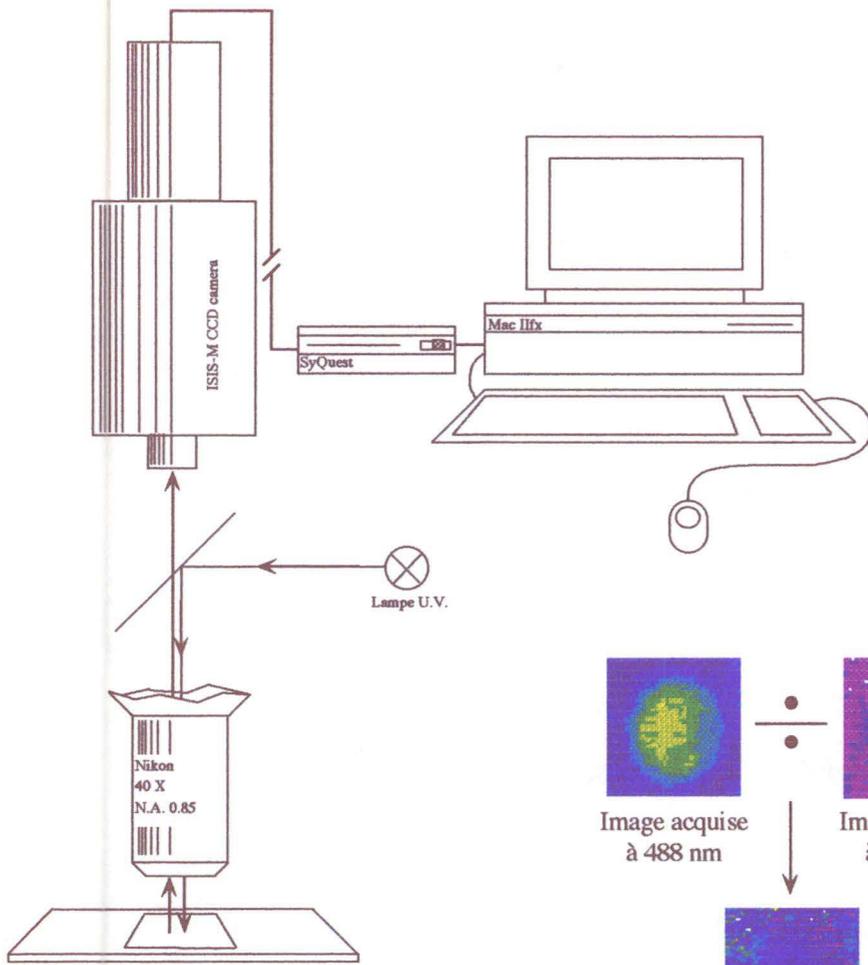


fig. 2.13 : Dispositif d'imagerie de fluorescence.

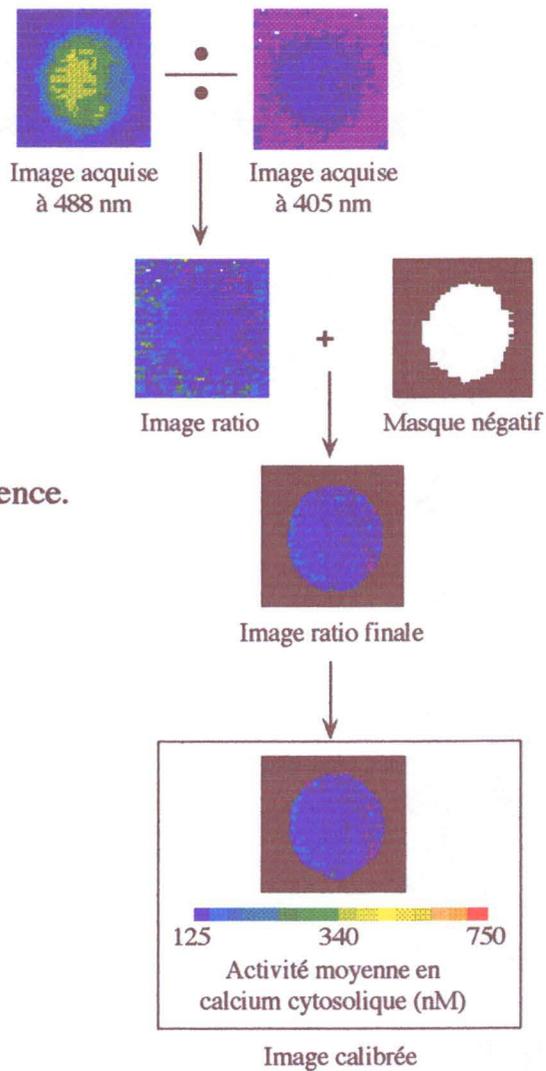


fig. 2.14 : Schéma du calcul de l'image "ratio" pour l'analyse du calcium libre cytosolique. L'image prise à 405 nm est divisée, point par point, par celle acquise à 488 nm. De l'image "ratio" résultante, on retire le bruit de fond en utilisant un masque négatif. Finalement, l'image est calibrée.

d'émission permettent alors la sélection des longueurs d'ondes d'émission.

Une caméra enregistre l'image de fluorescence émise à chaque maximum d'émission. Ces images sont ensuite numérisées, traduites en 255 niveaux de gris et stockées sur disque dur.

Un logiciel d'analyse d'images (Image 1.41 v.3) nous permet par la suite de calculer l'image ratio en divisant point par point les images prises aux 2 longueurs d'onde d'émission de la sonde (fig. 2.14).

L'image ratio est finalement calibrée pour obtenir une cartographie de la distribution de l'ion étudié (proton ou calcium) à l'intérieur de la cellule. Pour la calibration des protoplastes chargés à l'Indo-1, des tampons EGTA-Ca sont utilisés. Pour la calibration de la sonde SNARF-1/AM, ce sont des tampons K_2HPO_4/KH_2PO_4 à différents pH (fig. 2.15).

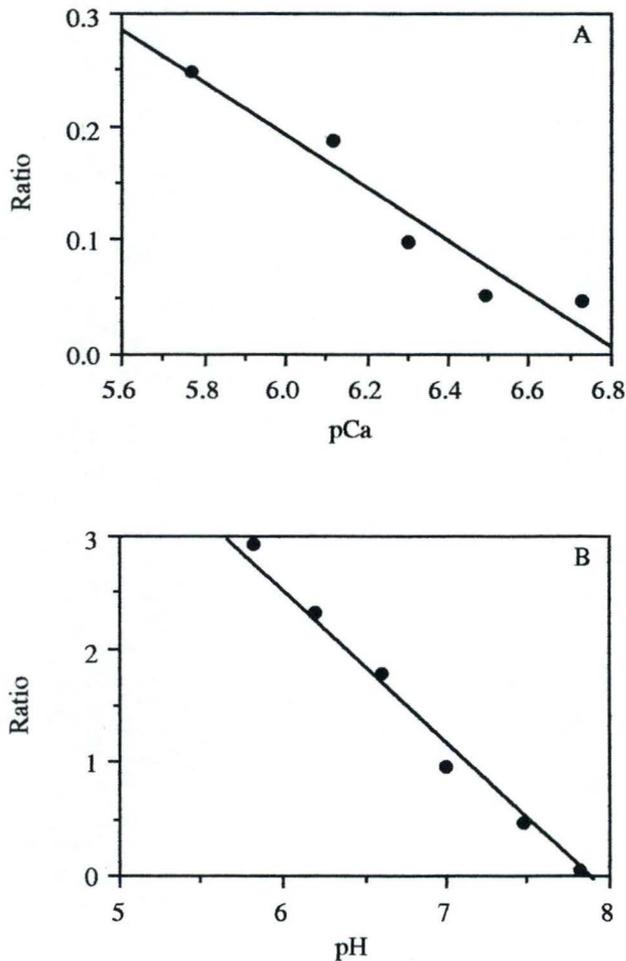


fig. 2.15 : Droite de calibration des sondes SNARF-1/AM et Indo-1.

Résultats

et

discussion

I. Modèle simple de l'interaction "hôte-pathogène"

L'interaction entre une plante et un agent pathogène (insectes, champignons ou bactéries) est un phénomène très complexe. Pour rendre compte de cette interaction au niveau expérimental, un modèle simple est nécessaire.

A. Le choix de la plante-hôte

Pour toutes les études faites au cours de ce travail, nous avons choisi le tabac (*Nicotiana tabacum*) comme plante-hôte. Plusieurs raisons motivent ce choix. Le tabac est une plante qui a déjà été employée dans la littérature pour l'étude des effets de l'élicitation (Mathieu *et al.*, 1992 ; Marfa *et al.*, 1991). Il constitue un modèle génétique important chez les végétaux supérieurs : le tabac se laisse aisément transformer. En outre, une souche de cellules de tabac particulièrement commune dans la littérature (BY-2) était immédiatement disponible au laboratoire.

Les cellules de tabac utilisées sont maintenues sous forme de culture en suspension. Une culture en suspension est un ensemble de cellules non organisées et plus ou moins individualisées les unes des autres. En vue de l'étude de l'élicitation, l'utilisation de cultures en suspension de cellules végétales offre de grands avantages, dont une manipulation aisée et un cycle de repiquage rapide (tous les 7 jours). Elle permet surtout un traitement simultané en milieu liquide de toutes les cellules constituant la suspension, ce qui est impossible à obtenir en employant des plantes entières ou des tissus.

Dans les manipulations qui vont suivre, nous allons toujours utiliser des cellules en suspension âgées de 6 jours. Il a, en effet, été montré au laboratoire (Messiaen, 1994) et par d'autres équipes que la réponse des cellules dépendait de leur âge. Chez la carotte par exemple, l'activation de la PAL en présence de fragments pectiques est maximale 6 jours après repiquage. Cette même dépendance de l'âge des cultures a été observée chez le tabac.

B. Le choix de l'éliciteur

Lorsqu'un pathogène attaque une plante, il agit le plus souvent en sécrétant des enzymes hydrolytiques qui dégradent la paroi protectrice de la cellule. Cette dégradation provoque notamment le relarguage de fragments pectiques. Ces fragments sont parmi les premières molécules libérées lors de l'attaque du pathogène.

De nombreux travaux montrent que parmi les fragments pectiques, les oligogalacturonides sont des éliciteurs endogènes qui déclenchent une série de réponses chez la plante (Introduction, tableau 1 et 2). Rappelons toutefois que deux conditions doivent être remplies pour permettre la reconnaissance et l'induction de défense par la plante (Messiaen *et al.*, 1994). Seuls des oligogalacturonides de degré de polymérisation (DP) ≥ 9 et ayant adopté une conformation supramoléculaire induite par le calcium (structure en "egg-box") sont capables de jouer un rôle éliciteur.

Le modèle simplifié que nous avons par conséquent choisi pour simuler l'interaction "hôte-pathogène" est défini comme l'interaction entre les cellules en suspension de *Nicotiana tabacum* et des éliciteurs pectiques (oligogalacturonides de DP ≥ 9 ayant adopté une conformation induite par le calcium).

II. Etude de flux ioniques induits par les oligogalacturonides

A. Introduction

La transduction du signal qui résulte de la reconnaissance des oligogalacturonides pectiques par des cellules de tabac est envisagée ici du point de vue des variations de flux ioniques.

Divers paramètres peuvent être étudiés : Ca^{2+} , K^+ , pH cytosolique et potentiel de membrane. Dans le cadre de ce travail, nous étudierons principalement les variations de l'activité en calcium cytosolique et celles du pH cytosolique. Trois grandes méthodes permettent d'étudier de telles variations : les microélectrodes, la résonance magnétique nucléaire et l'utilisation de sondes fluorescentes.

* les microélectrodes permettent une analyse du pH ou des flux calciques avec une bonne résolution, mais présentent pourtant l'inconvénient de blesser la cellule lors de leur introduction générant ainsi des réponses parasites. Chez les cellules végétales, le cytoplasme est difficile d'accès car il se situe en périphérie de la cellule dont la majeure partie est occupée par la vacuole.

* la résonance magnétique nucléaire (RMN) permet l'étude du pH dans une population de cellules, mais n'est pas adaptée à la mesure de flux dans une cellule isolée.

* les sondes fluorescentes sont de plus en plus utilisées pour l'étude des flux ioniques à l'échelle de la cellule. Pour chaque type de flux ionique, il existe une série de sondes disponibles commercialement (sondes Ca^{2+} , pH, K^+ ,...).

Nous avons opté pour cette dernière technique dans le cadre de ce mémoire. Nous utiliserons les sondes Indo-1 pour le calcium et SNARF-I/AM pour l'analyse du pH. Rappelons que ces sondes fluorescentes sont des sondes "ratio" (Matériel et méthodes, p. 50). Leur principal avantage est que les mesures faites sont indépendantes de leur concentration intracellulaire. Dès lors, on ne se souciera pas des phénomènes de dégradation par les UV, de déchargement de la sonde, d'épaisseur de la cellule...

Pour quantifier la fluorescence émise par les sondes, nous utiliserons les techniques mises au point au laboratoire. Celles-ci sont basées sur l'imagerie de fluorescence (microscope à fluorescence couplé à une caméra) et l'analyse d'images par ordinateur (Matériel et méthodes, p.51).

B. Modèle utilisé pour l'étude des flux ioniques

L'étude des flux ioniques a été réalisée sur des cellules végétales dépourvues de paroi (protoplastes). L'absence de paroi facilite ainsi la pénétration des sondes fluorescentes dans le cytosol et permet aussi d'éviter les effets parasites liés à la paroi.

Les protoplastes constituent un système efficace pour étudier la transduction du signal. En effet, bien que dépossédés de leur paroi, ils ont toujours la capacité d'être activés et de répondre aux facteurs extérieurs notamment en synthétisant des phytoalexines (Dangl *et al.*, 1987).

Dans le cas des protoplastes de tabac, nous avons observé une désensibilisation passagère suite à la préparation des protoplastes. Il suffit cependant de laisser les protoplastes reposer pendant deux heures pour restaurer leur capacité de reconnaître et de répondre aux éliciteurs pectiques.

Suite aux études déjà réalisées au laboratoire, nous avons employé pour l'élicitation, des oligogalacturonides à une concentration finale de 0,2 mg/ml. Cette concentration en éliciteur a été déterminée pour l'analyse des flux ioniques dans le système carotte (Messiaen *et al.*, 1994), mais nous verrons par la suite qu'elle est suffisante pour induire des réponses chez les cellules de tabac.

Avec ce modèle, nous avons dans un premier temps analysé les variations du pH cytosolique suite à l'élicitation. Ensuite, nous avons examiné l'activité en calcium libre cytosolique après ajout des mêmes éliciteurs pectiques. Enfin, nous avons utilisé des modulateurs pour tenter d'identifier quelques-uns des éléments-clés de la voie de transduction du signal activée par la présence d'oligogalacturonides pectiques.

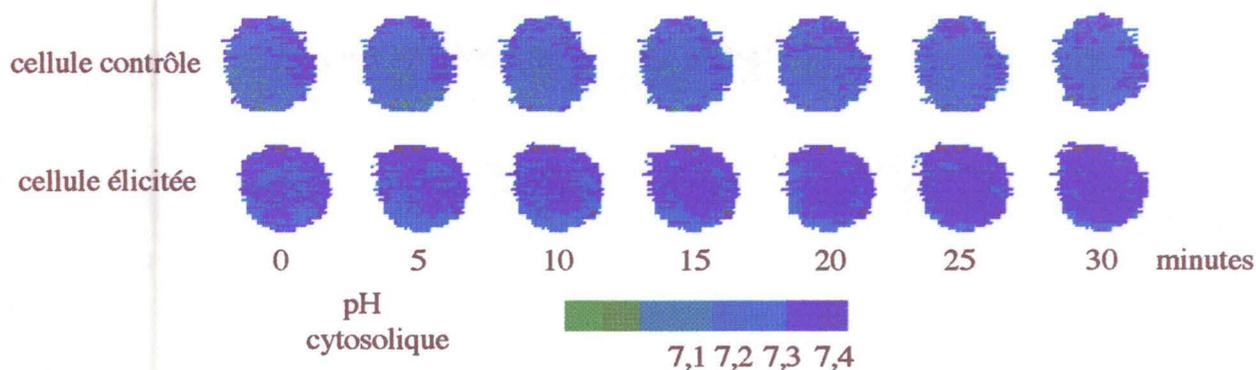


fig. 3.1.a : Evolution du pH cytosolique de protoplastes de *Nicotiana tabacum* chargés au SNARF-1/AM (425 nM). Les oligogalacturonides ont été testés à une concentration finale de 0,2 mg/ml dans une conformation induite par le calcium.

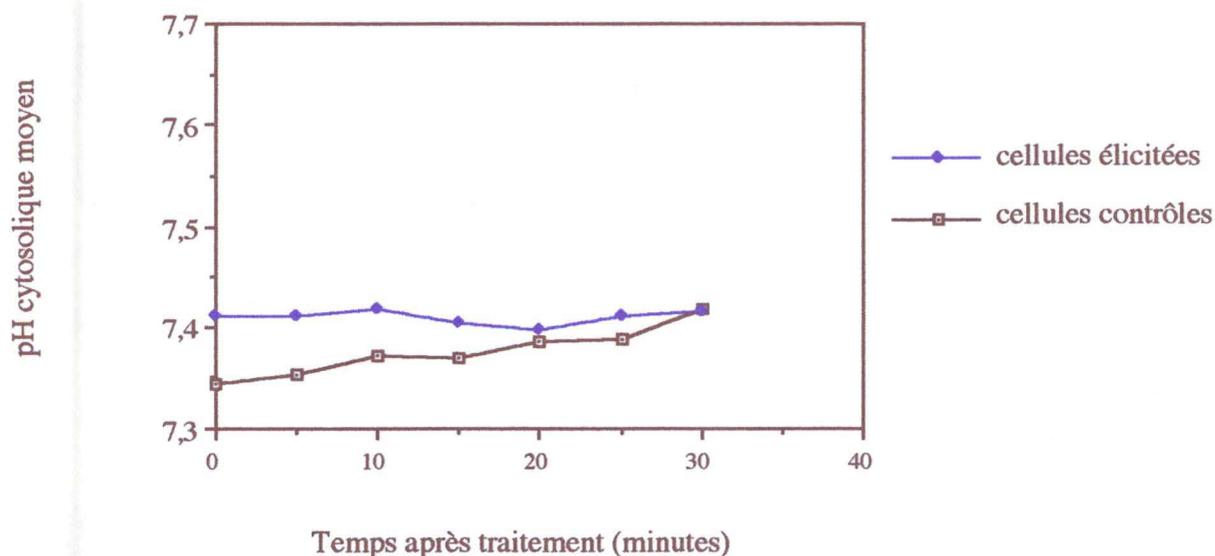


fig. 3.1.b : Effet des oligogalacturonides sur le pH cytosolique moyen de protoplastes de *Nicotiana tabacum* chargés au SNARF-1/AM (425 nM). Les oligogalacturonides ont été ajoutés à une concentration finale de 0,2 mg/ml dans une conformation induite par le calcium. Chaque point du graphe correspond à la moyenne de l'activité en calcium cytosolique de 20 protoplastes.

C. Analyse du pH cytosolique

La sonde fluorescente utilisée pour analyser le pH cytosolique est le SNARF-1/AM. Cette sonde est estérifiée. Son incorporation dans les protoplastes se fait par simple diffusion à travers la membrane plasmique. Des estérases cellulaires se chargent ensuite de la rendre incapable de quitter le cytosol (Matériel et méthodes, p. 50).

Le premier problème à résoudre a été de définir la quantité de sonde suffisante pour charger les protoplastes et rendre compte de leur pH. Nous avons constaté que des concentrations en SNARF-1/AM < 340 nM étaient trop faibles pour être détectées efficacement en imagerie de fluorescence. Par contre, les doses > 640 nM étaient, elles, responsables d'une saturation de la caméra utilisée pour l'acquisition des images. Nous avons finalement dû opter pour une concentration en SNARF-1/AM de 425 nM pour avoir une bonne estimation du pH cytosolique chez *Nicotiana tabacum*.

1. Mesure du pH cytosolique des protoplastes

a) protoplastes contrôles

Le pH cytosolique des protoplastes a été analysé en imagerie de fluorescence pendant 30 minutes à raison d'une acquisition d'images toutes les 5 minutes (fig. 3.1.a). Un total de 15 protoplastes a été étudié.

Le pH cytosolique moyen des protoplastes de tabac au repos est de 7,35 (fig. 3.1.b). A l'intérieur d'une même population, le pH cytosolique des protoplastes est relativement peu variable (0,05 unité de pH). De légères différences sont cependant observées d'une population à l'autre (0,1 unité de pH).

b) protoplastes élicités par les oligogalacturonides

Les protoplastes chargés avec la sonde ont été mis en présence de 0,2 mg/ml d'oligogalacturonides dans une conformation induite par le calcium (fig. 3.1.a). Un nombre de 15 protoplastes élicités a été analysé en microscopie à fluorescence. Une acquisition d'images est réalisée toutes les 5 minutes (fig. 3.1.b)

Le pH cytosolique varie peu en présence de l'éliciteur. Une légère alcalinisation du cytosol (0,2 unité de pH) a cependant été observée dans 28% des protoplastes analysés. Nous pouvons donc conclure raisonnablement, qu'en moyenne, les oligogalacturonides ne

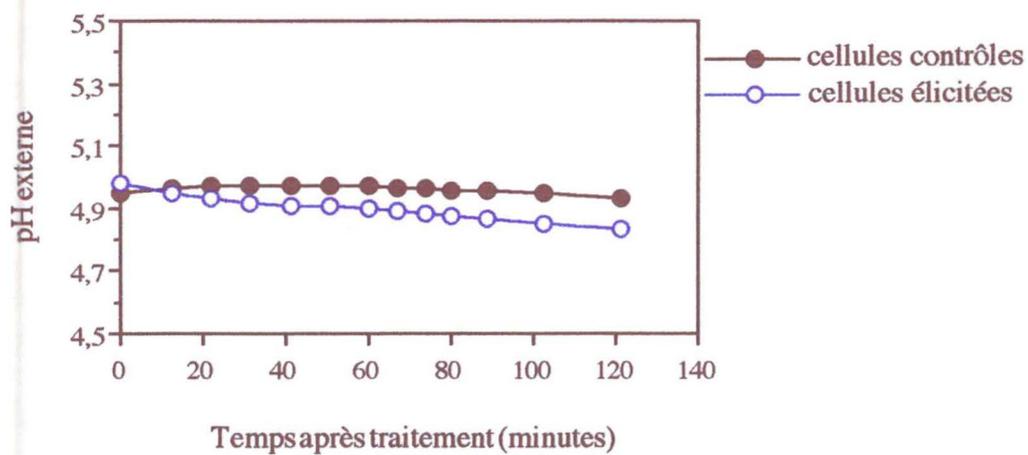


fig. 3.1.c : Effet des oligogalacturonides sur le pH externe de cellules de *Nicotiana tabacum*. Les oligogalacturonides sont ajoutés à une concentration de 0,2 mg/ml dans une conformation induite par le calcium.

provoquent pas de fluctuations significatives du pH cytosolique de protoplastes de tabac. Si le pH cytosolique ne change pas, ce résultat devrait être corroboré par une invariance du pH externe (milieu de culture) lors de l'élicitation.

2. Mesure du pH externe

Les oligogalacturonides sont ajoutés aux cellules à une concentration de 0,2 mg/ml dans une conformation induite par le calcium. La mesure du pH externe a été réalisée toutes les 10 minutes simultanément dans une culture contrôle et une culture élicitée (fig. 3.1.c).

Le pH externe de départ est de 5,0 pour les cellules contrôles et les cellules élicitées. Le pH externe varie peu en présence des oligogalacturonides. Ce résultat est en accord avec la constance du pH cytosolique suite à l'élicitation de protoplastes de tabac.

D. Analyse du calcium libre cytosolique

Le calcium est un messenger secondaire impliqué dans de nombreuses voies de transduction chez les animaux. Il constitue aussi un signal chez les végétaux. Nous avons cherché à savoir si le calcium joue un rôle lors de l'élicitation par des fragments pectiques chez le tabac.

La sonde fluorescente utilisée pour l'analyse de l'activité en calcium cytosolique est l'Indo-1. Cette sonde est désestérifiée et son chargement doit s'effectuer par électroporation. Une fois électroporés, les protoplastes sont incubés pendant 2 heures à l'obscurité avant de les analyser en microscopie à fluorescence (Matériel et méthodes, p. 50).

Comme pour le SNARF-1/AM, nous avons dû trouver la meilleure concentration en Indo-1 permettant une bonne estimation de l'activité en calcium cytosolique. Une concentration en Indo-1 de 83 μM a finalement été utilisée pour permettre cette estimation.

a) protoplastes contrôles

L'activité en calcium cytosolique a été mesurée en imagerie de fluorescence pendant 30 minutes à raison d'une acquisition d'images toutes les 5 minutes. L'activité en calcium libre de 10 protoplastes chargés avec l'Indo-1 a été analysée (fig. 3.2.a).

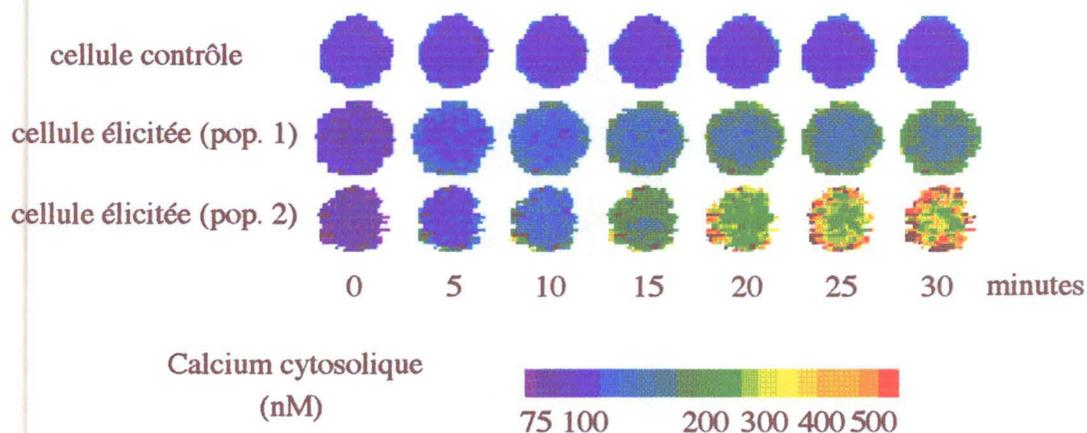


fig. 3.2.a : Evolution de l'activité en calcium cytosolique de protoplastes de *Nicotiana tabacum* chargés avec l'Indo-1 ($83 \mu\text{M}$). Les oligogalacturonides ont été testés à une concentration finale de $0,2 \text{ mg/ml}$ dans une conformation induite par le calcium.

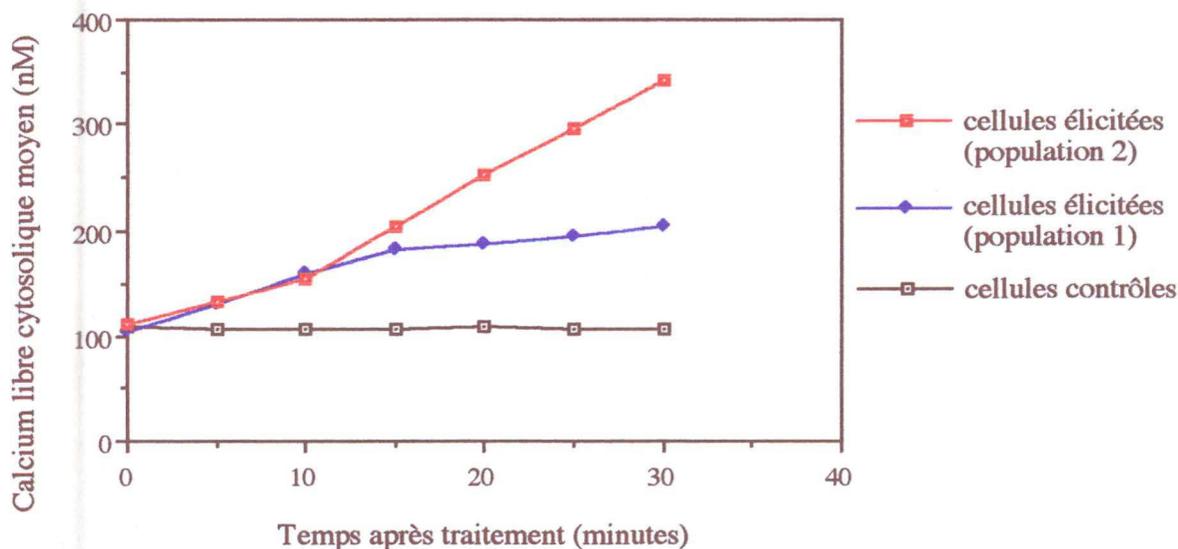


fig. 3.2.b : Effet des oligogalacturonides sur l'activité moyenne en calcium cytosolique de protoplastes de *Nicotiana tabacum* chargés avec l'Indo-1 ($83 \mu\text{M}$). Les oligogalacturonides ont été ajoutés à une concentration finale de $0,2 \text{ mg/ml}$ dans une conformation induite par le calcium. Chaque point de ce graphe correspond à l'activité en calcium cytosolique de 10 (cellules contrôles), 50 (cellules élicitées pop. 1) et 10 (cellules élicitées pop. 2) protoplastes.

L'activité en calcium cytosolique des protoplastes de tabac au repos est en moyenne de 115 nM (fig. 3.2.b). Pour l'ensemble des protoplastes, elle est comprise entre 100 et 130 nM. Cette activité en calcium reste relativement constante pendant les 30 minutes d'observation.

b) protoplastes élicités par les oligogalacturonides

La mesure de l'activité en calcium cytosolique a été réalisée sur 60 protoplastes auxquels on a ajouté les oligogalacturonides à une concentration finale de 0,2 mg/ml dans une conformation induite par le calcium (fig. 3.2.a).

L'ajout de l'éliciteur induit une augmentation de l'activité en calcium libre cytosolique endéans les 5 minutes après l'élicitation (fig. 3.2.b). Deux populations de protoplastes ont pu ainsi être identifiées :

* Une première population (80% des protoplastes) pour laquelle l'activité en calcium cytosolique moyenne passe de 100 nM à 200 nM après 30 minutes d'exposition à l'éliciteur. Un plateau semble avoir été atteint après ce délai. L'activité en calcium à l'intérieur d'un protoplaste appartenant à cette population est alors compris entre 75 et 260 nM.

* Une seconde population (15% des protoplastes) où l'activité en calcium cytosolique moyenne passe de 110 nM à 340 nM après 30 minutes d'exposition à l'éliciteur. L'activité en calcium à l'intérieur d'un protoplaste appartenant à cette population est alors compris entre 75 et 500 nM.

Seuls 5% des protoplastes n'ont pas répondu à la présence de l'éliciteur.

Suite à l'ajout de l'éliciteur pectique, une mobilisation rapide du calcium libre cytosolique se produit. Le niveau moyen final du calcium cytosolique est 2 à 3 fois plus important qu'au départ. Une mobilisation d'ions calcium dans le cytosol pourrait donc être impliquée dans la transduction du signal pectique. Le calcium, en effet, pourrait être un second messenger potentiel de cette voie de transduction.

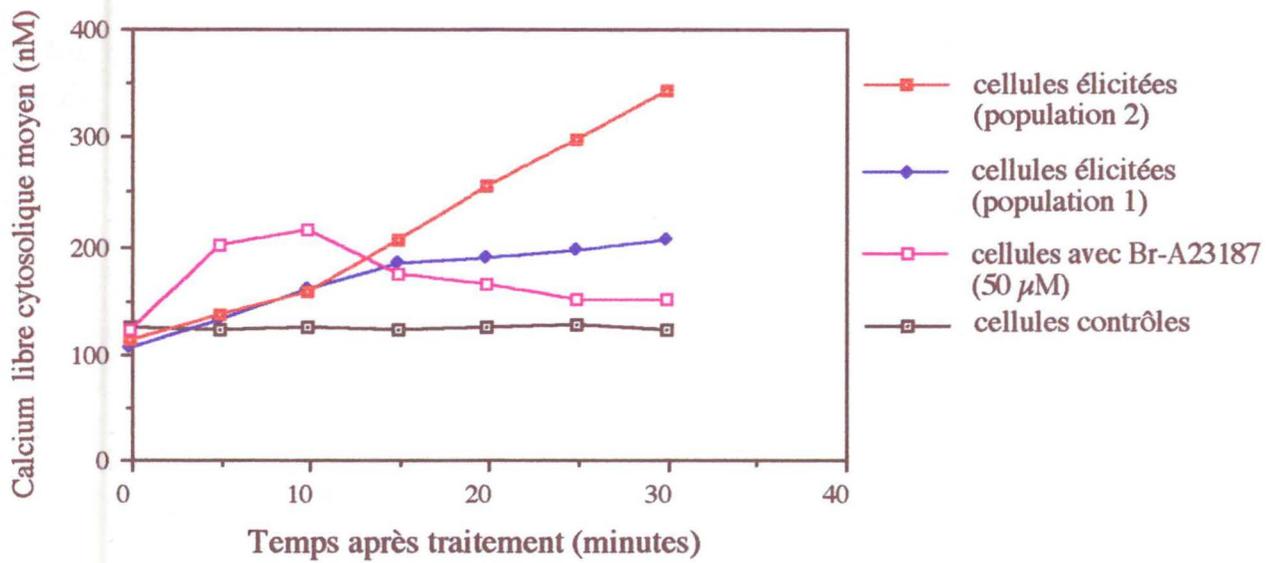


fig. 3.3.a : Effet de l'ionophore Br-A23187 sur l'activité moyenne en calcium cytosolique de protoplastes de *Nicotiana tabacum* chargés avec l'Indo-1 (83 μ M). L'ionophore a été testé à une concentration finale de 50 μ M. Chaque point du graphe correspond à la moyenne de l'activité en calcium cytosolique de 25 protoplastes.

Quels sont les mécanismes moléculaires qui déclenchent cette mobilisation du calcium ? Pour répondre au moins partiellement à cette question, nous avons étudié l'effet de modulateurs sur la mobilisation du calcium libre cytosolique et confirmé son rôle en tant que messager secondaire.

E. Effet de modulateurs sur l'activité en calcium cytosolique

Pour identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation de l'activité en calcium cytosolique, différents modulateurs ont été utilisés. Bien que le mode d'action de ces modulateurs ait été déterminé chez les animaux, ceux-ci sont désormais couramment utilisés chez les végétaux. Il convient néanmoins de rester prudent dans l'interprétation des résultats obtenus tant que tous les effets secondaires non spécifiques de ces modulateurs ne sont pas répertoriés.

L'effet de chaque modulateur a été analysé sur des protoplastes de *Nicotiana tabacum* chargés avec la sonde Indo-1 (83 μ M). Le modulateur a été ajouté respectivement à 5 protoplastes contrôles et 25 protoplastes qui seront ensuite élicités avec 0,2 mg/ml d'oligogalacturonides (DP \geq 9) dans une conformation induite par le calcium. Les concentrations finales en modulateur utilisées sont identiques à celles définies chez la carotte (Messiaen *et al.*, 1994).

1. Mesure de l'activité en calcium libre cytosolique en présence d'un ionophore calcique

L'ionophore calcique Br-A23187 est un transporteur transmembranaire de calcium. Il complexe les ions calcium du milieu extérieur et traverse la membrane plasmique en relarguant le calcium dans le cytosol.

L'activité en calcium cytosolique de 25 protoplastes a été mesurée par imagerie de fluorescence en présence d'une concentration finale de 50 μ M de Br-A23187.

Comme on peut s'y attendre, l'emploi de cet ionophore provoque une augmentation de la concentration en calcium libre cytosolique (fig. 3.3.a). Cette mobilisation est très importante pendant les 5 premières minutes du traitement. Elle est cependant transitoire car, contrairement à la réponse obtenue avec les oligogalacturonides, le niveau du calcium libre cytosolique diminue après 10 minutes de traitement pour revenir, après 30 minutes, à son niveau de départ.

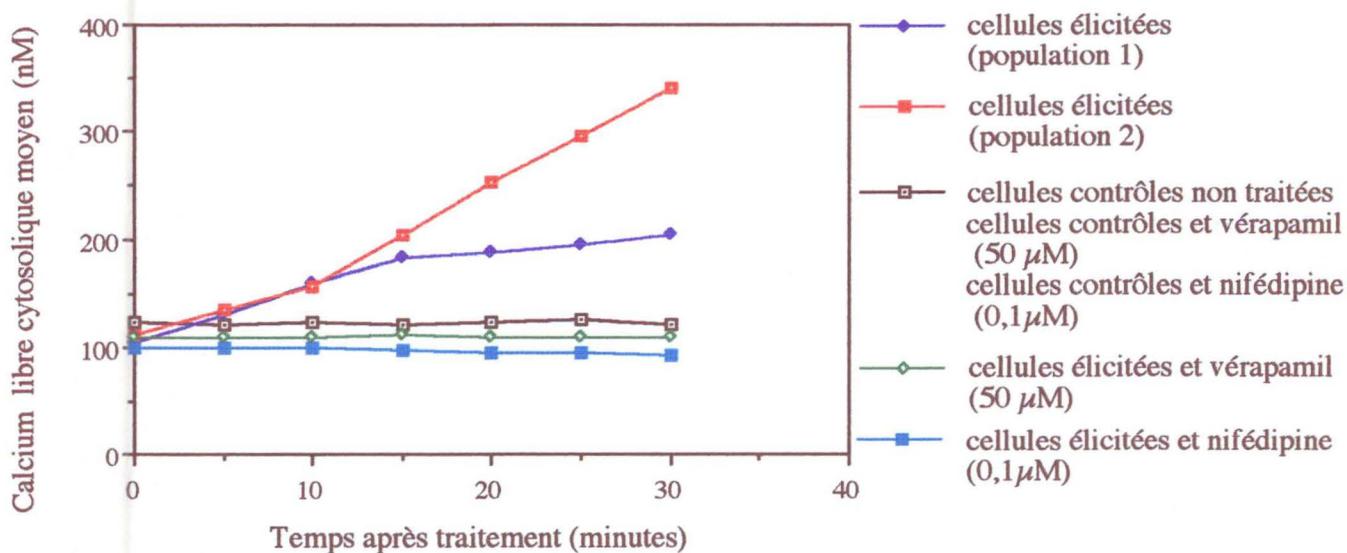


fig. 3.3.b : Effet d'antagonistes des canaux calciques sur l'activité moyenne en calcium cytosolique de protoplastes de *Nicotiana tabacum* chargés avec l'Indo-1 (83 μM). Le verapamil a été testé à une concentration finale de 50 μM; la nifédipine, à une concentration de 0,1 μM. Chaque point du graphe correspond à la moyenne de l'activité en calcium cytosolique de 25 protoplastes.

Rem : Pour une question de clarté, tous les contrôles ont été représentés par la même légende.

2. Mesure de l'activité en calcium libre cytosolique en présence d'antagonistes de canaux calciques

L'entrée massive de calcium dans le cytosol peut avoir des origines différentes. Le calcium peut provenir soit du milieu extérieur et pénétrer dans la cellule via des canaux calcium situés dans le plasmalemme, soit du stock vacuolaire via des canaux situés dans le tonoplaste ou le réticulum endoplasmique. Rappelons que chez les animaux, les canaux calciques peuvent s'ouvrir suite à une dépolarisation, à une tension membranaire ou à l'activation d'un récepteur.

Pour déterminer si des canaux calcium sont effectivement impliqués dans la mobilisation du calcium, deux types de bloqueurs de canaux calciques ont été utilisés :

* **Le vérapamil** est un modulateur de type phénylalkylamine. Il se fixe sur des sites spécifiques des canaux calciques en empêchant leur ouverture et l'entrée de calcium dans la cellule. L'effet du vérapamil sur les protoplastes de tabac a été testé à une concentration finale de 50 μM en absence et en présence des fragments pectiques.

* **La nifédipine** est un modulateur de type 1,4-dihydropyridine. C'est une substance organique capable de bloquer spécifiquement les canaux calciques de manière similaire au vérapamil. L'effet de la nifédipine sur les protoplastes de tabac a été testée à une concentration finale de 0,1 μM .

En absence d'éliciteurs, le vérapamil et la nifédipine ne modifient pas l'activité en calcium cytosolique des protoplastes (fig. 3.3.b). En présence de l'éliciteur, les deux types de modulateurs empêchent la mobilisation du calcium cytosolique durant les 30 minutes de traitement.

Ces 2 types d'agents sont donc bien capables de bloquer la mobilisation d'ions calcium dans le cytosol. Ces résultats suggèrent que la mobilisation du calcium se fait via des canaux calciques. Ceux-ci pourraient jouer un rôle primordial dans la transduction du signal activée par les oligogalacturonides.

Cependant, ces résultats ne permettent pas de connaître la localisation exacte de ces canaux. En effet, de par leur caractère hydrophobe, le vérapamil et la nifédipine sont tous les deux capables d'entrer dans la cellule et susceptibles d'agir aussi bien sur les canaux

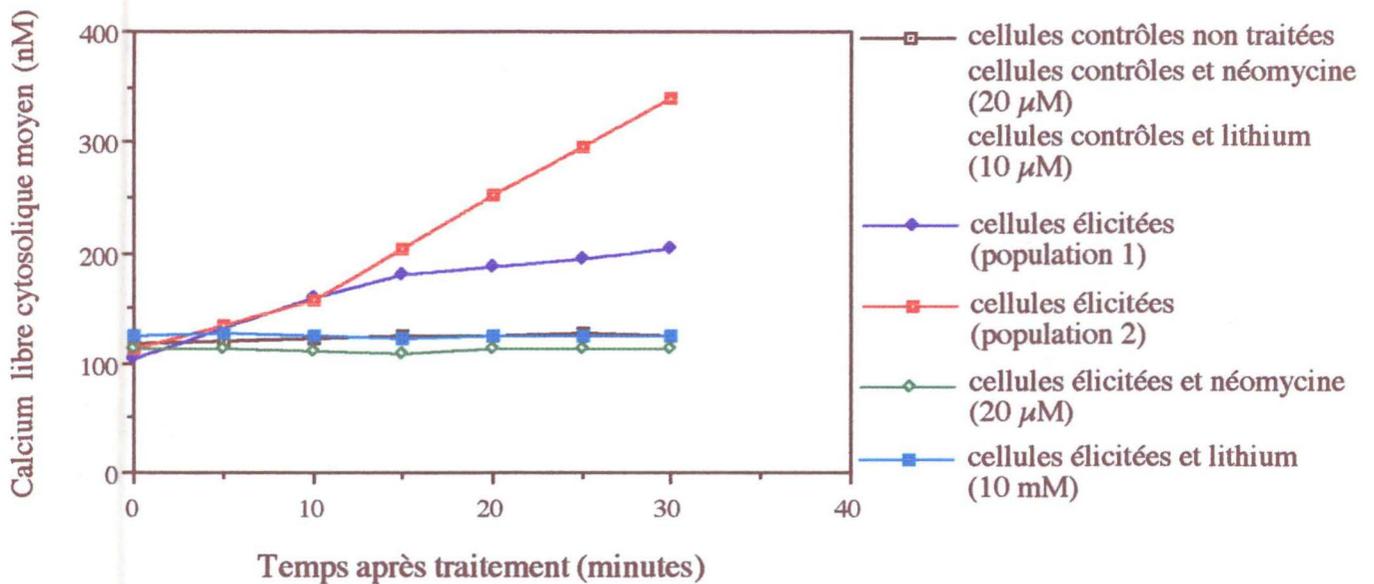


fig. 3.3.c : Effet d'antagonistes de la voie des phosphoinositides sur l'activité moyenne en calcium cytosolique de protoplastes de *Nicotiana tabacum* chargés avec l'Indo-1 (83 μM). La néomycine a été testée à une concentration finale de 20 μM; le lithium, à une concentration finale de 10 mM. Chaque point du graphe correspond à la moyenne de l'activité en calcium cytosolique de 25 protoplastes.

Rem : Pour une question de clarté, tous les contrôles ont été représentés par la même légende

calciques présents dans le plasmalemme que ceux présents dans le tonoplaste et le réticulum endoplasmique.

3. Mesure de l'activité en calcium libre cytosolique en présence d'antagonistes de la voie des phosphoinositides

Chez les végétaux, les principaux intermédiaires de la voie des phosphoinositides sont présents. Bien que cette voie soit impliquée dans la transduction du signal chez les plantes supérieures, il existe certaines différences par rapport au monde animal (Droback, 1994).

L'utilisation de modulateurs de la voie des phosphoinositides nous permettra de savoir si celle-ci joue un rôle dans la mobilisation d'ions calcium lors de l'élicitation de protoplastes de tabac par des oligogalacturonides. Deux types d'inhibiteurs de cette voie, la néomycine et le lithium, ont été testés :

*La **néomycine** est un antibiotique cationique de type aminoglycoside. Elle forme des complexes neutres avec les phospholipides membranaires (phosphatidylinositol). Elle inhibe spécifiquement la phospholipase C, enzyme catalysant l'hydrolyse de ces phospholipides en DAG et InsP₃. Les effets de la néomycine ont été étudiés à une concentration finale de 20 µM.

*Le **lithium** est une substance capable de perturber le recyclage des inositols phosphates dans le cytosol en inhibant l'inositol phosphate phosphatase. L'effet du lithium a été étudié à une concentration finale de 10 mM.

En absence d'éliciteurs, ces deux modulateurs n'ont pas d'effet sur l'activité en calcium cytosolique (fig. 3.3.c). En présence d'éliciteurs, ils empêchent la mobilisation du calcium libre cytosolique qui reste à un niveau constant de 120 nM pendant les 30 minutes de traitement.

L'utilisation de ces inhibiteurs suggère donc une implication de la voie des phosphoinositides dans la mobilisation du calcium cytosolique.

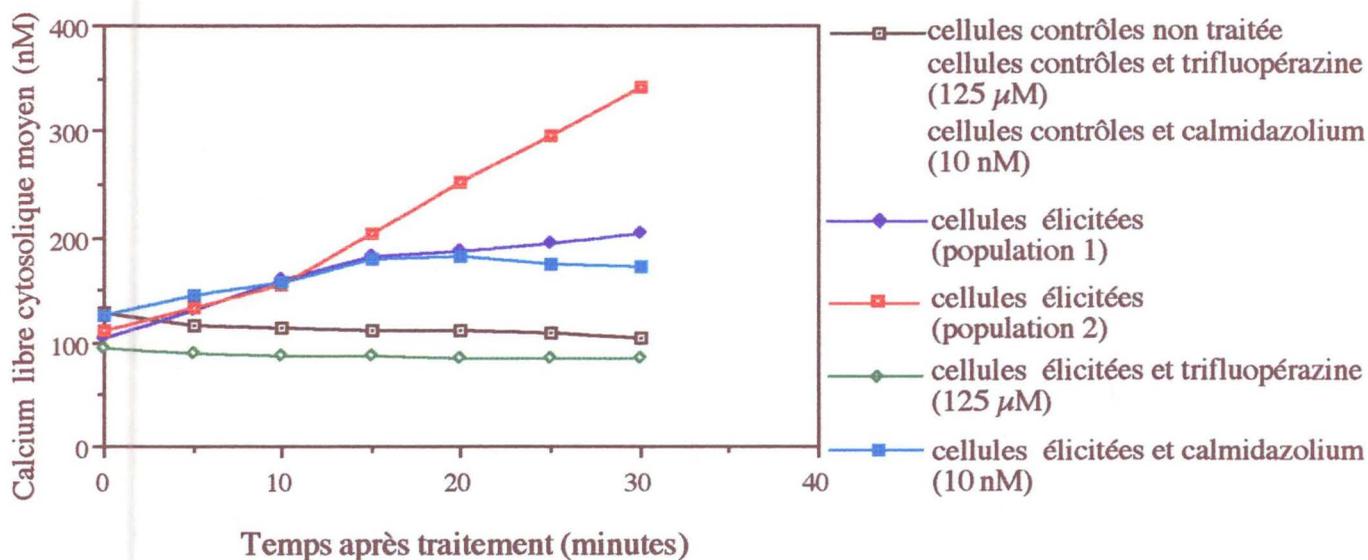


fig. 3.3.d : Effet d'antagonistes de la calmoduline sur l'activité moyenne en calcium cytosolique de protoplastes de *Nicotiana tabacum* chargés avec l'Indo-1 (83 μ M). La trifluopérazine a été testée à une concentration finale de 125 μ M; le calmidazolium, à une concentration finale de 10 nM. Chaque point du graphe correspond à la moyenne de l'activité en calcium cytosolique de 25 protoplastes.

Rem : Pour une question de clarté, tous les contrôles ont été représentés par la même légende

4. Mesure de l'activité en calcium libre cytosolique en présence d'antagonistes de la calmoduline

Lorsqu'il y a une augmentation de la concentration en calcium libre cytosolique, une quantité plus importante de calcium se lie à la calmoduline. Celle-ci est alors activée. Beaucoup de processus biologiques sont en effet contrôlés par le complexe calcium-calmoduline comme l'activation de PKA et l'ouverture de pompe à calcium. L'utilisation d'antagonistes de la calmoduline nous permet de savoir si la calmoduline joue un rôle dans l'élicitation de protoplastes de tabac par les fragments pectiques. Nous avons étudié l'effet de 2 inhibiteurs :

*La **trifluoperazine** est un inhibiteur général de la calmoduline. Elle est, cependant, également capable de perturber le métabolisme des inositols phosphates. Son effet sur l'élicitation a été étudié en l'utilisant une concentration finale de 125 μM .

*Le **calmidazolium** est un inhibiteur spécifique de la calmoduline. Elle a été ajoutée aux protoplastes à une concentration finale de 10 nM.

Remarque

L'inhibition de la calmoduline par ces deux modulateurs est calcium-dépendante. Il faut une première fixation du calcium sur la calmoduline pour provoquer le changement de conformation de la protéine et permettre ainsi la fixation de l'inhibiteur.

Chez le tabac, la trifluopérazine empêche totalement la mobilisation du calcium lors de l'élicitation (fig. 3.3.d). Puisque ce modulateur a d'autres effets, nous avons analysé l'action d'un autre inhibiteur plus spécifique, le calmidazolium. Cet inhibiteur ne provoque qu'une légère inhibition de l'activité en calcium en présence de l'éliciteur. La mobilisation d'ions calcium atteint un plateau de 180 nM après 20 minutes de traitement, ce qui correspond au plateau atteint par les protoplastes de la population 1 (voir p. 58). Notons que des protoplastes appartenant à la population 2 n'ont pas été observés.

En nous basant sur ces derniers résultats, on peut dire que la calmoduline ne jouerait pas un rôle significatif dans le relargage massif de calcium libre cytosolique lors de la transduction du signal médiée par les oligogalacturonides.

F. Conclusions générales concernant l'étude des flux ioniques

L'utilisation de la sonde SNARF-1/AM n'a pas permis de déceler de variations du pH cytosolique dans les protoplastes de tabac suite à l'élicitation pectique.

Par contre, l'emploi de l'Indo-1 nous a permis de mettre en évidence une mobilisation rapide du calcium libre cytosolique suite à l'ajout d'oligogalacturonides pectiques.

Cette dernière réponse a été étudiée plus en détail au moyen de modulateurs. Les antagonistes des canaux calcium (vérapamil et nifédipine) bloquent l'influx calcique. Les antagonistes de la voie des phosphoinositides (néomycine et lithium) inhibent la mobilisation du calcium durant l'élicitation. Les antagonistes de la calmoduline (trifluoperazine et calmidazolium) n'ont pas d'effet sur la mobilisation du calcium.

Les oligogalacturonides, une fois reconnus à la surface des protoplastes, déclenchent donc bien un signal intracellulaire. Une composante de cette réponse est une mobilisation rapide d'ions calcium dans le cytosol. Cette réponse fait probablement partie d'une réponse plus complexe permettant à la cellule d'orienter sa physiologie vers une stratégie de défense.

La transduction du signal mène à l'induction de réponses nucléaires, le plus souvent la transcription de gènes et la synthèse de protéines liées à la défense. Le chapitre suivant sera consacré à l'analyse de l'activation transcriptionnelle de gènes liés à la défense dans des cellules de tabac traitées avec des fragments pectiques.

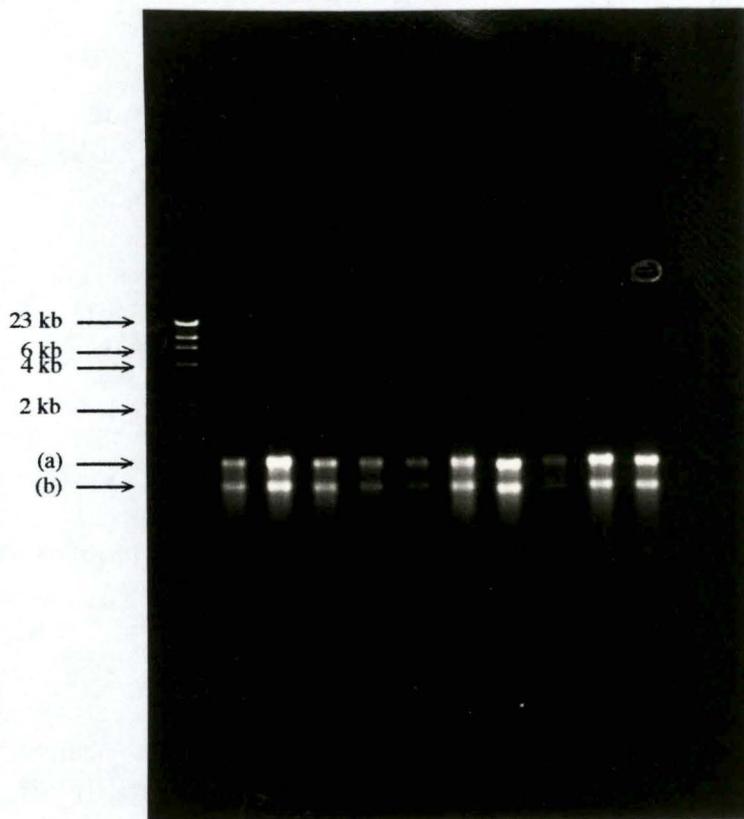


fig. 3.4.a : Analyse sur gel d'agarose non dénaturant de la qualité de l'ARN total isolé à partir de 3 g de cellules de tabac par la méthode du Trizol. Deux bandes sont bien visibles :

- (a) bande représentant les ARN ribosomiaux 28S
- (b) bande représentant les ARN ribosomiaux 18S

Le "smear" observé correspond probablement à des ARNm de taille variable.

III. Etude de l'effet des oligogalacturonides sur l'activation transcriptionnelle de gènes liés à la défense

A. Introduction

L'étude de l'activation transcriptionnelle de gènes de défense a été réalisée par dot-blot en présence de 4 sondes ADNc hétérologues codant pour les gènes PAL, PR1, PR2 et 4CL. L'analyse de l'ARN total de cellules de tabac élicitées permettra de définir si ces gènes sont activés. La PAL et la 4CL sont deux enzymes de la voie des phénylpropanoïdes régulées de façon coordonnée. Les protéines PR1 et PR2 sont des "gènes liés à la pathogenèse" (Introduction, p. 19).

Ces mesures de la transcription de gènes ont été réalisées sur des cellules de *Nicotiana tabacum* âgées de 6 jours. Trois types de traitement ont été réalisés :

* des cellules contrôles non traitées

* des cellules auxquelles on a ajouté une pectinase commerciale (polygalacturonase d'*Aspergillus niger*, Sigma[®] Chemical CO) à une concentration de 10 µg/100 ml, soit 3,8 unités/100 ml. Ce traitement reproduit un relargage naturel de fragments pectiques de la paroi végétale

* des cellules élicitées par des oligogalacturonides de DP ≥ 9 à une concentration de 0,2 mg/ml dans une conformation induite par le calcium

Pour chaque type de traitement, des cellules ont été prélevées après 0, 1, 2, 4, 6, 8 et 10 heures. L'ARN total de ces cellules a été isolé par la méthode du Trizol, ensuite vérifié par une électrophorèse sur gel d'agarose/EtBr et enfin dosé au spectrophotomètre (Matériel et méthodes, p.33).

Sur gel, l'ARN total donne typiquement deux bandes correspondant aux ARN ribosomiaux 28S et 18S, respectivement à 4,5 et 1,9 kb avec un ratio d'intensité de 1,5-2 (fig. 3.4.a). Ces critères sont habituellement utilisés pour reconnaître un ARN total de bonne qualité.

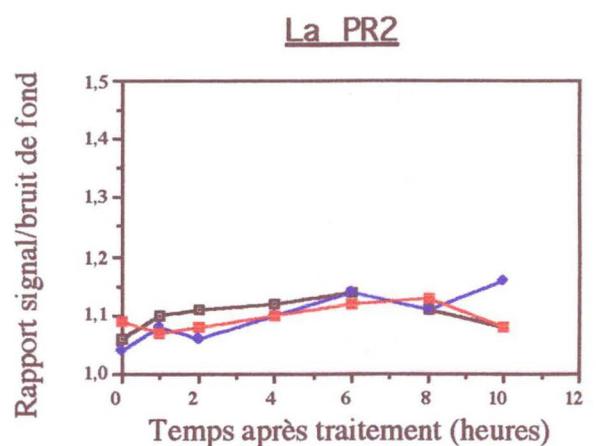
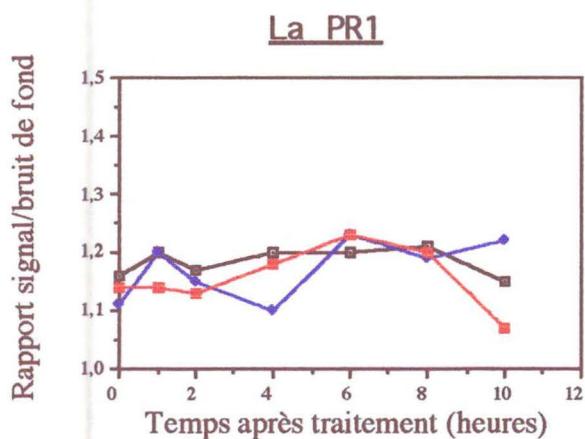
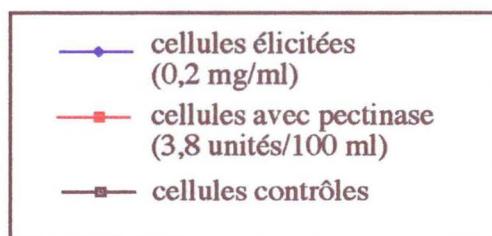
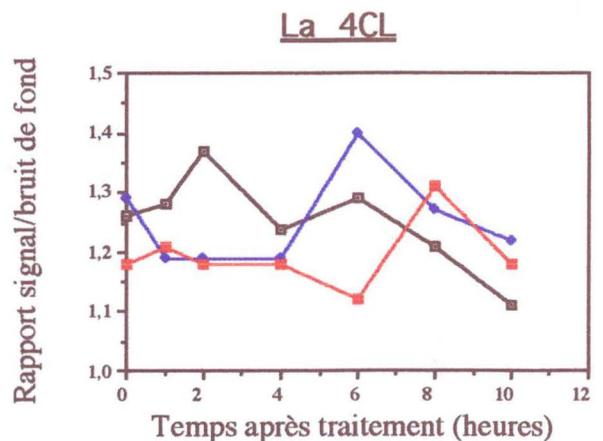
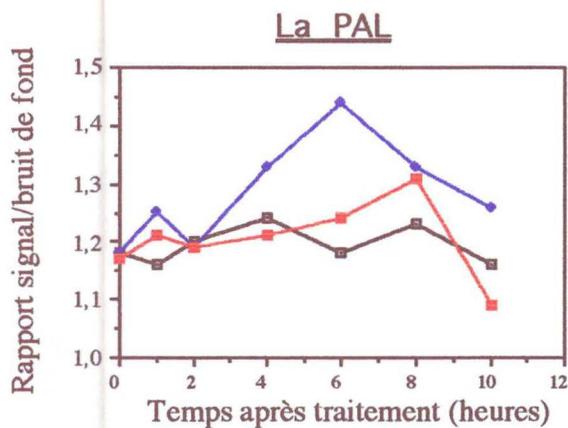


fig. 3.4.b : Etude de l'activation transcriptionnelle de gènes liés à la défense dans les cellules de *Nicotiana tabacum* soumises aux oligogalacturonides à une concentration finale de 0,2 mg/ml (DP \geq 9) dans une conformation induite par le calcium ou en présence de pectinase (3,8 unités/100 ml)

L'ARN total a ensuite été dénaturé au glyoxal, puis déposé sur filtre de nylon à raison de 10 µg d'ARN total par dépôt. Les 4 sondes ADNc ont été purifiées par mini-prep au départ de 4 clones *E.coli* disponibles au laboratoire. Ces sondes ont ensuite été marquées par random priming en présence de [α^3 32 P] dCTP (Matériel et méthodes, p. 35).

Les filtres ont ensuite été hybridés avec chaque sonde radiomarkée pendant une nuit (Matériel et méthodes, p. 36). Après lavage, les filtres ont été exposés sur pellicule Kodak.

La mesure de l'activité transcriptionnelle des gènes (PAL, PR1, PR2, 4CL) a été calculée par densitométrie. Le résultat final a été exprimé par le rapport entre l'intensité du signal au niveau du dépôt d'ARN total et l'intensité du bruit de fond environnant (fig. 3.4.b).

B. Résultats et conclusion

En présence d'oligogalacturonides de DP ≥ 9 dans une conformation induite par le calcium, une activation transcriptionnelle du gène codant pour la PAL se produit après 4 heures de traitement. Cette activation est maximale après 6 heures de traitement puis diminue progressivement. La pectinase provoque un léger effet activateur de la transcription du gène codant pour la PAL. Cette activation est visible seulement après 8 heures de traitement.

Le gène codant pour la 4CL subit une légère activation après 6 heures de traitement en présence d'oligogalacturonides et une activation après 8 heures de traitement à la pectinase.

Aucune activation de la transcription des gènes PR1 et PR2 n'a été décelée. Leur niveau transcriptionnel reste pendant toute la période de traitement très proche du contrôle.

La PAL et la 4CL sont activées au niveau transcriptionnel en présence d'oligogalacturonides, mais aussi de pectinase. Celle-ci, en dégradant la paroi végétale, relargue des fragments pectiques de taille suffisante pour induire l'activation de la PAL. Il est à remarquer que la cinétique d'activation de la PAL par la pectinase est différente de celle observée en présence de fragments pectiques. Ceci est probablement dû à un relarguage plus lent et/ou une durée de vie plus faible des oligogalacturonides de la paroi végétale.

La transduction du signal médiée par les éliciteurs pectiques peut donc induire des réponses nucléaires en activant la transcription de gènes liés à la défense. Cette activation est cependant faible. Deux hypothèses pourraient rendre compte de ce faible niveau d'activation:

*Soit les gènes étudiés sont réellement peu ou pas activés par les fragments pectiques.

*Soit les sondes moléculaires utilisées ne présentent pas suffisamment d'homologies pour mettre en évidence correctement une activation transcriptionnelle des gènes correspondants. Rappelons à cet égard que les sondes utilisées ont été isolées chez le persil traité avec un éliciteur de *Phytophthora megasperma*.

Dans les pages qui vont suivre, nous allons étudier l'activation enzymatique de la PAL et d'une glucanase en présence de fragments pectiques afin de vérifier si l'activation transcriptionnelle suggérée ci-dessus est accompagnée d'une activation enzymatique.

IV. Etude de l'effet des oligogalacturonides sur l'activation enzymatique de la PAL et de la β -1,3-glucanase

A. Introduction

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les oligogalacturonides sont capables d'activer la synthèse de toute une série de protéines liées à la défense (Introduction, tableau 1). Une des enzymes les plus étudiées est la phénylalanine ammonia-lyase (PAL). La PAL est la première enzyme de la voie des phénylpropanoïdes dont de nombreux produits sont dérivés, notamment les phytoalexines et des composants de la paroi (lignine). La PAL transforme la L-phénylalanine en acide cinnamique et ammoniaque (Bowles, 1990). C'est une enzyme tétramérique dont chaque sous-unité contient deux sites actifs. L'activation de la PAL est induite par de nombreux stimuli comme la lumière, des facteurs de croissance, mais aussi par des blessures ou une infection pathogène (bactérie et champignon). L'augmentation de l'activation PAL est considérée comme un marqueur sûr de l'élicitation (Bolwell *et al.*, 1991). Il est donc intéressant de voir quels effets ont les oligogalacturonides sur l'activité de cette enzyme, dans notre modèle.

L'activité d'une autre enzyme liée à la défense, la β -1,3-glucanase, sera également analysée. Il s'agit d'une enzyme hydrolytique dont le substrat est le β -glucane, constituant majeur de la paroi des pathogènes fongiques (Mauch *et al.*, 1988). La régulation de cette enzyme est complexe. Des stimulus comme la maturation, un stress (éthylène ou chitosan), une blessure ou une infection fongique sont capables de déclencher sa synthèse (Bowles, 1990).

L'activité enzymatique PAL et glucanase ont été dosées sur des cellules de *Nicotiana tabacum* âgée de 6 jours. Différents traitements ont été appliqués :

* Un lot de cellules n'a subi aucun traitement et sert donc de contrôle.

* Un lot de cellules a été traité avec un ionophore calcique, le Br-A23187 à une concentration finale de 50 μ M.

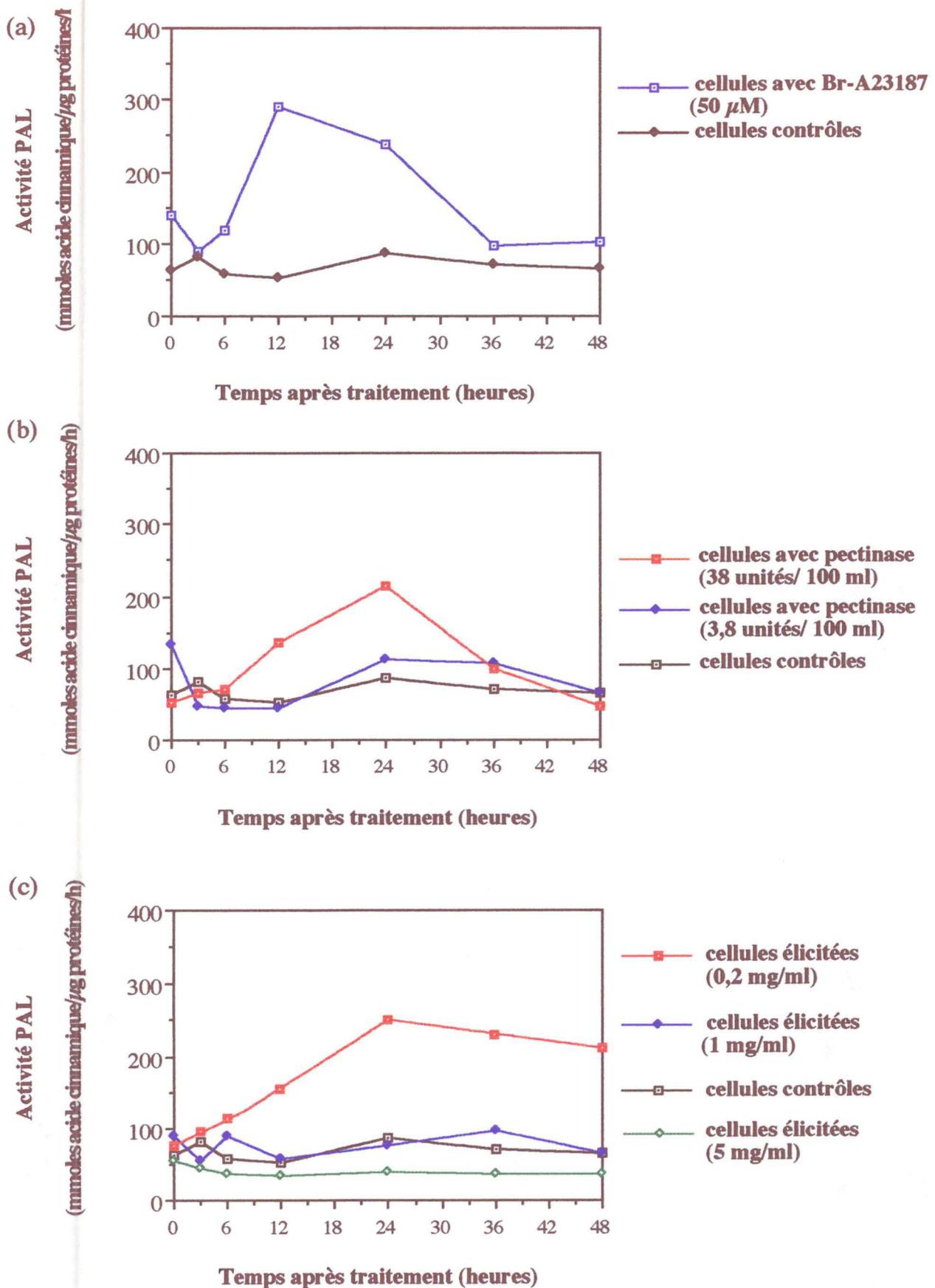


fig. 3.5 : Activation de la PAL dans les cellules de *Nicotiana tabacum* soumises à différents traitements :

(a) Effet de l'ionophore Br-A23187 (50 μ M).

(b) Effet de la pectinase (3,8 et 38 unités/100 ml).

(c) Effet des oligogalacturonides (DP \geq 9) à une concentration de 0,2, 1 et 5 mg/ml dans une conformation induite par le calcium.

* Un autre lot de cellules est élicité avec les oligogalacturonides de DP ≥ 9 dans une conformation induite par le calcium. Trois concentrations finales ont été testées : 0,2, 1 et 5 mg/ml.

* Un dernier lot de cellules a été mis en présence d'une pectinase (polygalacturonase d'*Aspergillus niger*, Sigma[®] Chemical CO). Deux concentrations finales ont été testées : 10 μ l/100 ml (3,8 unités) et 100 μ l/100 ml (38 unités).

Pour chaque type de culture, 10 ml de cellules ont été prélevés à 0, 3, 6, 12, 24, 48 heures après le traitement. Les cellules ont ensuite été homogénéisées (Matériel et méthodes, p. 27). Le dosage a été réalisé sur l'homogénat obtenu.

B. Dosage de l'activité PAL

1. Introduction

Le dosage de la PAL est basé sur la mesure de la quantité d'acide cinnamique produite par l'action de la PAL sur la L-phénylalanine. L'activité spécifique PAL est exprimée en fonction de la quantité de protéines contenue dans l'homogénat cellulaire. L'absorbance de l'acide cinnamique à 290 nm permet de définir une activité PAL en utilisant la formule suivante :

Absorbance (290 nm) = $\epsilon \cdot d \cdot C$ et l'activité spécifique = C/Q/heure

ϵ est le coefficient d'absorbance de l'acide cinnamique (10^4 l/mole/cm)

C est la concentration en acide cinnamique (moles/ml)

d vaut 1 cm

Q est la quantité de protéines exprimée en μ g/ml

L'activité spécifique de la PAL a été exprimée, en mmoles d'acide cinnamique produites par μ g de protéines par heure.

2. Résultats

Pour les cellules contrôles, l'activité PAL reste constante dans le temps et se situe à 70 mmoles d'acide cinnamique/ μ g de protéines/heure en moyenne (fig. 3.5).

L'ionophore calcique (Br-A23187) induit une augmentation de l'activité PAL après 12 heures de traitement (fig. 3.5.a). L'activité PAL maximale atteint 290 mmoles d'acide cinnamique/ μ g de protéines/h.

Elle diminue déjà après 24 heures pour revenir au niveau d'activité basal 36 heures après l'application de l'ionophore calcique.

Seul l'ajout d'une concentration finale de 100 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ (38 unités) de pectinase mène à une augmentation significative de l'activité PAL (fig. 3.5.b). Cette augmentation apparaît après 12 heures de traitement et atteint un maximum (avec 210 mmoles d'acide cinnamique/ μg de protéines/h) après 24 heures. Puis, elle diminue progressivement pour revenir au niveau de départ après 48 heures.

Seul l'ajout de 0,2 mg/ml d'oligogalacturonides provoque une augmentation importante de la PAL après 24 heures de traitement (250 mmoles d'acide cinnamique/ μg de protéines/h). Cette activation enzymatique se maintient jusqu'à 48 heures après traitement (fig. 3.5.c). Les concentrations supérieures (1 et 5 mg/ml) entraînent la mort des cellules.

3. Conclusion

La PAL, enzyme-clé de la voie des phénylpropanoïdes, est activée dans notre modèle. En effet, nous avons constaté une forte augmentation de l'activité de cette enzyme suite à la présence d'oligogalacturonides en conditions élicitrices. Cette augmentation atteint un maximum après 24 heures.

Les résultats obtenus en utilisant une pectinase sont aussi intéressants. Ils indiquent que la pectinase, en dégradant la pectine pariétale des cellules, relargue des fragments pectiques de taille suffisante pour que ceux-ci induisent un signal d'activation de la PAL. Cette polygalacturonase, provenant d'un agent pathogène (*Aspergillus niger*) et que l'on fait agir sur son substrat naturel (la paroi de cellules végétales), nous permet de nous rapprocher de la relation hôte-pathogène *in vivo*. L'augmentation de l'activité PAL, dont le maximum est aussi atteint après 24 heures, est similaire à celle observée en présence des oligogalacturonides. Mais, contrairement à ces derniers, elle est transitoire. La pectinase, toujours présente, continue à dégrader la pectine en continu, produisant des DP trop petits pour être reconnus comme éliciteurs par les cellules.

L'utilisation d'un ionophore calcique montre que le relargage artificiel de calcium dans le cytosol induit également l'activation enzymatique de la PAL. Toutefois, cette activation est plus rapide, plus importante (transitoire) que l'activation obtenues en présence des oligogalacturonides. Ce résultat confirme cependant que la mobilisation du calcium libre cytosolique, mise en évidence par

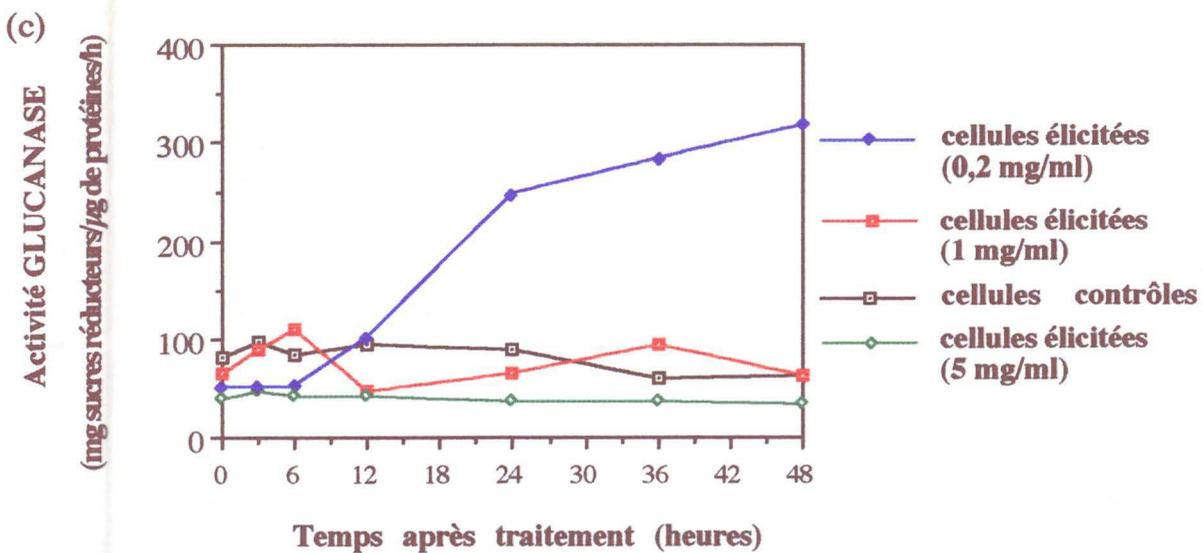
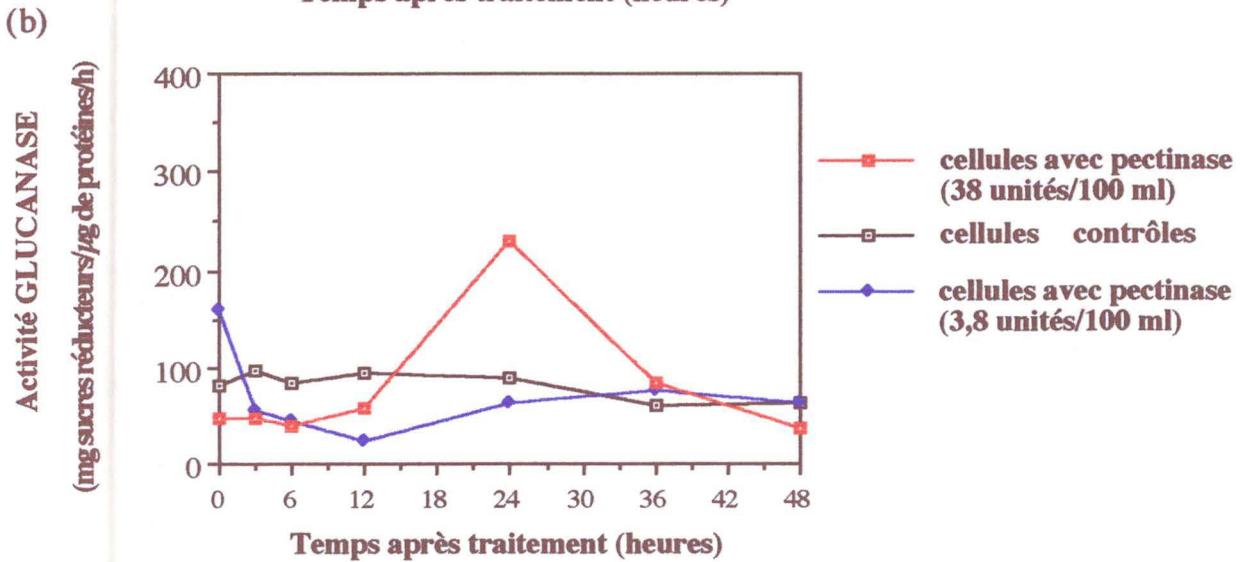
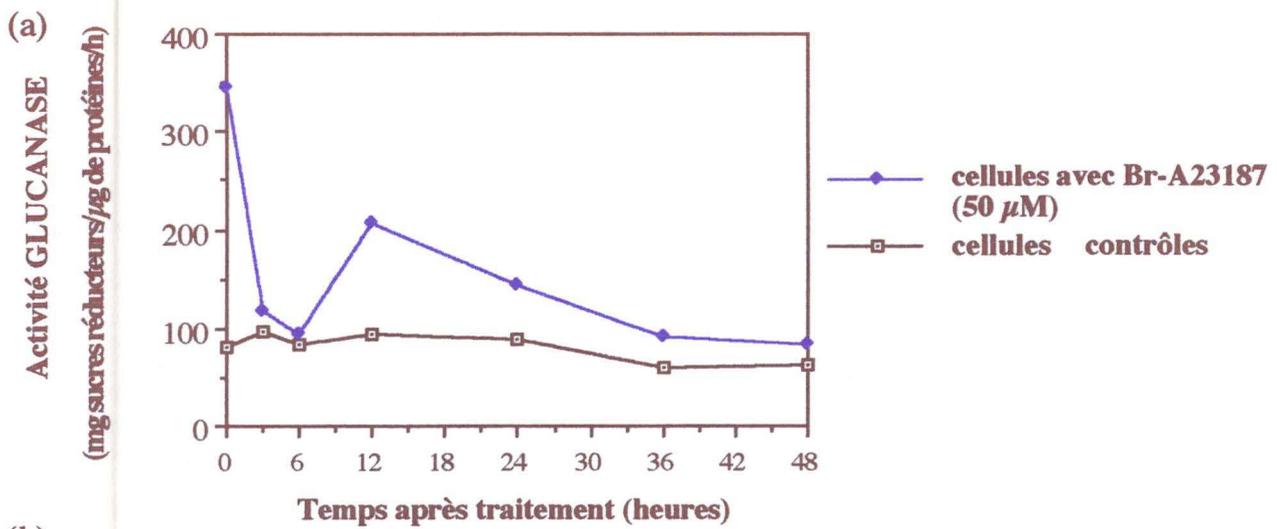


fig. 3.6 : Activation de la glucanase dans les cellules de *Nicotiana tabacum* soumises à différents traitements :

(a) Effet de l'ionophore Br-A23187 (50 μ M).

(b) Effet de la pectinase (3,8 et 38 unités/100 ml).

(c) Effet des oligogalacturonides (DP \geq 9) à une concentration de 0,2, 1 et 5 mg/ml dans une conformation induite par le calcium.

imagerie de fluorescence, est à elle seule capable d'induire une activation de la PAL.

C. Dosage de l'activité glucanase

1. Introduction

Le dosage de la glucanase est réalisé par la mesure de la quantité de sucres réducteurs produits par l'hydrolyse de la laminarine (Matériel et méthodes, p. 28). La quantité des sucres réducteurs est dosée par la méthode au cyanoacétamide. L'activité spécifique glucanase correspond à la quantité de sucres réducteurs produite en fonction de la quantité de protéines contenues dans l'homogénat cellulaire. L'activité glucanase a été exprimée en mg de sucres réducteurs produits par μg de protéines et par heure.

2. Résultats

L'activité glucanase reste constante chez les cellules contrôles tout au long du traitement. Elle est de 80 mg de sucres réducteurs/ μg de protéines/h en moyenne (fig. 3.6).

La présence de l'ionophore calcique (Br-A23187) à une concentration finale de 50 μM provoque une augmentation de l'activité glucanase, après 12 heures de traitement (fig. 3.6.a). Elle atteint 210 mg de sucres réducteurs/ μg de protéines/h, puis diminue progressivement.

Une augmentation de l'activité glucanase se produit aussi lors de l'ajout d'une pectinase (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aux cellules (fig. 3.6.b). L'activité glucanase atteint un maximum de 230 mg de sucres réducteurs/ μg de protéines/h, mais est lente (maximum après 24 heures) et transitoire.

L'augmentation de l'activité glucanase n'est obtenue qu'en présence d'oligogalacturonides à une concentration finale de 0,2 mg/ml ($\text{DP} \geq 9$) dans une conformation induite par le calcium (fig. 3.6.c). Après 24 heures de traitement, l'activité glucanase atteint 250 mg de sucres réducteurs/ μg de protéines/h et semble rester à un niveau élevé après 48 heures. Les concentrations supérieures (1 et 5 mg/ml) provoquent la mort des cellules en suspension.

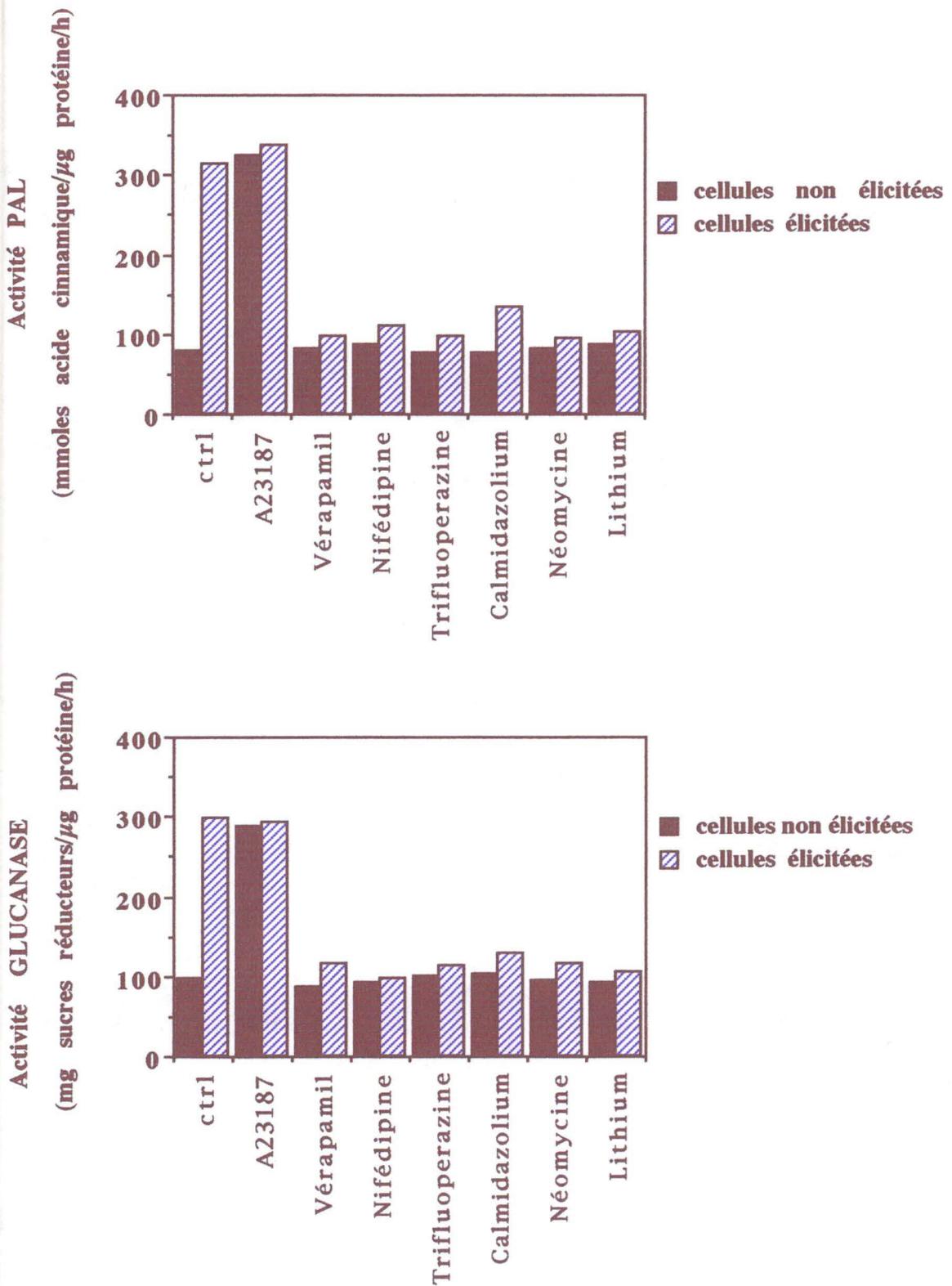


Fig. 3.7 : Effet des modulateurs sur l'activation enzymatique de la PAL et de la glucanase dans les cellules de *Nicotiana tabacum* soumises aux oligogalacturonides (DP \geq 9) à une concentration de 0,2 mg/ml dans une conformation induite par le calcium.

Les modulateurs utilisés sont : l'ionophore BR-A23187 (50 μ M), le vérapamil (50 μ M), la nifédipine (0,1 μ M), la trifluopérazine (125 μ M), le calmidazolium (10 nM), la néomycine (20 μ M), le lithium (10 mM).

3. Conclusion

La β -1,3-glucanase, enzyme importante dans la protection de la plante contre une attaque pathogène, a une activité enzymatique accrue dans notre modèle. En effet, une activation importante de cette enzyme a été induite après 24 heures de traitement en présence d'oligogalacturonides ou de pectinase.

L'ionophore calcique, en relarguant du calcium dans le cytosol, permet également une activation de la β -1,3-glucanase. Cette induction est toutefois moins importante et plus rapide que celle obtenue avec les oligogalacturonides. Le fait qu'elle soit transitoire est à corrélérer avec la mobilisation tout aussi transitoire du calcium libre cytosolique mise en évidence par imagerie de fluorescence.

L'ensemble des résultats obtenus suggère qu'une activation enzymatique de la β -1,3-glucanase se produit via une voie de transduction du signal médiée par le calcium et activée par les fragments pectiques.

D. Effet de modulateurs sur l'activation enzymatique de la PAL et de la glucanase

1. Introduction

Pour identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation enzymatique de la PAL et de la glucanase, l'effet de différents modulateurs a été étudié sur des cellules de *Nicotiana tabacum* âgées de 6 jours. Les modulateurs ont été testés sur des cellules contrôles et des cellules traitées aux oligogalacturonides ($DP \geq 9$) dans une conformation induite par le calcium. Les dosages enzymatiques ont été réalisés après 24 heures de traitement (fig. 3.7).

2. Résultats

L'activation enzymatique de la PAL par les oligogalacturonides est inhibée en présence de tous les modulateurs utilisés à savoir : les antagonistes des canaux calcium (vérapamil et nifédipine), les modulateurs de la voie des phosphoinositides (néomycine et lithium) et les antagonistes de la calmoduline (calmidazolium et trifluopérazine). En effet, l'activité PAL y est proche de celle du contrôle et vaut 100 mmoles d'acide cinnamique/ μ g de protéines/h.

L'activation de la glucanase est, elle aussi, bloquée en présence des modulateurs, car l'activité glucanase y est similaire au contrôle et atteint 100 mg de sucres réducteurs/ μ g de protéines/h.

E. Conclusion concernant l'activation enzymatique de la PAL et de la β -1,3-glucanase

Les oligogalacturonides induisent bien des réponses de défense (par une activation enzymatique) chez *Nicotiana tabacum*. Ils provoquent ainsi l'activation de la PAL et de la β -1,3-glucanase.

En conclusion, la transduction du signal pectique induit à la fois des réponses rapides (après quelques minutes) comme la mobilisation du calcium libre cytosolique, mais aussi des réponses plus tardives (après plusieurs heures) comme l'activation des enzymes PAL et glucanase.

Dans le chapitre suivant, nous tenterons d'identifier, par la technique du "fingerprinting", de nouveaux gènes dont la transcription est régulée par le signal pectique. Cela nous permettrait d'obtenir un ensemble de séquences dont la transcription serait spécifique de la réponse aux fragments pectiques.

V. Identification de nouveaux gènes par la méthode du "fingerprinting" sur l'ARN total

A. Introduction

Le "fingerprinting" sur ARN total (ou differential display) est une technique récente permettant d'identifier des gènes dont l'expression est différente chez les cellules traitées par rapport aux cellules non traitées. Elle comporte deux étapes : la synthèse d'un premier brin d'ADNc à partir d'ARN total et une amplification de ces ADNc. Pour une combinaison définie d'amorces, ces deux étapes génèrent une population d'ADNc représentative des espèces d'ARNm présents dans chaque échantillon.

La résolution par électrophorèse de ces produits PCR permet d'identifier des bandes d'intensités différentes qui correspondent à des gènes exprimés différemment. Les produits PCR obtenus par le differential display doivent être vérifiés. S'ils correspondent bien à des gènes différentiellement exprimés suite à l'élicitation, le clonage et le séquençage, voire le criblage d'une banque d'ADNc pourront être envisagés. L'obtention d'une série de gènes de défense exprimés en présence d'éliciteurs pectiques servirait de base pour l'étude d'autres types d'éliciteurs.

L'identification de nouveaux gènes dont la transcription est régulée par le signal pectique a été réalisée sur des cellules en suspension de *Nicotiana tabacum* âgées de 6 jours. Deux populations de cellules ont été comparées :

* Une population de cellules contrôles non traitées.

* Une population de cellules élicitées par des oligogalacturonides (concentration finale de 0,2 mg/ml) de DP \geq 9 dans une conformation induite par le calcium. Les cellules sont récoltées après 6 heures de traitement.

Pour chaque population de cellules, l'ARN total a été isolé par la méthode du Trizol puis vérifié sur gel d'agarose et enfin dosé au spectrophotomètre (Matériel et méthodes, p. 33). A partir de cet ARN total, la synthèse du premier brin d'ADNc a été réalisée en utilisant une amorce oligo(dT) pour la reverse transcriptase. La réaction PCR a ensuite été effectuée sur chaque échantillon d'ADNc en utilisant une

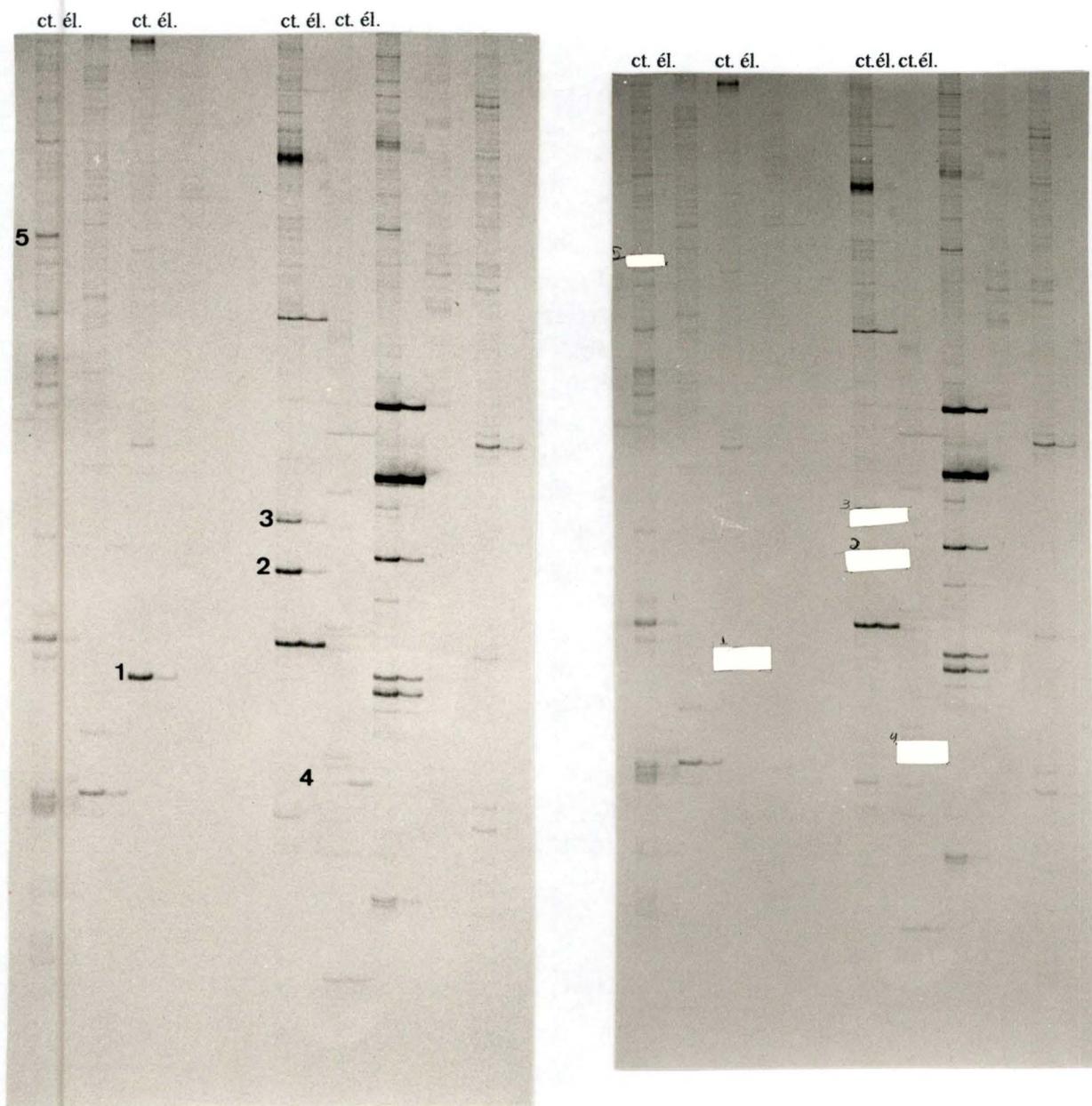


fig. 3.8.a (1) : Analyse sur gel de polyacrylamide de l'amplification d'ADNc en utilisant une combinaison spécifique d'amorces P et T. Pour chaque combinaison, la première piste représente l'ADNc provenant de cellules contrôles (ct.) et la deuxième représente l'ADNc provenant de cellules élicitées (él.). Cinq bandes dont l'intensité est différente entre les deux pistes ont été découpées et éluées du gel pour une réamplification. Les amorces utilisées pour chaque bande sont : 1 (T1 et P5), 2 (T1 et P8), 3 (T1 et P8), 4 (T1 et P9), 5 (T1 et P3).

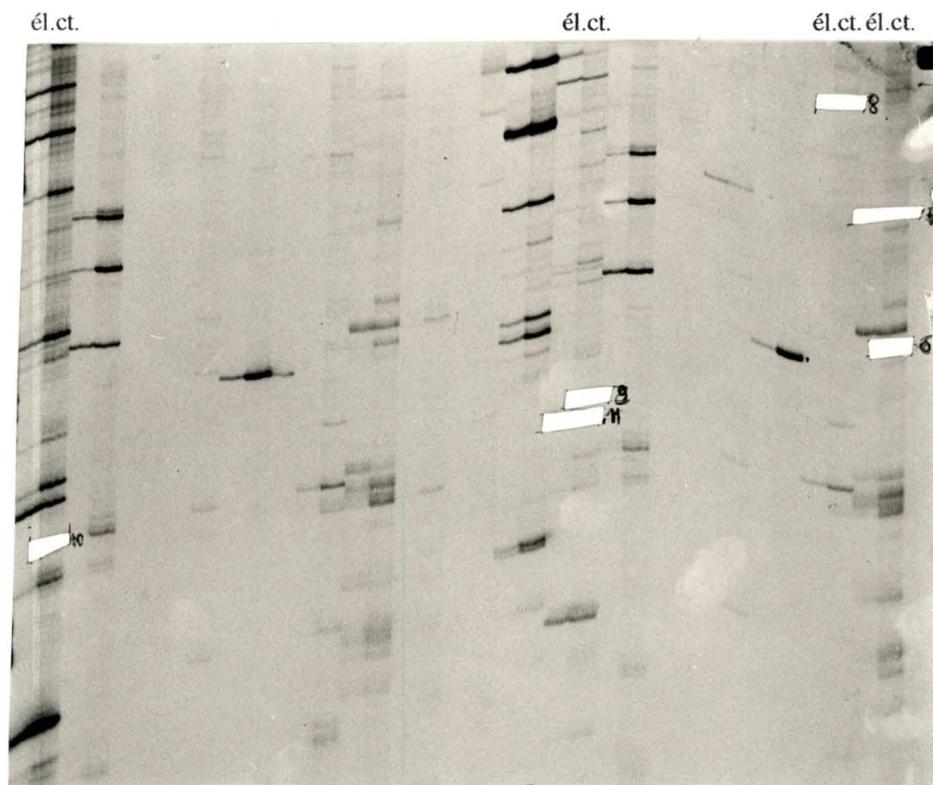
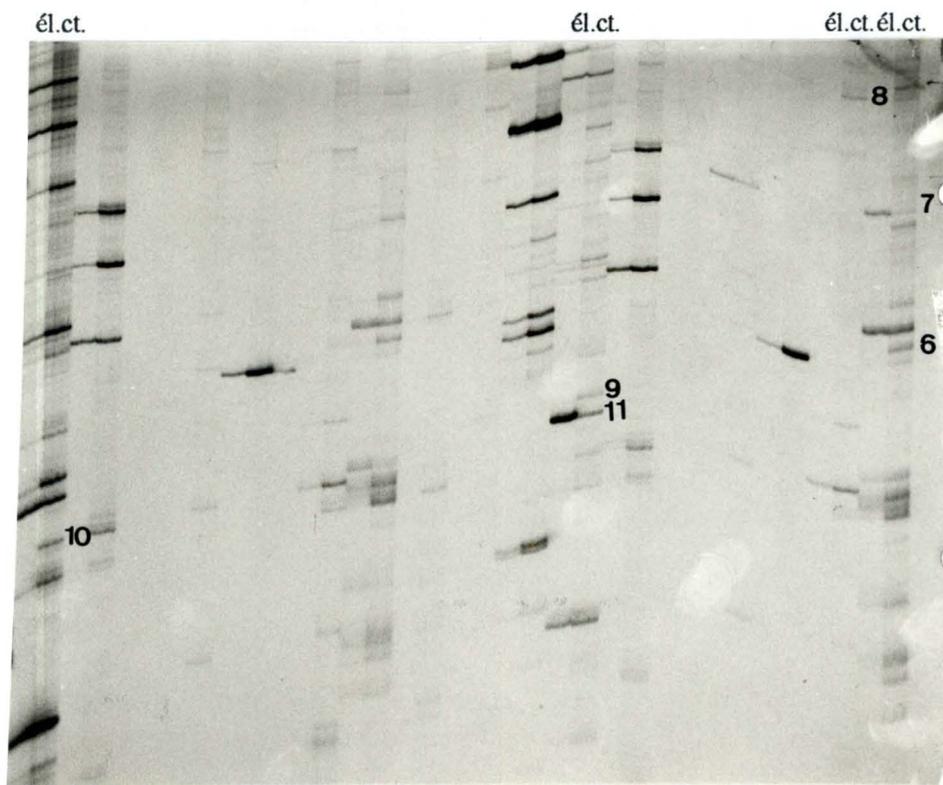


fig. 3.8.a (2) : Analyse sur gel de polyacrylamide de l'amplification d'ADNc en utilisant une combinaison spécifique d'amorces P et T. Pour chaque combinaison, la première piste représente l'ADNc de cellules élicitées (él.) et la deuxième représente l'ADNc de cellules contrôles (ct.). Six bandes dont l'intensité est différente entre les deux pistes ont été découpées et éluées du gel pour une réamplification. Les amorces utilisées pour chaque bande sont : 6 (T2 et P3), 7 (T2 et P3), 8 (T2 et P4), 9 (T2 et P9), 10 (T3 et P9), 11 (T2 et P9).

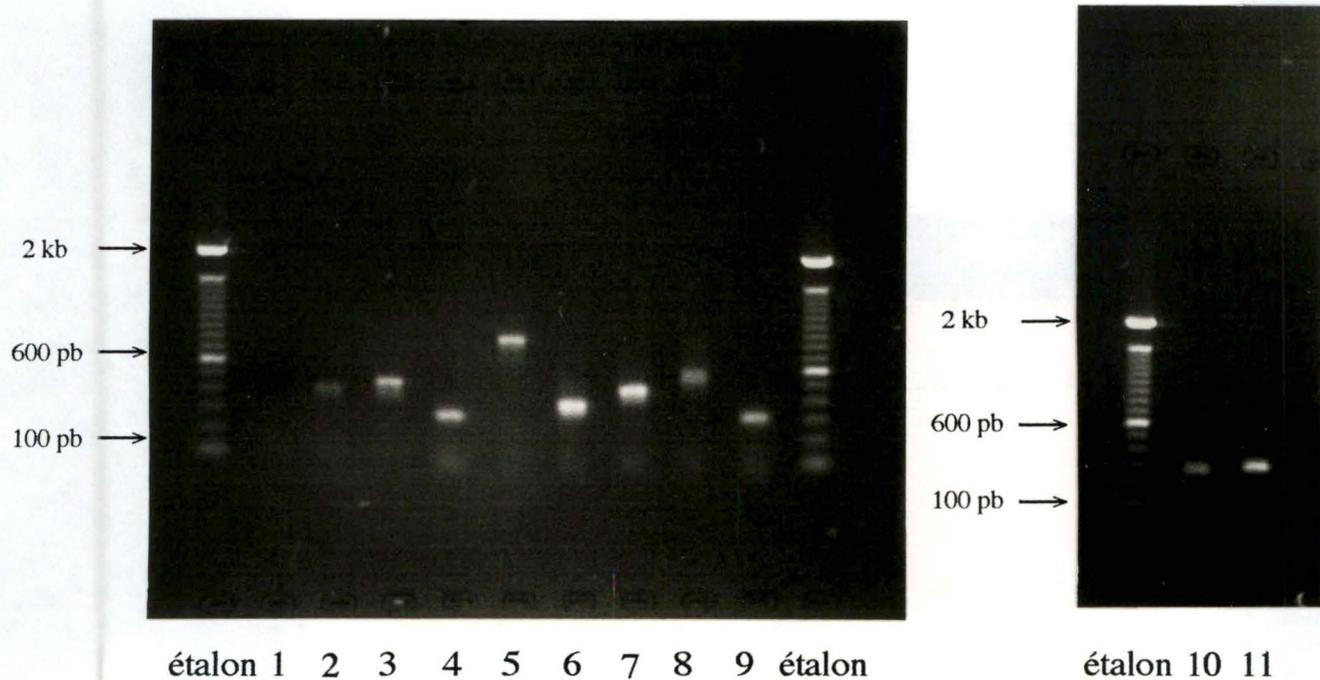


fig. 3.8.b : Analyse sur un gel d'agarose des ADNc (1-11) élués et réamplifiés. Leur taille a été déterminée par rapport à un étalon de 100 pb (une bande tous les 100 pb).

combinaison d'amorces P (amorce arbitraire) et T (amorce oligo(dT)) (Matériel et méthodes, p. 39).

Trente combinaisons d'amorces P et T ont été réalisées dans des réactions indépendantes pour permettre à un maximum ARNm présent dans l'extrait d'ARN total d'être converti en un produit PCR défini. Les produits PCR ont enfin été résolus sur un gel polyacrylamide.

B. Résultats

Pour chaque combinaison d'amorces, il existe un ensemble différent de bandes entre l'échantillon contrôle et l'échantillon élicité (fig. 3.8.a). Ce sont principalement des bandes présentes au niveau de l'échantillon contrôle et absentes de l'échantillon élicité. Ces bandes correspondraient à des gènes réprimés lors de l'élicitation par les oligogalacturonides.

Nous avons sélectionné 11 bandes en fonction de leur présence dans un échantillon et pas dans l'autre. L'ADN a été élué du gel et réamplifié par PCR. Une électrophorèse sur gel d'agarose a permis de définir approximativement la taille de ces produits réamplifiés. Celle-ci est située entre 300 et 800 pb (fig. 3.8.b).

C. Vérification des produits obtenus

1. Introduction

Une première technique utilisée pour la vérification est le dot-blot. Les produits PCR ont été marqués au [α^3 2P] dCTP par random priming. Ces sondes ont ensuite été hybridées avec l'ARN total isolé de cellules contrôles et élicitées (Matériel et méthodes, p. 35).

Une deuxième technique consiste en un northern. Les produits PCR ont été marqués à la biotine par random priming. Ils ont ensuite été hybridés avec l'ARN total ayant préalablement migré sur gel d'agarose et transféré sur membrane (Matériel et méthodes, p. 42).

2. Résultats

Lors de la vérification par dot-blot, quatre des 10 produits réamplifiés s'hybrident "fortement" avec l'ARN total (fig. 3.8.c). Cependant, il n'a pas été possible de distinguer clairement de différence entre les cellules contrôles et les cellules élicitées.

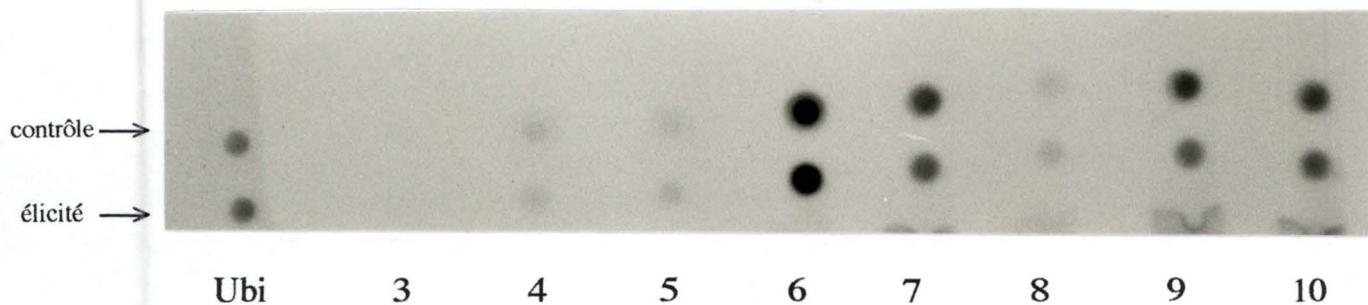


fig. 3.8.c : Vérification en dot-blot des ADNc réamplifiés (3-10). L'ubiquitine est utilisée comme contrôle interne. Les sondes ont été hybridées sur de l'ARN total provenant de cellules contrôles et élicitées.

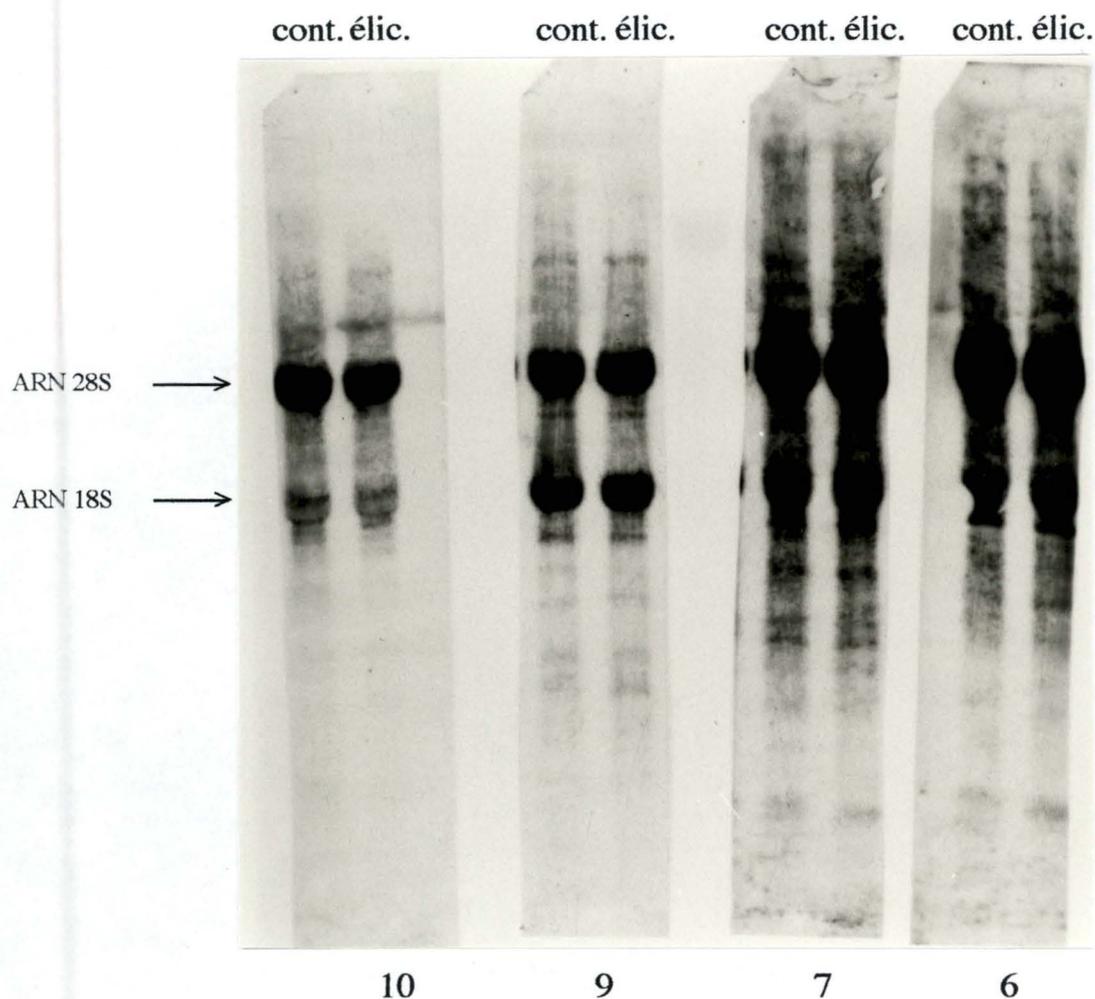


fig. 3.8.d : Vérification en northern des 4 bandes d'ADNc positives au niveau du dot-blot (6, 7, 9, 10). Les sondes correspondantes ont été hybridées sur de l'ARN total isolé de cellules contrôles et de cellules élicitées.

Ces quatre produits PCR ont ensuite été utilisés comme sonde en northern. De multiples bandes (y compris les bandes des ARN ribosomiaux) ont pu être détectées par chacune des sondes aussi bien au niveau de l'ARN total contrôle qu'élicité (fig. 3.8.d).

D. Conclusion

L'utilisation de la méthode du "fingerprinting" sur l'ARN total nous a permis de visualiser une différence sur gel entre les populations d'ADNc de cellules contrôles et élicitées. Cependant, nous n'avons pas pu identifier avec certitude des gènes différemment exprimés dans des cellules de tabac exposées aux oligogalacturonides.

En effet, les deux techniques employées pour la vérification (dot-blot et northern) ont montré que les sondes s'hybrident avec de nombreux ARNs. Si la bande différemment exprimée correspond à un ARNm d'abondance moyenne à faible, le signal pourrait "disparaître" (pas détectable) dans l'hybridation des ARN abondants. Un northern, réalisé à partir d'ARN messenger, nous permettrait peut-être d'identifier ces messagers avec les sondes obtenues. Faute de temps, nous n'avons pas pu vérifier cette dernière hypothèse.

Conclusions

et

perspectives

I. Conclusions

L'objectif de ce travail était d'aborder l'étude de la transduction du signal pectique dans une relation hôte-pathogène chez un modèle végétal, *Nicotiana tabacum*. Ce végétal se prête parfaitement aux études physiologiques et biochimiques, et est aussi une référence en biologie moléculaire, entre autres pour sa facilité à être transformé génétiquement. Notre étude a ainsi comporté des aspects physiologiques et moléculaires.

La première partie de ce travail a consisté en une analyse par imagerie de fluorescence du pH et de l'activité moyenne en calcium cytosolique.

* Aucune variation du pH cytosolique moyen n'a été mise en évidence suite à l'élicitation. Ceci est corroboré par l'absence de variation du pH externe. Le pH ne semble donc pas impliqué en tant que messenger secondaire dans notre modèle.

Chez la carotte, des études réalisées avec les mêmes techniques ont montré que les fragments pectiques induisent une acidification cytosolique accompagnée d'une alcalinisation externe. Cette acidification était de 0,3 unité de pH en moyenne (Messiaen et Van Cutsem, 1994).

Chez le tabac, l'équipe de Guern (Mathieu *et al.*, 1993) a aussi observé, en RMN, une acidification de l'ordre de 0,3 unité de pH après 10 minutes de traitement aux oligogalacturonides. Cette acidification était généralement accompagnée d'un efflux en K^+ et d'une dépolarisation membranaire. Jusqu'à présent, aucun modèle n'a permis de rendre compte de cette acidification cytosolique, bien qu'on puisse penser à une inhibition de la pompe à proton (H^+ -ATPase).

* Une mobilisation de calcium libre cytosolique a été mise en évidence dans ce travail. Le relarguage rapide et prolongé de calcium dans le cytosol est probablement dû à l'ouverture de canaux calcium présents dans le plasmalemme, le tonoplaste ou/et le réticulum endoplasmique.

L'utilisation de modulateurs suggère de plus une implication de la voie des phosphoinositides. En effet, l'inhibition de canaux calcium (par le vérapamil et la nifédipine) et de la voie des phosphoinositides (par le lithium et la néomycine) bloque la mobilisation du calcium

cytosolique, montrant ainsi que les deux phénomènes sont bien impliqués. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour la carotte (Messiaen, 1994).

On peut donc postuler que l'ouverture de canaux calcium est déclenchée par leur interaction avec l'InsP₃. Par des expériences de patch-clamp sur le tonoplaste de vacuoles de betteraves rouges, Alexandre et Lassalles (1992) ont mis en évidence une libération de calcium déclenchée par l'InsP₃.

Récemment, les travaux effectués par Kamada et Muto (1994) sur des cellules en suspension de tabac, par marquage à l'[H]³ ont montré une activation rapide du recyclage des phospholipides et une production d'InsP₃ durant l'élicitation par *Phytophthora nicotiana*. On peut donc soupçonner l'implication des phosphoinosides dans la transduction du signal pectique chez les cellules de tabac

La calmoduline, quant à elle, ne joue pas un rôle central dans la mobilisation du calcium libre cytosolique. Toutefois, on peut supposer que la mobilisation calcique augmente la formation de complexes calcium/calmoduline, classiquement susceptibles d'activer diverses kinases (calcium ou calcium/calmoduline dépendantes) et par là d'autres protéines.

En conclusion, le calcium libre est un messager secondaire impliqué dans la transduction du signal pectique. Il s'agit d'une première réponse cytosolique à l'élicitation capable de déclencher des réponses nucléaires plus tardives comme l'activation de gènes liés à la défense.

La seconde partie de ce travail avait pour but l'étude de la transcription de gènes de défense, et l'activation enzymatique de la PAL et de la β -1,3-glucanase.

Une activation enzymatique de la PAL (enzyme-clé de la production de phytoalexines antibiotiques), précédée d'une augmentation de la transcription du gène correspondant, a été mise en évidence. Cette réponse semble bien être déclenchée par l'influx rapide de calcium dans le cytosol. En effet, un ionophore calcique seul est capable d'induire cette activation de la PAL.

Il est à noter que le calmidazolium (un inhibiteur de la calmoduline) a un effet inhibiteur sur la PAL, mais n'en a pas sur la mobilisation du calcium. Cela suggère un rôle de la calmoduline dans la transduction du signal pectique sur l'activation de gènes, mais en aval de l'influx calcique.

Ces résultats confirment ceux obtenus par Preisig et Moreau (1994). En utilisant la pectinase comme éliciteur, ils ont étudié l'effet des antagonistes potentiels de la transduction du signal (vérapamil, néomycine, EGTA,...) sur l'accumulation de phytoalexines chez le tabac. Ils ont proposé au moins deux étapes dans le processus de transduction, à savoir : la nécessité d'un influx en calcium et l'implication de la calmoduline et/ou d'une protéine kinase calcium/calmoduline dépendante. Ces résultats corroborent aussi ceux de Vögeli *et al.* (1992) qui ont utilisé une glucanase fongique comme éliciteur. Ils ont montré que la biosynthèse de phytoalexines chez les cellules en suspension de tabac était bloquée par des antagonistes calcium/calmoduline.

La β -1,3-glucanase (enzyme de dégradation de la paroi fongique), est aussi activée en présence d'éliciteurs pectiques, et elle semble induite dans les mêmes conditions que la PAL. L'effet d'un ionophore calcique employé seul suggère aussi un rôle de l'influx calcique dans l'activation de la β -1,3-glucanase.

Néanmoins, Suzuki *et al.*, (1995) en traitant des cellules en suspension de tabac avec un ionophore calcique (0,4-40 μ M) n'ont pas observé d'accumulation d'ARNm codant pour une glucanase basique, indiquant ainsi la présence d'un influx calcique nécessaire mais pas suffisant pour l'expression de ce gène.

La dernière partie de ce travail a consisté en l'identification de nouveaux gènes dont la transcription serait régulée lors de l'élicitation. La technique du "differential display" permettrait l'obtention d'une série de gènes spécifiquement transcrits lors de l'élicitation.

Nous avons isolé sur gel et réamplifiés 4 clones d'ADNc. Après vérification par northern et dot-blot, les ADNc réamplifiés pouvaient détecter une grande variété d'ARNs y compris des ARNs ribosomiaux. La technique du "differential display" ne nous a pas permis de déterminer avec certitude qu'une bande d'ADNc isolée du gel correspond bien à un gène différemment transcrit pendant l'élicitation. Cette voie d'investigation mérite cependant d'être poursuivie.

II. Perspectives

La voie de transduction d'un signal quel qu'il soit, pectique ou non, est loin d'être élucidée et jusqu'à présent, aucun intermédiaire de cette voie n'a été clairement identifié et étudié.

Les résultats que nous avons obtenus sur *Nicotiana tabacum* délimitent une première voie d'approche possible pour étudier le système plus en détail. Ainsi, une étude plus approfondie de la mobilisation du calcium libre cytosolique suite à l'élicitation serait nécessaire. La technique du patch-clamp permettrait de caractériser la nature et la localisation précise des canaux calcium impliqués dans cet influx calcique.

Une deuxième approche a été ébauchée dans ce travail avec la technique du "differential display". En poursuivant l'identification de gènes différentiellement transcrits en cas d'élicitation, nous pouvons espérer obtenir un ensemble de séquences dont la transcription serait spécifique de la réponse aux fragments pectiques. Il est toutefois probable qu'individuellement, chacun de ces gènes soit susceptible de répondre à une série de stimuli différents. Si c'est effectivement le cas, une utilisation bien réfléchie d'une batterie d'éliciteurs et d'une gamme de modulateurs pharmacologiques devrait permettre de discerner différents récepteurs et différentes voies de transduction du signal qui aboutissent à la mobilisation de mécanismes de défense adaptés à chaque situation d'interaction pathogène.

A long terme, la connaissance des mécanismes de transduction du signal et d'activation de défenses par la plante permettra inéluctablement la production de végétaux transgéniques constitutivement résistants aux agressions virales, pathogènes et fongiques.

Bibliographie

- Aldington S., Fry S.C. (1993) Oligosaccharins. In advances in botanical research (vol. 19). Ed. Callow J.A. pp. 1-101. Academic press, London
- Aldington S., Fry S.C. (1994) Rhamnogalacturonan-II-a biologically active fragment. *Journal of Experimental Botany* **45** (272) : 287-293
- Alexandre J., Lassalles J-P. (1992) Intracellular Ca^{2+} release by $InsP_3$ in plants and effect of buffers on Ca^{2+} diffusion. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **338** : 53-61
- Bellincampi D., Salvi G., De Lorenzo G., Cervone F., Marfa V., Eberhard S., Darvill A., Albersheim P. (1993) Oligogalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants. *Plant J.* **4** : 207-213
- Bolwell G.P., Coulson V., Rodgers M.W., Murphy D.L., Jones D. (1991) Modulation of the elicitation response in cultured french bean cells and its implication for the mechanism of signal transduction. *Phytochemistry* **30** (2) : 397-405
- Bottin A., Véronési C., Pontier D., Esquerré-Tugayé M-T., Blein J-P., Rusterucci C., Ricci P. (1994) Differential responses of tobacco cells to elicitors from two *Phytophthora* species. *Plant Physiol. Biochemistry* **32** (3) : 373-378
- Bowles D.J. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* **59** : 873-907
- Branca C., De Lorenzo G., Cervone F. (1988) Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by α -D-oligogalacturonides in pea stem segments. *Physiol. Plant.* **72** : 499-504
- Brecht J.K., Huber D.J. (1988) Products released from enzymatically active cell wall stimulate ethylene production and ripening in preclimacteric tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Plant Physiology* **88** : 1037-1041
- Broekaert W.F., Peumans W.J. (1988) Pectic polysaccharides elicit chitinase accumulation in tobacco. *Physiologia Plantarum* **74** : 740-744

- Bruce R.J., West C.A. (1989) Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology* **91** : 889-897
- Bush D.S. (1993) Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiology* **103** : 7-13
- Campbell A.D., Labavitch J.M. (1991) Induction and regulation of ethylene biosynthesis by pectic oligomers in cultured pear cells. *Plant Physiology* **97** : 699-705
- Carpita N.C., Gibeaut D.M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the wall during growth. *Plant J.* **3** (1) : 1-30
- Chappell J., Hahlbrock K., Boller T. (1984) Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia-lyase. *Planta* **161** : 475-480
- Cordero M.J., Raventós D., San Segundo B. (1994) Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection : systemic wound-response of a monocot gene. *The Plant Journal* **6** (2) : 141-150
- Dangl J.L., Hauffe K.D., Lipphardt S., Hahlbrock K., Scheel D. (1987) Parsley protoplasts retain differential responsiveness to u.v. light and fungal elicitor. *The EMBO Journal* **6** (9) : 2551-2556
- Debondrie P. (1991) Physicochimie de la complexation des cations multivalents par les pectates. Thèse, Université catholique de Louvain, Namur, Belgium
- Dietrich A., Mayer J.E., Hahlbrock K. (1990) Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *The Journal of Biological Chemistry* **265** (11) : 6360-6368
- Dixon R.A., Lamb C.J. (1990) Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* **41** : 339-367

- Doherty H.M., Bowles D.J. (1990) The role of pH and ion transport on oligosaccharide-induced proteinase inhibitor accumulation in tomato plants. *Plant, Cell and Environment* **13** : 851-855
- Drøbak B.K. (1993) Plant phosphoinositides and intracellular signaling. *Plant Physiology* **102** : 705-709
- Drøbak B.K., Watkins P.A.C., Valenta R., Dove S.K., Lloyd C.W., Staiger C.J. (1994) Inhibition of plant plasma membrane phosphoinositide phospholipase C by the actin-binding protein, profilin. *The Plant Journal* **6** (3) : 389-400
- Einspahr K.J., Thompson G.A. (1990) Transmembrane signaling via phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in plants. *Plant Physiology* **93** : 361-366
- Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y. (1983) Handbook of plant cell culture (vol 1) Techniques for propagation and breeding. McMillan, Inc pp. 1-970
- Evans D.E., Briars S.A., Williams L.E. (1991) Active calcium transport by plant cell membranes. *Journal of experimental botany* **42** (236) : 285-303
- Farmer E.E., Moloshok T.D., Ryan C.A. (1990) *In vitro* phosphorylation in response to oligouronide elicitors : structural and biological relationships. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* **9** : 249-258
- Farmer E.E., Ryan C.A. (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell* **4** : 129-134
- Forrest R.S., Lyon G.D. (1990) Substrate degradation patterns of polygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* and *Bacillus polymyxa* and release of phytoalexin-eliciting oligosaccharides from potato cell walls. *J. Exp. Bot.* **225** : 481-488
- Gromes R., Zetsche K. (1992) Evidence for a G-protein regulated adenylate cyclase and a Ca²⁺/calmoduline controlled phosphodiesterase in the phytoflagellate *Chlorogonium*. *Bot. Acta* **105** : 395-399
- Habereder H., Schröder G., Ebel J. (1989) Rapid induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs during

- fungus infection of soybean (*Glycine max* L.) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures at the onset of phytoalexin synthesis. *Planta* **177** : 58-65
- Hahlbrock K., Scheel D. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40** : 347-369
- Horn M.A., Heinsteinst P.F., Low P.S. (1989) Receptor-mediated endocytosis in plant cells. *Plant Cell* **1** : 1003-1009
- Hoshino T., Chida M., Yamaura T., Yoshizawa Y., Mizutani J. (1994) Phytoalexin induction in green pepper cell cultures treated with arachidonic acid. *Phytochemistry* **36** (6) : 1417-1419
- Jin D.F., West C.A. (1984). Characteristics of galacturonic acid oligomers as elicitors of chitinase activity in castor bean seedlings. *Plant Physiol.* **74** : 989-992
- Johannes E., Brosnan J.M., Sanders D. (1992) Calcium channels in the vacuolar membrane of plants : multiple pathways for intracellular calcium mobilisation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **338** : 105-112
- Kamada Y., Muto S. (1994) Stimulation by fungal elicitor of inositol phospholipid turnover in tobacco suspension culture cells. *Plant Cell Physiology* **35** (3) : 397-404
- Kauss H., Waldmann T., Jeblick W., Takemoto J.Y. (1991) The phytotoxin syringomycin elicits Ca^{2+} -dependent callose synthesis in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Physiologia Plantarum* **81**: 134-138
- Legendre L., Heinsteinst P.F., Low P.S. (1992) Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *The Journal of Biological Chemistry* **267** (28) : 20140-20147
- Liners F., Letesson J-J., Didembourg C., Van Cutsem P. (1989) Monoclonal antibodies against pectin. Recognition of a conformation induced by calcium. *Plant Physiology* **91** : 1419-1424
- Lois A.F., West C.A. (1990) Regulation of expression of the chitinase synthetase gene during elicitation of castor bean seedlings with pectic fragments. *Arch. Biochem. Biophys.* **276** : 270-277

- Lorito M., Broadway R.M., Hayes C.K., Woo S.L., Noviello C., Williams D.L., Harman G.E. (1994) Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. *MPMI* **7** : 525-527
- Low P.S., Legendre L., Heinstejn P.F., Horn M.A. (1993) Comparison of elicitor and vitamin receptor-mediated endocytosis in cultured soybean cells. *J. Exp. Bot.* **44** : 269-274
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275
- Marfà V., Gollin D.J., Eberhard S., Mohnen D., Darvill A., Albersheim P. (1991) Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. *The Plant Journal* **1** : 217-225
- Martinoia E. (1992) Transport processes in vacuoles of higher plants. *Bot. Acta* **105** : 232-245
- 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. *The Plant Journal* **1** (3) : 333-343
- Mau C.J.D., West C.A. (1993) Conserved primary structure of two terpenoid phytoalexin biosynthetic enzymes which are induced by cell wall elicitors : cloning of casbene synthetase cDNA. *J. Cell. Biochem.* **17A** : 33 (A404)
- Mauch F., Hadwiger L.A., Boller T. (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue. *Plant Physiology* **87** : 325-333
- McAinsh M.R., Webb A.A.R., Taylor J.E., Hetherington A.M. (1995) Stimulus-induced oscillations in guard cell cytosolic free calcium. *The Plant Cell* **7** : 1207-1219
- McMaster G.K., Carmichael G.G. (1977) Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (11) : 4835-4838
- Mehdy M.C. (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* **105** : 467-472

- Messiaen J. (1994) La transduction du signal chez les végétaux supérieurs en réponse à une attaque pathogène : Identification de réponses membranaires, cytosoliques et nucléaires induites par des oligogalacturonides. Thesis, Presses Universitaires de Namur, Belgium.
- Messiaen J., Nérinckx F., Van Cutsem P. (1995) Callose synthesis in spirostanol treated carrot cells is not triggered by cytosolic calcium, cytosolic pH or membrane potential changes. *Plant Cell Physiology* **36** (7) (In press)
- Messiaen J., Van Cutsem P. (1993) Defense gene transcription in carrot cells treated with oligogalacturonides. *Plant Cell Physiology* **34** (7) : 1117-1123
- Messiaen J., Van Cutsem P. (1994) Pectic signal transduction in carrot cells : Membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant Cell Physiology* **35** (4) : 677-689
- 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 Physiology* **71** : 916-926
- Oppenheim A.B., Chet I. (1992) Cloned chitinase in fungal plant-pathogen control strategies. *TIBTECH* **10** : 392-394
- Pacini B., Petrigliano A., Diffley P., Paffetti A., Brown E.G., Martelli P., Trabalzini L., Bovalini L., Lusini P., Newton R.P. (1993) Adenylyl cyclase activity in roots of *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **34** (4) : 899-903
- Preisig C.L., Moreau R.A. (1994) Effects of potential signal transduction antagonists on phytoalexin accumulation in tobacco. *Phytochemistry* **36** (4) : 857-863
- Raz V., Fluhr R. (1993) Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. *The Plant Cell* **5** : 523-530
- Renelt A., Colling C., Hahlbrock K., Nürnberger T., Parker J.E., Sacks W.R., Scheel D. (1993) Studies on elicitor recognition and signal transduction in plant defence. *Journal of Experimental Botany* **44** : 257-268

- Ryals J., Uknes S., Ward E. (1994) Systemic acquired resistance. *Plant Physiology* **104** : 1109-1112
- Scheel D., Parker J.E. (1990) Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation. *Z. Naturforsch.* **45c** : 569-575
- Schlüpmann H., Bacic A., Read S.M. (1993) A novel callose synthase from pollen tubes of *Nicotiana*. *Planta* **191** : 470-481
- Schnitzler J.P., Seitz H.U. (1989) Rapid responses of cultured carrot cells and protoplasts to an elicitor from the cell wall of *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. *Z. Naturforsch.* **44c** : 1020-1028
- Somssich I.E., Schmelzer E., Bollmann J., Hahlbrock K. (1986) Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 2427-2430
- Sussman M.R., Harper J.F. (1989) Molecular biology of the plasma membrane of higher plants. *The Plant Cell* **1** : 953-960
- Suzuki K., Fukuda Y., Shinshi H. (1995) Studies on elicitor-signal transduction leading to differential expression of defense genes in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiology* **36** (2) : 281-289
- Svalheim O., Robertsen B. (1993) Elicitation of H₂O₂ production in cucumber hypocotyl segments by oligo-1,4- α -D-galacturonides and an oligo- β -glucan preparation from cell walls of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Physiologia Plantarum* **88** : 675-681
- Thain J.F., Doherty H.M., Bowles D.J., Wildon D.C. (1990) Oligosaccharides that induce proteinase inhibitor activity in tomato plants cause depolarization of tomato leaf cells. *Plant, Cell and Environment* **13** : 569-574
- Thain J.F., Gubb I.R., Wildon D.C. (1995) Depolarization of tomato leaf cells by oligogalacturonide elicitors. *Plant, Cell and Environment* **18** : 211-214
- Vögeli U., Vögeli-Lange R., Chappell J. (1992) Inhibition of phytoalexin biosynthesis in elicitor-treated tobacco cell-suspension cultures by calcium/calmodulin antagonists. *Plant Physiology* **100** : 1369-1376

Yamada T., Tanaka Y., Sriprasertsak P., Kato H., Hashimoto T., Kawamata S., Ichinose Y., Kato H., Shiraishi T., Oku H. (1992) Phenylalanine ammonia-lyase genes from *Pisum sativum*: structure, organ-specific expression and regulation by fungal elicitor and suppressor. *Plant cell Physiology* **33** (6) : 715-725