

Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système Chondrus crispus-Acrochaete operculata

Kamal Bouarab

► To cite this version:

Kamal Bouarab. Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système Chondrus crispus-Acrochaete operculata. Biochimie, Biologie Moléculaire. Paris 6, 2000. Français. NNT: . tel-01114924

HAL Id: tel-01114924 https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01114924

Submitted on 12 Feb 2015 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

THESE de DOCTORAT de L'UNIVERSITE PARIS 6 Spécialité **Océanologie Biologique et Environnement Marin**

présentée par **Kamal BOUARAB**

pour obtenir le grade de DOCTEUR de L'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de la thèse :

Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système *Chondrus crispus Acrochaete operculata*



Soutenue le 4 Avril 2000 devant le jury composé de :

Mme M. BOCCARA M. B. FRITIG M. T. LANGIN M. A. TOULMOND M. J. CORREA M. JM. JOUBERT M. P. POTIN M. B. KLOAREG

Présidente Rapporteur Rapporteur Examinateur Invité Invité Examinateur Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie le Professeur André Toulmond pour son accueil au sein de la Station Biologique de Roscoff.

Je voudrais remercier chaleureusement Bernard Kloareg qui a su, par sa passion et son énergie, instaurer une bonne dynamique de travail. Qu'il trouve ici l'expression de mon entière gratitude et le témoignage de mon amitié. Je le remercie également pour l'intérêt qu'il a accordé à ce travail et pour son aide précieuse lors de la rédaction des manuscrits.

Mes plus vifs remerciements vont à Philippe Potin qui m'a apporté ses connaissances et son amitié. Ses compétences et son enthousiasme m'ont soutenu sans cesse au cours de mes années de thèse. Qu'il trouve ici ma reconnaissance et ma gratitude. Je le remercie également pour son aide précieuse lors de la rédaction de cette thèse.

Je remercie Madame Martine Boccara et Messieurs Bernard Fritig, Thierry Langin, André Toulmond, Juan Correa et Jean Marie Joubert, qui me font l'honneur de juger ce travail.

Je remercie le Professeur Juan Correa pour m'avoir accueilli pendant 2 mois au sein de son laboratoire au Chili.

Un très grand merci à Sandrine Boulben pour son aide inestimable lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier ma famille et en particulier ma mère qui m'a donné la force et le courage de continuer sur ce chemin.

Je voudrais également exprimer ma gratitude à toute les personnes du laboratoire UMR 1931 et de la Station Biologique de Roscoff pour leur sympathie et leur gentillesse.

J'exprime aussi ma reconnaissance à Christian, Sophie, Stéphane Boury, Hélène, Stéphane L'Haridon, Karine, Laurence, François, Mohamed, Touria, Denis, Xavier, Fabrice, Marie-Claire, Alain, Florence, Gilles, Gaëlle, Benoît, Myriam, Michel, monsieur le maire : Jacques, Jean-Yves, Robert, Pierre, tous mes compagnons de foot et tous les mespaulitains pour m'avoir manifesté leur amitié et pour les moments forts passés ensemble.

Enfin que toutes les personnes, qui de loin ou de près ont contribué à la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma gratitude et de ma sympathie.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

A- Interactions hôte-pathogène chez les plantes supérieures	1
I) Evénements de reconnaissance	1
a- Reconnaissance spécifique gène pour gène	2
b- Reconnaissance non spécifique : les éliciteurs généraux	3
1) Oligosaccharides	4
1-1) Oligoglucanes	4
1-2) Oligochitines	5
1-3) Oligogalacturonides	5
1-4) Oligosaccharides issus des algues marines	6
2) Peptides et glycoprotéines	7
3) Lipides	9
II) Evénements de transduction du signal	10
a-Transduction intracellulaire	10
1) Protéines G	10
2) Phospholipases	11
3) Flux ioniques	11
4) Phosphorylation et déphosphorylation des protéines	12
5) Espèces activées de l'oxygène	14
5-1) Manifestations et transduction du signal conduisant au burst oxydatif	14
5-2) Sources des espèces activées de l'oxygène	14
5-3) Rôle du burst oxydatif	15
5-4) Rôle du monoxyde d'azote	16
6) Lipoxygénase	17
b- Transduction intercellulaire	18
1) Acide jasmonique	19
2) Ethylène	19
3) Acide salicylique	20
III) Mécanismes de défenses	22
a- Réaction hypersensible	23
b- Renforcement de la paroi cellulaire	24
c- Protéines PR	25
d- Peptides antimicrobiens	27
e- Voies des métabolites secondaires	27
IV) Résistance induite chez les végétaux supérieurs	29
	6.4

B- Interactions hôte-pathogène chez les algues marines	
I) Différentes pathologies des algues marines	31
a- Champignons	31
b- Bactéries	32
c- Endophytes	32
II) Evénements de reconnaissance et de transduction du signal	
III) Réactions de défense	34
,	

IV) Modèle biologique Chondrus crispus-Acrochaete operculata	34
a- Biologie de l'hôte C. crispus	34
b- Paroi cellulaire de C. crispus	35
1) Carraghénanes et leurs propriétés	35
2) Alternance de génération chez les Gigartinacées et les Phyllophoracées et localisa	ition
des carraghénanes dans l'algue	36
c- Culture de C. crispus	37
d- Interaction Chondrus crispus-Acrochaete operculata	38
C- Conclusion	39

D- Objectifs	 40

RESULTATS ET DISCUSSION

crispus-Acrochaete operculata41
I) Le pathogène A. operculata possède une activité carraghénolytique modulée par
les oligocarraghénanes
II) Les oligocarraghénanes contrôlent la physiologie et la virulence du pathogène Acrochaete operculata
III) Les oligocarraghénanes modulent la composition des extraits d'A. operculata
qui déclenchent un burst oxydatif chez les gamétophytes de C. crispus
IV) Le burst oxydatif est indispensable pour la mise en place des réactions de défense chez les gamétophytes de <i>C. crispus</i> 45
B- Caractérisation et purification du signal, provenant du pathogène A. operculata, reconnu par l'hôte <i>C. crispus.</i>
C- Les réactions de défense et la protection induite par les éliciteurs oligosaccharidiques che
U. Crispus
1) Des composes autonuorescents sont fortement synthetises autour des zones de penetratio
par les zoospores d'A. operculata chez les gamétophytes de C. crispus
par les zoospores d'A. operculata chez les gamétophytes de C. crispus
 par les zoospores d'A. operculata chez les gamétophytes de C. crispus
par les zoospores d'A. operculata chez les gamétophytes de C. crispus
 par les zoospores d'A. operculata chez les gamétophytes de C. crispus
 par les zoospores d'A. operculata chez les gamétophytes de C. crispus
 par les zoospores d'A. operculata chez les gamétophytes de C. crispus
 par les zoospores d'A. operculata chez les gamétophytes de C. crispus
 par les zoospores d'A. operculata chez les gamétophytes de C. crispus

D- Les événements de transduction du signal chez C. crispus	.55
I) Les événements qui précèdent le burst oxydatif chez C. crispus	.55
II) La source des espèces activées de l'oxygène chez C. crispus.	.56
III) Les MAP kinases sont indispensables aux événements de signalisation et à la	
mise en place de la résistance chez les gamétophytes de C. crispus	.56
IV) Le SHAM, un inhibiteur de lipoxygénase, inhibe la résistance et l'accumulation des composés autofluorescents autour des zones d'infection par A. operculata chez les	
gamétophytes de C. crispus	.57
E Elisitation des composés halosénés et des mycosponines like amine acids par la signal	<u>م</u> ' (

E- Elicitation des composés halogénés et des mycosporines like amino-acids par le si	gnal d'A
operculata et les oligoalginates chez C. crispus	59
I) Composés halogénés volatils	59
ÍÍ) "Mycosporine-like amino acids"	61

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A- Du point de vue de l'hôte	63
B- Du point de vue du pathogène	65

MATERIEL ET METHODES

A- Matériel végétal	67
B- Préparation et analyse des éliciteurs oligosaccharidiques	67
I) Préparation des oligocarraghénanes	67
II) Extraits acellulaires d'A. operculata	67
III) Analyse des oligosaccharides provenant d'A. operculata	68
IV) Préparation des oligoalginates	69
C- Elicitation du pathogène et de l'hôte	69
D- Expériences d'inoculations	70
E- Mesure des espèces activées de l'oxygène	70
F- Méthodes biochimiques	71
I) Extraction des protéines néosynthétisées chez A. operculata	71
II) Electrophorèse bidimensionnelle	72
a- Isoéléctofocalisation	72
b- SDS-page	72
III) Dosage des protéines	73
VI) Recherche d'activités enzymatiques	73
a- Activité carraghénolytique élicitée chez A. operculata	73
1) Extraction des carraghénanes marqués au soufre 35 à partir de C. crispus	73
2) Mise en évidence d'une activité carraghénolytique	74
b- Recherche d'activité peroxydase élicitée par les oligocarraghénanes chez A.opercula	ata 74
c- Mesure d'activité shikimate déshydrogénase induite par le signal d'A. operculata et	les
oligoalginates respectivement chez les gamétophytes et les sporophytes de	
C. crispus	75

d- Mesure d'activité bromoperoxydase induite par le signal d'A. operculata	
chez les gamétophytes de C. crispus	76
V) Analyse des composés halogénés volatils	76
VI) Analyse des "mycosporines-like amino-acids"	77
·-, ·	

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE

Article 1

Sulfated Oligosaccharides Mediate the Interaction between a Marine Red alga and Its Green algal Pathogenic Endophyte (1999). The Plant Cell, Vol. 11, 1635-1650.

Article 2

Accumulation of UV-fluorescent compounds is associated with natural and oligosaccharideprimed resistance to A. operculata in the marine red alga C. crispus (Soumis).

Article 3

Convergent signal pathways are required for the establishement of resistance to the green alga pathogen *A. operculata* in the marine red alga *C. crispus*:(Soumis).

Article 4

Oligosaccharide recognition signals and defence reaction in marine plant-microbe interactions (1999). Current Opinion in Microbiology, 2, 276-283.

Article 5

The Chondrus crispus-Acrochaete operculata host-pathogen association, a novel model in glycobiology and applied phycopathology. J. Appl. Phycol. (Soumis).

Article 6

Ecological and biochemical aspects in algal infectious deseases. Cahier Biol. Mar. (Soumis).

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

A- Interactions hôte-pathogène chez les plantes supérieures

I) Evénements de reconnaissance

On conçoit aujourd'hui, que l'activation des mécanismes de défense des plantes résulte d'une cascade d'événements au cours desquels les plantes supérieures et les agents pathogènes échangent des signaux moléculaires. Les signaux déclenchant les mécanismes de défense sont appelés des éliciteurs. La reconnaissance par la cellule hôte d'un éliciteur produit par l'agent pathogène ou par la plante constitue l'étape préalable et nécessaire à l'activation des gènes spécifiques conduisant à l'expression de la défense. Certains éliciteurs sont spécifiques (reconnaissance gène pour gène), d'autres sont généraux (reconnaissance non spécifique) (figure 1). Cependant, les événements de reconnaissance sont très peu connus chez les pathogènes (Dean, 1997 ; Xu et al., 1998 ; Lev et al., 1999). Récemment, il a été montré que le pathogène Cochliobolus heterostrophus est capable de reconnaître des signaux libérés par la plante hôte. Cette reconnaissance se traduirait par une activation des protéines G et de certaines MAP kinases (Mitogen Activated Protein). Ces dernières seraient indispensables pour la formation de l'appressorium et conféreraient un pouvoir pathogène à l'agresseur. En effet, des mutants de C. heterostrophus, incapables de synthétiser ces MAP kinases, n'arrivent pas à former un appressorium et à infecter la plante hôte (Lev et al., 1999). Les MAP kinases sont également impliquées dans l'induction de la formation de l'appressorium et du pouvoir pathogène chez un champignon pathogène du riz, Magnaporthe grisea (Xu et Hamer, 1996 ; Xu et al., 1998). De plus, il a été montré que des protéines serine/thréonine kinases sont impliquées dans le pouvoir pathogène du champignon Colletotrichum lindemuthianum, responsable de l'anthracnose chez le haricot (Dufresne et al., 1998). Ces résultats préliminaires montrent qu'il y'aurait une induction de la virulence ou du pouvoir pathogène via une reconnaissance des signaux suivi d'une cascade de signalisation chez les microorganismes pathogènes.



Figure 1 : Schéma d'élicitation des réactions de défense chez les plantes supérieures.

a- Reconnaissance spécifique gène pour gène

Dans les années quarante, le biologiste américain Harold Flor a étudié les interactions du lin et de l'agent pathogène de la rouille du lin, le champignon *Melampsora lini*. Il est le premier à développer le concept de reconnaissance gène pour gène (Flor, 1971). Ce concept postule que la résistance de la plante dépend de l'interaction entre le produit du gène d'avirulence du pathogène et le produit du gène de résistance de la plante. Plusieurs modèles ont été élaborés pour expliquer ce concept. C'est le modèle ligand/récepteur qui a été retenu et validé par des études biochimiques et moléculaires (Keen, 1990 ; Staskawicz et al., 1995 ; Cook, 1998). Ce modèle postule que le produit du gène d'avirulence, ou un métabolite résultant de son activité catalytique, joue un rôle de ligand, reconnu par un récepteur codé par le gène de résistance correspondant.

Plusieurs gènes d'avirulences (avr) ont été caractérisés et étudiés chez les bactéries, les champignons et les virus (De Wit, 1997). Chez les bactéries, le premier gène d'avirulence cloné est le gène avrA isolé de Pseudomonas syringae pv glycinea (Staskawicz et al., 1984). Depuis, d'autres gènes d'avirulence ont été clonés surtout dans les bactéries du genre Xanthomonas et Pseudomonas (De Wit, 1992; Dangl, 1994; Bonas et Van den Ackerveken, 1997). Chez les champignons, l'interaction entre la tomate et son pathogène, Cladosporium fulvum, est le modèle où la reconnaissance gène pour gène est la plus étudiée. Deux gènes d'avirulence, avr4 et avr9, ont été clonés (Van Kan et al., 1991 ; Van den Ackervecken et al., 1992). Les produits de ces deux gènes d'avirulence induisent une réaction hypersensible¹ dans des cultivars de tomate portant respectivement des gènes de résistance Cf-4 et Cf-9 (Hammond-Kosack et al., 1996 ; May et al., 1996). Chez les virus, le système le mieux connu est l'interaction entre le virus de la mosaïque du tabac (VMT) et le tabac, Nicotiana sylvestris. Dans cette interaction la protéine de la coque du VMT induit une réaction hypersensible chez N. sylvestris possédant le gène de résistance N' (Knorr et Dawson, 1988). Le deuxième gène d'avirulence virale identifié code pour une protéine de capside. La protéine de capside du virus X de la pomme de terre (VPX) induit la résistance chez les cultivars de pomme de terre portant le gène de résistance Rx (Bendahmane et al., 1995). C'est le cas aussi de

¹ Un mécanisme de résistance qui se manifeste souvent par l'apparition de zones nécrotiques qui correspondent à une mort cellulaire programmée des premières cellules infectées.

la polymérase du virus de la mosaïque du concombre (VMC) qui induit une réaction hypersensible chez *Vigna unguiculata* (Kim et Palukaitis, 1997). Tous ces gènes d'avirulence, bactériens, fongiques ou viraux, codent en général pour des protéines à activité élicitrice de réponses de défense et inductrice d'une réaction hypersensible chez les plantes portant le gène de résistance correspondant.

Une trentaine de gènes de résistance ont été également isolés. Le premier gène de résistance cloné vérifiant le concept gène pour gène est le gène Pto de tomate (Martin et al., 1993). Ce gène code pour une protéine serine thréonine kinase, qui confère la résistance aux souches bactériennes P. syringae pv tomato portant le gène d'avirulence avr Pto. Récemment, il a été démontré que la thréonine en position 204 de la thréonine kinase joue un rôle clé dans l'interaction avec le produit du gène d'avirulence (Frederick et al., 1998). Un autre gène de résistance a été cloné, il s'agit du gène Cf-9 de tomate (Jones et al., 1994 ; Dixon et al., 1996 ; Hammond-Kosack et Jones, 1997). Ce gène confère une résistance envers un champignon C. fulvum possédant le gène d'avirulence avr9. Il code pour une protéine extracytoplasmique riche en leucine. A l'exception du produit du gène de résistance Pto de la tomate, toutes les protéines codées par les gènes de résistance ont des motifs riches en leucine. Ces motifs interviennent dans les interactions des protéines. Toutefois, la plupart des gènes de résistance de plantes codent pour des protéines possédant des domaines très similaires aux récepteurs présents chez les mammifères, la drosophile et la levure (Hammond-Kosack et Jones, 1997).

b- Reconnaissance non spécifique : les éliciteurs généraux

Les éliciteurs généraux ne reproduisent pas la spécificité de reconnaissance gène pour gène (Keen et Dawson, 1992). Ils ont été identifiés par leur capacité à induire au moins une des réponses typiques de défense, généralement la synthèse des phytoalexines². Ces éliciteurs peuvent être issus de la plante (éliciteurs endogènes) ou des agents pathogènes (éliciteurs exogènes). Ils sont supposés interagir avec un récepteur à la surface de l'hôte (Mehdy, 1994). On distingue des éliciteurs de nature

² Métabolites secondaires (antibiotiques antimicrobiens)



Figure 2 : Schéma de production d'éliciteurs oligosaccharidiques et de leur implication dans l'expression des réponses de défense chez les plantes supérieures

oligosaccharidique, glycoprotéique, peptidique et lipidique (Ryan et Farmer, 1991 ; De Wit et Spikman, 1982 ; Bloch et al., 1984 ; John et al., 1997 ; Coté et al., 1998). Les oligosaccharides et les -glycoprotéines sont les éliciteurs les plus étudiés.

1) Oligosaccharides

Plusieurs oligosaccharides ont été détectés comme étant des éliciteurs de réactions de défense chez les plantes supérieures (figure 2) (Darvill et al., 1992 ; Benhamou et Nicole, 1999). Trois types majeurs d'oligosaccharides ont été identifiés : les glucanes, les oligochitines des parois des champignons, les oligogalacturonides des parois de plantes supérieures. Ces oligosaccharides sont générés par dégradation des polysaccharides par des enzymes spécifiques produites par l'hôte ou par les micro-organismes pathogènes. Une nouvelle classe d'éliciteurs oligosaccharidiques provient aujourd'hui des parois des algues marines. L'activité élicitrice de ces oligosaccharides dépend de leur degré de polymérisation ainsi que de leur extrémité réductrice (Kauss et al., 1989 ; Spiro et al. 1998 ; Simpson et al., 1998). Ces éliciteurs oligosaccharidiques n'induisent pas de mort cellulaire chez les végétaux traités, contrairement à de nombreux éliciteurs peptidiques (élicitines, harpines, voir ci dessous).

1-1) Oligoglucanes

Les glucanes constituent les premiers éliciteurs, isolés chez le champignon *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea, capables d'induire l'accumulation des phytoalexines dans les tissus de soja (Ayers et al., 1976). Les oligo- glucanes sont obtenus après dégradation du polymère par des glucanases. Ces dernières font partie des protéines PR (Pathogenesis Related) synthétisées par la plante après élicitation ou au moment de l'infection par des agents pathogènes (Fritig et al., 1998). Les glucanes sont reconnus par une protéine membranaire qui joue le rôle d'un récepteur chez le soja (Umemoto et al., 1997). Ces oligomères élicitent la synthèse des flavonoïdes³ chez le soja (Miller et al., 1994). Il s'avère que ces molécules sont uniquement reconnues par les espèces de la famille des Fabacées (Hahn, 1996). Cependant, les glucanes de la bactérie

³ Métabolites secondaires

Bradyrhizobium japonicum, symbionte du soja sont capables de supprimer l'accumulation des phytoalexines induites par d'autres glucanes chez cette plante (Mithöfer et al., 1996 ; Bhagwat et al., 1999).

1-2) Oligochitines

La chitine est un polymère constituant la paroi cellulaire de plusieurs champignons. Les oligochitines sont issues de la dégradation de la chitine par cette chitinase. Cette enzyme est une protéine PR produite en réponse à une élicitation ou à une attaque par des agents pathogènes notamment les champignons (Fritig et al., 1998). Ces oligochitines induisent des réponses de défense chez plusieurs plantes supérieures (Darvill et al., 1992 ; Hahn, 1996 ; Benhamou et Nicole, 1999). En effet, ces oligosaccharides élicitent la synthèse des phytoalexines chez le pois, le soja et le persil (Darvill et al., 1992). Ces molécules sont aussi capables d'induire la synthèse des inhibiteurs de protéases, l'accumulation de la callose⁴ et la lignification de la paroi chez plusieurs plantes supérieures (Barber et al., 1989 ; Darvill et al., 1992 ; Hahn, 1996 ; Benhamou et Nicole, 1999). D'autre part, ils induisent des flux ioniques membranaires chez le soja (Darvill et al., 1992).

1-3) Oligogalacturonides

Les oligogalacturonides sont issus des pectines après digestion par des polygalacturonases du pathogène ou des plantes (Cervone et al., 1989 ; Cook et al., 1999 ; Bergey et al., 1999). Ces oligogalacturonides induisent des flux ioniques, une phosphorylation/déphosphorylation des protéines et une production importante des formes activées de l'oxygène chez certaines plantes terrestres (Farmer et al., 1991 ; Legendre et al., 1993a ; Mathieu et al., 1996a ; Droillard et al., 1997 ; Orozco-Cardenas et Ryan, 1999). D'autre part, ils élicitent la synthèse des inhibiteurs de protéases (Bishop et al., 1984 ; Farmer, 1994 ; Doares et al., 1995), de certaines protéines PR (Davis et Hahlbrock, 1987 ; Broekaert et Peumans, 1988 ; Boudart et al., 1998), des phytoalexines (Hahn et al., 1981 ; Walker-Simmons et al., 1983 ; Jin and West, 1984) et de l'éthylène

⁴ Métabolite secondaire (polymère de – 1,3 glucane)

(Simpson et al., 1998) chez de nombreuses plantes supérieures. Ils sont également capables d'induire la synthèse de lignine ainsi que l'accumulation de glycoprotéines riches en hydroxyprolines au niveau des parois végétales (Coté et Hahn, 1994 ; Boudart et al., 1995). De plus, ces oligosaccharides sont impliqués dans la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique (Doares et al., 1995 ; Norman et al., 1999). Ces oligomères sont aussi responsables de certaines nécroses rencontrées chez la vigne (Cervone et al., 1987). Par ailleurs, une inhibition de la réaction hypersensible a été observée chez le tabac élicité par ces molécules (Baker et al., 1990).

1-4) Oligosaccharides issus des algues marines

Les oligosaccharides issus des algues marines sont également impliqués dans l'élicitation des réactions de défense chez les plantes supérieures (Joubert et al., 1998; Klarzynski et al., 2000). Ces éliciteurs sont obtenus après digestion de polysaccharides pariétaux ou de réserves par des enzymes spécifiques (Boyen et al., 1990a ; Potin et al., 1991 ; 1995 ; 1999 ; Lépagnol-Descamps et al., 1998). Ils protègent efficacement plusieurs plantes agronomiques telles que le blé, l'orge, la vigne et les pommiers contre l'infection par des champignons (Joubert et al., 1998). Appliqués sur des suspensions cellulaires ces oligosaccharides induisent un burst oxydatif, une alcalinisation du milieu et l'augmentation de l'activité de certaines enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de l'acide salicylique et l'acide jasmonique chez le tabac (Joubert et al., 1998 ; Klarzynski et al., 2000). D'autre part, ils sont capables d'induire la synthèse des phytoalexines chez la luzerne et le tabac (Kobayashi et al., 1993 ; Klarzynski et al., 2000) ainsi que la synthèse de certaines protéines PR chez le tabac et le riz (Inui et al., 1997 ; Klarzynski et al., 2000).

Introduction générale

2) Peptides et glycoprotéines

Les effets des éliciteurs peptidiques et glycoprotéiques sur les plantes supérieures ont été bien documentés (Ricci et al., 1989 ; Nürnberger et al., 1994 ; Baillieul et al, 1995 ; 1996 ; Pugin et al., 1997 ; Ebel et Mithöfer, 1998). Parmi ces éliciteurs, certains induisent une réaction hypersensible, d'autres seulement des réponses de défense sans mort cellulaire (Hahlbrock et al., 1995 ; Baillieul et al., 1995 ; 1996). En effet, une glycoprotéine de 42 kDa produite par l'oomycète Phytophthora megasperma f. sp. glycinea est capable d'induire des réactions de défense sans mort cellulaire. Cette glycoprotéine induit des échanges ioniques, l'accumulation du peroxyde d'hydrogène, la synthèse d'éthylène et de phytoalexines ainsi que l'expression de gènes qui codent pour certaines protéines PR (Parker et al., 1991; Nürnberger et al., 1994). La partie peptidique est responsable de l'activité élicitrice. De plus, un fragment peptidique de 13 acides aminés (pep 13) généré après protéolyse de la glycoprotéine a les mêmes effets éliciteurs que la glycoprotéine entière (Nürnberger et al., 1994). Par ailleurs, il existe d'autres éliciteurs glycoprotéiques induisant des lésions nécrotiques et l'activation des gènes de défense. Par exemple, une glycoprotéine de 32 kDa isolée à partir de plusieurs espèces de Phytophthora induit la mort cellulaire, l'accumulation de l'acide salicylique, l'expression de certains gènes de défense et une résistance systémique acquise chez le tabac (Baillieul et al., 1995 ; 1996 ; Dorey et al., 1997). Deux types de protéines élicitrices de réaction hypersensible et de gènes de défenses sont bien étudiés : il s'agit des harpines et des élicitines⁵ (Yu, 1995 ; Adam et al., 1997 ; Ebel et Mithöfer, 1998).

Les harpines sont des protéines acides de 44 kDa riches en glycine. Elles sont isolées à partir de deux genres de bactéries phytopathogènes, *Erwinia* et *Pseudomonas* (Wei et al., 1992 ; Baker et al., 1993 ; He et al., 1993 ; Arlat et al., 1994 ; Kim et Beer, 1998). Elles induisent des flux ioniques, la production des espèces activées de l'oxygène et l'activation des protéines kinases dans des suspensions cellulaires de tabac et d'*Arabidopsis* (Baker et al., 1993 ; Popham et al., 1995 ; Adam et al., 1997 ; Desikan et al., 1999). Ces protéines sont également capables d'induire une réaction hypersensible et d'activer l'expression de certains gènes de défense (Wei et al., 1992 ; Desikan et al., 1998). Elles élicitent aussi la mise en place d'une résistance systémique acquise chez certaines

⁵ Petites protéines à point isoélectrique acide (-élicitines) ou basique (-élicitines)

plantes terrestres (Strobel et al., 1996 ; Dong et al., 1999). En effet, ces éliciteurs induisent l'expression de certaines protéines PR et une résistance systémique.

Les élicitines sont des protéines de 10 kDa isolées à partir des oomycètes du genre *Phytophthora* (Ricci et al., 1992 ; Kamoun et al., 1994 ; Boissy et al., 1996). Elles sont classées en fonction de leur point isoélectrique. Les -élicitines ont un point isoélectrique acide tandis que les -élicitines sont des protéines à point isoélectrique basique. L'élicitine est capable d'induire une réaction hypersensible ainsi qu'une résistance systémique acquise envers des bactéries et des champignons chez le tabac, le navet et le radis (Ricci et al., 1989 ; Kamoun et al., 1993). Parmi d'autres réponses de défense élicitées par les élicitines on trouve : l'augmentation de la synthèse de l'éthylène, des phytoalexines et de certaines protéines PR (Milat et al., 1991 ; Yu, 1995).

La cryptogéine est une élicitine de type isolée à partir de *Phytophthora cryptogea*. Cette élicitine induit une mort cellulaire, des flux ioniques, la phosphorylation de protéines, la production des espèces activées de l'oxygène, la synthèse d'éthylène et l'accumulation de phytoalexines chez le tabac (Ricci et al., 1989 ; Milat et al., 1991 ; Viard et al., 1994 ; Tavernier et al., 1995 ; Pugin, et al., 1997). La production des espèces activées de l'oxygène induite par la cryptogéine semble impliquer une NADPH oxydase (Pugin et al., 1997 ; Barbier-Brygoo et al., 1997). D'autre part, des plants de tabac transformés par le gène qui code pour la cryptogéine, et qui sont sous contrôle d'un promoteur inductible, sont capables de produire cette molécule signal au moment de l'interaction avec un oomycète virulent *Phytophthora parasitica* var *nicotianae*. Cette molécule, ainsi libérée, induit une réaction hypersensible et l'expression des gènes de défense au niveau des zones nécrotiques chez ces plantes transgéniques (Keller et al., 1999).

La systémine est aussi un peptide éliciteur des réactions de défense contre les pathogènes herbivores (Pearce et al., 1991 ; Bergey et al., 1996 ; 1999). Ce polypeptide, de 18 acides aminés, a été identifié pour la première fois chez la tomate (Pearce et al., 1991). Depuis, des peptides similaires à la systémine ont été identifiés chez de nombreuses solanacées (Schaller, 1999). En effet, cet éliciteur synthétisé à partir de la prosystémine est capable d'induire un burst oxydatif, des flux ioniques membranaires, une alcalinisation du milieu extracellulaire, des activitées MAP kinases, la synthèse de polygalacturonases et l'accumulation d'inhibiteurs de protéases chez la tomate (Doares et al., 1995 ; Stratmann et Ryan, 1997 ; Moyen et al., 1998 ; Stennis et al., 1998 ; Bergey et



Figure 3 : Modèle d'élicitation des réponses de défense par la systémine via l'acide jasmonique chez la tomate (d'après Schaller, 1999).

al., 1999; Orozco-Cardenas et Ryan, 1999; Schaller et Oecking, 1999). La systémine élicite également l'activité de deux enzymes, la phospholipase A2 et la lipoxygénase, impliquées dans la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique et d'autres octadécanoïdes (Farmer et Ryan, 1992; Heitz et al., 1997; Lee et al., 1997; Schaller, 1999). En outre, des plants de tomates transformés par un ADNc antisens de la prosystémine sont incapables de synthétiser la systémine et sont sensibles aux herbivores (Howe et Ryan, 1999). De plus, une surexpression de la prosystémine est suffisante pour induire la mise en place des réactions de défense vis à vis des insectes chez la tomate (Bergey et Ryan, 1999). Une fois libérée, par blessure ou par attaque par des herbivores, la systémine se déplace, via les vaisseaux conducteurs, dans toute la plante entière pour éliciter la mise en place des réactions de défense (Schaller, 1999). Une protéine de 50 kDa liée à la systémine, au moment de la signalisation, a été identifiée au niveau de la membrane plasmique de la tomate (Schaller et Ryan, 1994). Récemment, un récepteur membranaire de 160 kDa qui reconnaît cet éliciteur a été mis en évidence chez Lycopersicon peruvianum (Scheer et Ryan, 1999). Ces résultats montrent le rôle important que joue la systémine dans l'élicitation et la mise en place des réponses de défense chez la tomate vis à vis de ces pathogènes herbivores ou en réponse à la blessure (figure 3).

3) Lipides

L'acide arachidonique est un éliciteur lipidique présent dans certains champignons pathogènes. Cet acide gras est libéré lors de l'infection de la pomme de terre par son oomycète pathogène *Phytophthora infestans*. La présence de cet éliciteur dans les tissus infectés joue un rôle dans le déclenchement des processus de défense tels que l'accumulation des phytoalexines (Bostock et al., 1981) ou encore l'augmentation de l'activité de certaines enzymes comme les lipoxygénases (Bostock et al., 1992), la phénylalanine ammonia-lyase (Maina et al., 1984) et les peroxydases (Bostock et al., 1986). L'ergostérol, qui est le stérol majeur de la membrane lipidique chez les champignons, induit l'alcalinisation du milieu de culture des suspensions cellulaires de tomate (Granado et al., 1995). Les sphingolipides libérés lors de l'infection du riz par un champignon pathogène *Magnaporthe grisea* induisent une réaction hypersensible et une accumulation de phytoalexines chez l'hôte (Koga et al., 1998).

II) Evénements de transduction du signal

a- Transduction intracellulaire

La transduction du signal à l'intérieur de la cellule est initiée par une reconnaissance de l'éliciteur libéré par le pathogène, ou par la plante par un récepteur localisé au niveau de la membrane plasmique de l'hôte. Cette perception du signal, via les récepteurs, va induire plusieurs phénomènes qui vont conduire à la mise en place d'un système de défense local et ou général envers les agressions des agents pathogènes.

1) Protéines G

Les protéines G sont généralement associées à des récepteurs membranaires. La stimulation du récepteur induit une augmentation de l'activité des protéines G. Ces dernières sont impliquées dans la transduction du signal et l'induction des réactions de défense chez les plantes (Scheel, 1998). En effet, le mastoparan, un activateur de protéines G, induit une accumulation du peroxyde d'hydrogène dans des cellules de soja (Legendre et al. 1992). Cette molécule induit également une entrée massive des ions calcium dans les cellules de tabac (Chandra et Low, 1997). De même, lors de l'interaction entre le champignon Cladosporium fulvum et la tomate, les événements précoces comme l'activation de l'ATPase membranaire, de la NADPH oxydase, des canaux calciques et d'une peroxydase dépendent tous des protéines G (Vera-Estralla et al., 1994 ; Gelli et al., 1997). Des plantes transgéniques, exprimant la toxine cholérique qui induit constitutivement et irréversiblement les protéines G, présentent une teneur très élevée en acide salicylique et en protéines PR (Beffa et al., 1995 ; Yang et al, 1997). Récemment il a été montré que l'inhibition des protéines G, par un inhibiteur spécifique tel que la suramine, empêche la production des espèces activées de l'oxygène chez le soja traité par le produit du gène avrA de Pseudomonas syringae pv glycinea (Rajasekhar et al., 1999)

Introduction générale

2) Phospholipases

Chez les animaux, les protéines G induisent l'activation de phospholipases C. Ces enzymes sont responsables de la libération de diphosphatidylinositol 4,5 biphosphate, d'inositol-1,4,5-triphosphate libre (IP3) et de diacylglycérol (DAG) à partir des phospholipides membranaires. L'IP3 stimule la libération intracellulaire de calcium à partir du réticulum endoplasmique. Le DAG stimule la synthèse d'une protéine kinase de type C (Dixon et al., 1994). Les phospholipases jouent aussi un rôle important dans la transduction du signal induit par la reconnaissance éliciteur-récepteur et par les protéines G chez les plantes (Henderson et al., 1989 ; Legendre et al., 1993b ; Chandra et al., 1996a ; Wojtaszek, 1997; Nárvaez-Vásquez et al., 1999). En effet, la phospholipase de type A2 est impliquée dans le burst oxydatif induit dans des cellules de soja traitées avec un éliciteur de la paroi du champignon pathogène Verticilium dahliae (Chandra et al., 1996a). Cette enzyme est également impliquée dans l'interaction entre la tomate et certains insectes herbivores (Lee et al., 1997; Schaller, 1999). Elle permet la dégradation des phospholipides membranaires et ainsi la synthèse d'acides gras insaturés tels que l'acide linolénique chez les plantes. Cet acide gras rentre dans la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique (Schaller, 1999). Ces enzymes sont aussi probablement impliquées dans l'induction du burst oxydatif induit par le gène avr9 chez le tabac (Piedras et al., 1998). Cependant, il existe des éliciteurs qui induisent un burst oxydatif sans qu'il y ait activation de certaines phospholipases (Chandra et al., 1996b). Ces résultats montrent qu'il existe plusieurs voies de transduction qui peuvent aboutir à l'induction d'une même réponse chez certaines plantes.

3) Flux ioniques

Les réactions les plus précoces en réponse à un éliciteur ou à un pathogène chez les cellules de plantes sont des changements de la perméabilité membranaire. Ces changements se traduisent par une entrée importante des ions calcium et des protons (alcalinisation du milieu extérieur) et une sortie massive des ions potassium et chlorures (Atkinson et al, 1996 ; Yang et al., 1997 ; Pugin et al., 1997 ; Scheel; 1998 ; Zimmermann et al., 1998). L'effet des flux ioniques dans la signalisation chez les plantes a été

Introduction générale

particulièrement bien étudié dans le système pep 13-cellules de persil. Le traitement de cellules de persil avec l'éliciteur pep 13 induit un efflux de potassium et chlore lié à un influx de calcium et de protons (Nürnberger et al., 1994). Les flux de protons semblent également jouer un rôle important dans l'induction et la régulation des réactions de défense chez le tabac et la tomate (Mittler et al., 1995 ; Schaller et Oecking, 1999). Des canaux calciques membranaires impliqués dans le processus de signalisation ont été caractérisés chez la tomate et le persil (Gelli et al., 1997 ; Zimmermann et al., 1997). Un traitement des cellules de tabac par des éliciteurs engendre une augmentation massive de la teneur en calcium cytoplasmique (Chandra et Low, 1997). La même réponse a été observée chez la dolique lors de l'interaction incompatible avec le champignon Uromyces vignae (Xu et Heath, 1998). Par ailleurs, l'inhibition de ces canaux par des inhibiteurs spécifiques ou une élimination du calcium dans le milieu de culture conduit à une inhibition du burst oxydatif et de l'accumulation de phytoalexines (Felix et al., 1994 ; Jabs et al., 1997 ; Piedras et al., 1998 ; Rajasekhar et al., 1999). De même, un traitement des plantes avec des ionophores, comme l'amphotéricine B, stimulent la production des espèces activées de l'oxygène et l'expression de gènes de défense (Tavernier et al., 1995 ; Jabs et al., 1997). Tous ces résultats montrent l'importance des flux ioniques dans la transduction du signal et la mise en place des mécanismes de défense induits par les éliciteurs et les pathogènes chez les plantes supérieures.

4) Phosphorylation et déphosphorylation des protéines

Des études pharmacologiques ont montré que la phosphorylation et déphosphorylation des protéines jouent un rôle très important dans les événements de signalisation et de mise en place des réactions de défense chez les plantes supérieures (Felix et al., 1994 ; Levine et al., 1994 ; Yang et al., 1997 ; Piedras et al., 1998 ; Scheel, 1998 ; Rajasekhar et al., 1999 ; Romeis et al., 1999 ; Desikan et al., 1999). En effet, l'inhibition de ces protéines kinases, par des inhibiteurs comme la staurosporine ou le K252, empêche l'alcalinisation du milieu de culture de suspensions cellulaires traitées par des éliciteurs protéiques ou oligosaccharidiques (Felix et al., 1991a ; 1993 ; Viard et al., 1994 ; Mathieu et al., 1996a ; 1996b ; Droillard et al., 1997). De même, le traitement de plusieurs plantes par ces mêmes inhibiteurs inhibe l'accumulation des espèces activées de l'oxygène,

l'activation de certaines protéines kinases, la réaction hypersensible, l'accumulation de l'éthylène, l'activité phénylalanine ammonnia-lyase, l'activation de certains gènes de défense et l'accumulation des phytoalexines (Grosskopf et al., 1990 ; Felix et al., 1991a ; Levine et al., 1994 ; Chandra et Low, 1995 ; Jabs et al., 1997). En outre, des protéines kinases présentant une grande homologie avec les MAP kinases de la levure et des mammifères sont également impliquées dans les cascades de signalisation et de mise en place de réaction de défense chez les plantes supérieures (Hirt, 1997 ; Scheel, 1998). Il a été également démontré que certaines MAP kinases ne sont pas impliquées dans l'induction du burst oxydatif mais restent indispensables à la mise en place des mécanismes de défense chez les plantes supérieures (Yang et al., 1997 ; Subramaniam et al., 1997; Drög-Laser et al., 1997; Romeis et al., 1999). Une MAP kinase induite par l'acide salicylique, appelée SIP kinase (pour Salicylate Induced Protein kinase) a été purifiée à partir du tabac (Zhang et Klessig, 1997). Cette protéine kinase semble jouer un rôle important dans la régulation des réponses de défense chez le tabac (Zhang et Klessig, 1998a ; 1998b). Réciproquement, des inhibiteurs de phosphatases tels que la calyculine A et la cantharidine peuvent induire des réponses de défense en l'absence d'éliciteur (Levine et al., 1994; Schaller et Oecking, 1999). Ces résultats montrent l'existence de plusieurs voies de signalisation qui impliquent plusieurs protéines kinases différentes et qui mènent aux mêmes réponses de défense chez les plantes supérieures. Par ailleurs, il a été montré pour la première fois l'implication des tyrosines kinases dans les événements de signalisation chez le soja infecté par Pseudomonas syringae pv glycinea (Rajasekhar et al., 1999).

Introduction générale

5) Espèces activées de l'oxygène

5-1) Manifestations et transduction du signal conduisant au burst oxydatif

La production transitoire des espèces activées de l'oxygène constitue une des réponses impliquées dans cette cascade de signalisation. Ces formes activées de l'oxygène sont décelées dans les premières minutes voire quelques heures après l'élicitation. Elles sont constituées essentiellement de l'anion superoxyde (O_2^-), du radical hydroxyl (OH') et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'accumulation importante de ces molécules, communément appelée "burst oxydatif", joue un rôle clé dans l'induction des réponses de défense chez les plantes supérieures (Mehdy, 1994 ; Baker et Orlandi, 1995 ; Lamb et Dixon., 1997 ; Yang et al., 1997 ; Bolwell, 1999). Ce burst oxydatif se situe en aval des phospholipases, des échanges ioniques et des phénomènes de phosphorylation (Wojtaszek, 1997). En effet, les phospholipases, les échanges ioniques et la phosphorylation / déphosphorylation des protéines sont importants pour l'activation d'un stress oxydatif (Nürnberger et al., 1994 ; Tavernier et al., 1995 ; Levine et al., 1994 ; Chandra et al., 1996 ; Jabs et al., 1997 ; Romeis et al., 1999 ; Rajasekhar et al., 1999).

5-2) Sources des espèces activées de l'oxygène

Plusieurs enzymes impliquées dans le burst oxydatif ont été étudiées (Bolwell et Wojtaszek, 1997 ; Wojtaszek, 1997) : Les NADPH oxydases, certaines peroxydases et une oxalate oxydase.

Les NADPH oxydases sont susceptibles de générer des espèces activées de l'oxygène chez différentes plantes supérieures. L'utilisation d'inhibiteurs de NADPH oxydases de mammifère permet de bloquer le burst oxydatif après élicitation dans plusieurs systèmes végétaux (Levine et al., 1994 ; Jabs et al., 1997 ; Piedras et al., 1998 ; Romeis et al., 1999). L'utilisation des anticorps dirigés contre des sous unités de NADPH oxydase de mammifères a permis de mettre en évidence des homologues de cette enzyme chez le tabac, la tomate, le soja et *Arabidopsis* (Desikan et al., 1996 ; Dwyer et al., 1996 ; Xing et al., 1997). Les gènes codant pour des homologues à la sous unité gp91 phox de NADPH oxydase de mammifère ont été clonés chez le riz, *Arabidopsis*, la tomate et une plante aquatique *Potamogeton crispus* (Groom et al., 1996 ; Kieffer et al., 1997 ; Keller et al., 1998 ; Torres et al., 1998 ; Amicucci et al., 1999).

La germine ou oxalate oxydase est une autre enzyme capable de produire des espèces activées de l'oxygènes chez l'orge et le blé (Dumas et al., 1995 ; Zhang et al., 1995 ; Hurkman et Tanaka, 1996 ; Requena et Bornemann, 1999). Deux gènes codant pour cette enzyme ont été identifiés chez l'orge (Zhou et al., 1998). Les transcrits et l'activité de cette enzyme sont fortement élicités chez l'orge après infection par le champignon *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (Zhou et al., 1998 ; Wei et al., 1998). L'expression transitoire de ce gène dans les cellules épidermiques du blé lui confère une résistance aux pathogènes (Schweizer et al. 1999). De plus ce gène, responsable de la production de peroxyde d'hydrogène chez le blé, est régulé par des facteurs biotiques et abiotiques (Berna et Bernier, 1999).

Certaines peroxydases sont également responsables de la production des espèces activées de l'oxygène chez certaines plantes supérieures notamment le haricot et la laitue (Bestwick et al., 1997 ; Bolwell et Wojtaszek, 1997 ; Wojtaszek, 1997 ; Bestwick et al., 1998). Une peroxydase de 46 kDa capable de produire du peroxyde d'hydrogène a été ainsi identifiée chez le haricot (Brown et al., 1998).

5-3) Rôle du burst oxydatif

De nombreux travaux ont montré que les formes activées de l'oxygène pourraient intervenir dans le processus de nécrose cellulaire observé lors de la réaction hypersensible (Levine et al., 1994 ; Lamb et Dixon, 1997). De même, elles pourraient jouer le rôle de molécule signal dans l'induction de la mort cellulaire programmée au cours de la réaction hypersensible (Greenberg, 1997). Il a été également suggéré que le peroxyde d'hydrogène orchestre la mort hypersensible chez le soja (Levine et al., 1994). Ce burst oxydatif joue aussi un rôle important comme messager secondaire dans l'activation de gènes de défense (Jabs et al., 1997). En effet, le burst oxydatif est impliqué dans la synthèse de phytoalexines chez le soja, le persil et le haricot (Mehdy et al., 1996 ; Jabs et al., 1997). De plus, des plantes transgéniques de tabac qui accumulent constitutivement du peroxyde d'hydrogène possèdent des niveaux élevés de certaines protéines PR (Chamnongpol et al., 1998). Les formes activées de l'oxygène peuvent aussi intervenir dans le renforcement de la paroi végétale (Wojtaszek et al., 1997 ; Brown et al., 1998 ; Bolwell, 1999). En particulier, le peroxyde d'hydrogène induit une insolubilisation de certaines protéines pariétales riches en proline ou en hydroxyproline (HRGP) (Otte et Barz, 1996 ; Brady et Fry, 1997). L'activation des gènes de la gluthatione -S- transfèrase, la phénylalanine ammonia-lyase et certaines MAP kinases est aussi engendrée par l'accumulation du peroxyde d'hydrogène chez plusieurs espèces végétales (Yang et al, 1997 ; Lamb et Dixon, 1997 ; Romeis et al., 1999). Le peroxyde d'hydrogène est également impliqué dans la voie de biosynthèse de l'acide salicylique et l'acide jasmonique ainsi que dans la résistance systémique acquise (Alvarez et al., 1998 ; Dong, 1998 ; Van Camp et al., 1998 ; Zhang et al., 1998a ; 1998b). D'autre part, l'inhibition de l'accumulation du peroxyde d'hydrogène par le DPI, inhibiteur de la NADPH oxydase des mammifères, induit une inhibition de la synthèse de certaines réponses de défense telle que l'accumulation des phytoalexines chez le persil (Jabs et al., 1997).

Toutefois, chez certaines plantes ces formes activées de l'oxygène ne sont pas suffisantes pour mettre en place toutes les réactions de défense (Glazener et al., 1996 ; Dorey et al., 1999). En effet, les formes activées de l'oxygène semblent ne pas être impliquées dans l'induction des phytoalexines chez le tabac et le soja (Levine et al., 1994 ; Rustérucci et al., 1996). Il a été également démontré que le peroxyde d'hydrogène n'est pas le signal primaire qui régule l'activation de plusieurs réponses de défense chez les suspensions cellulaires de tabac (Dorey et al., 1999).

5-4) Rôle du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est une petite molécule diatomique inorganique considérée comme une autre forme activée de l'oxygène. Cette molécule est impliquée dans les réactions immunitaires chez les mammifères (Mayer et Hemmens, 1997) et dans les réactions de défense chez les plantes terrestres (Durner et al., 1998 ; Delledonne et al., 1998 ; Durner et Klessig, 1999). En effet, le NO active la production de phytoalexines chez le pois et la pomme de terre (Leshem et al., 1997 ; Noritake et al., 1996). Le lien supposé entre le NO et le burst oxydatif a été renforcé par les récents résultats montrant que le NO joue un rôle majeur durant la réaction hypersensible



Figure 4 : Modèle hypothétique montrant le rôle d' H 2O2 et du NO dans l'induction de l'expression de gènes et de la mort cellulaire pendant les interactions plantes-pathogènes (d'après Camp et al., 1998).

Les flèches en pointillés marquées par un (+) indiquent les effets agonistes de l'acide salicylique et de l'éthylène sur la mort cellulaire médiée par H 2O2.

(Dangl, 1998). De même, le NO potentialise la mort cellulaire hypersensible induite par les autres formes activées de l'oxygène chez le soja (Delledonne et al., 1998). La génération de NO par des donneurs chimiques de NO a provoqué une augmentation de la mort cellulaire médiée par le peroxyde d'hydrogène. Une inhibition de la production de cette molécule bloque également la réaction hypersensible induite par Pseudomonas syringae pv. glycinae chez Arabidopsis thaliana (Delledonne et al., 1998). Par ailleurs, le NO induit l'expression des gènes codant pour la phénylalanine ammonia-lyase et la chalcone synthase chez le tabac (Durner et al., 1998). Cette induction est réprimée par l'inhibition de la synthèse de NO (Durner et al., 1998). L'expression d'autres gènes, comme celui codant pour la gluthatione-S-transfèrase (GST) ou pour certaines protéines PR, est induite à la fois par le NO et par le peroxyde d'hydrogène (Delledone et al., 1998 ; Durner et al., 1998). Ces résultats montrent que le NO conduit à l'expression de gènes de défense à travers au moins deux voies. La première est liée à la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et des flavonoïdes. Cette voie est strictement dépendante du NO mais indépendante du peroxyde d'hydrogène et de l'acide salicylique (Haenen et Bast, 1999). La seconde est liée à l'expression de gènes codant pour des facteurs antioxydants (GST) et des protéines telles que les protéines PR. Cette voie est dépendante du peroxyde d'hydrogène et de l'acide salicylique (figure 4), (Camp et al., 1998). Une autre série de travaux sur la pomme de terre suggère que le NO pourrait exercer une activité antioxydante et contrebalancer les effets toxiques des espèces activées de l'oxygène (Beligni et Lamattina, 1999).

6) Lipoxygénase

La lipoxygénase est une enzyme qui catalyse l'addition de l'oxygène moléculaire sur des acides gras insaturés, qui ont une structure de type Z, Z-1,4 pentadiène. Chez les végétaux supérieurs deux acides gras ont une telle structure. Il s'agit de l'acide linoléique (C18:2) et de l'acide linolénique (C18:3). L'affinité de cette enzyme pour le type d'acide gras (C18:2, C18:3) varie suivant les espèces végétales. En outre à l'intérieur de la même espèce, deux lipoxygénases ayant une spécificité différente peuvent exister (Ohta et al., 1990 ; Koch et al., 1992 ; Peng et al., 1994). De même, il existe plusieurs isoformes de cette enzyme dans une même plante (Grayburn et al., 1991). Les lipoxygénases

permettent souvent la synthèse de deux hydroperoxydes, 9 et 13. C'est l'hydroperoxyde 13 qui mène à la formation de plusieurs octadécanoïdes dont l'acide jasmonique et le méthyljasmonate. Ces composés jouent un rôle important dans les mécanismes de défense, soit comme molécules signal capables d'induire l'activation des gènes spécifiques (comme par exemple l'acide jasmonique et le méthyljasmonate) soit par leur effet directement toxique sur le pathogène (comme c'est le cas pour les aldéhydes, l'acide jasmonique et certains époxydes). En effet, l'attaque d'un pathogène provoque une augmentation très importante de la teneur en lipoxygénase dans plusieurs espèces (Fournier et al., 1993; Peng et al., 1994; Saravitz et Siedow, 1995; Rosahl, 1996 ; Véronesi et al., 1996 ; Rancé et al., 1998 ; Royo et al., 1999). L'inhibition de cette enzyme bloque l'induction des mécanismes de défense chez certaines plantes et engendre une sensibilité aux agents pathogènes (Rancé et al., 1998; Royo et al., 1999). En particulier, la transformation de plants de tabac par un ADNc antisens de la lipoxygénase rend ces plantes très sensibles à leur pathogène Phytophthora parasitica (Rancé et al., 1998). De même, la transformation de plants de tomates par l'antisens de la lipoxygénase réduit la synthèse des inhibiteurs de protéases chez ces plantes et ainsi les rend sensibles aux insectes (Royo et al., 1999).

b- Transduction intercellulaire

En général, l'induction d'une résistance locale engendre l'établissement d'une résistance générale dans les tissus non infectés de la plante. Cette réponse peut durer plusieurs jours ou plusieurs semaines. Cette résistance systémique acquise permet à la plante de lutter contre toute infection ultérieure. La mise en place de cette résistance systémique acquise au niveau des tissus non infectés implique la transmission intercellulaire d'un signal dans toute la plante. Cette transmission se fait par trois molécules endogènes : l'acide jasmonique, l'acide salicylique et l'éthylène.

Introduction générale

1) Acide jasmonique

L'acide jasmonique et le méthyljasmonate sont des acides gras octadécanoïques synthétisés à partir de l'acide linolénique (Parchmann et al., 1997). Ces acides gras sont impliqués dans l'induction des réactions de défense chez les plantes supérieures (Creelman et Mullet, 1997; Wasternack et Parthier, 1997; Yang et al., 1997; Glazebrook, 1999 ; Schaller, 1999). En effet, ces molécules jouent un rôle dans la stimulation, locale et à distance, de l'expression des inhibiteurs de protéases dans les feuilles de tomates en réponse à la blessure (Farmer et Ryan, 1990). Le méthyljasmonate induit également l'expression d'inhibiteurs de protéases dans les cultures de cellules de tabac (Rickauer et al., 1992). Ces acides gras activent l'expression des gènes de la phénylalanine ammonialyase, de la chalcone synthase et des lipoxygénases (Creelman et al., 1992 ; Gundlach et al., 1992 ; Véronési et al., 1996 ; Sharan et al., 1998). Ces molécules induisent également la synthèse de peptides antifongiques de type défensines chez Arabidopsis thaliana ainsi que la synthèse de certaines protéines PR chez le tabac (Penninckx et al., 1996 ; Xu et al., 1994 ; Penninckx et al., 1998). Des mutants, incapables de synthétiser l'acide jasmonique, n'accumulent plus d'inhibiteurs de protéases et sont sensibles à l'attaque des insectes et autres pathogènes (Howe et al., 1996 ; McConn et al., 1997 ; Vijayan et al., 1998). Par ailleurs, un apport exogène d'acide jasmonique et de méthyljasmonate induit une résistance systémique acquise envers Phytophthora infestans chez la pomme de terre et la tomate (Cohen et al., 1993). Le rôle de ces deux molécules dans la résistance des plantes semble dépendre des espèces végétales et de la nature des réponses de défense étudiées. Chez le riz et l'orge par exemple, l'induction de certains gènes de protéines PR et d'une résistance locale ne semble pas impliquer l'acide jasmonique (Schweizer et al., 1993 ; Schweizer et al., 1997).

2) Ethylène

L'éthylène est une hormone végétale dérivée de la méthionine. Cette hormone est impliquée entre autre dans les mécanismes de défense chez les plantes (Ecker, 1995). La biosynthèse de cette molécule augmente rapidement en réponse à des éliciteurs ou lors de l'infection par des agents pathogènes (Grosskopf et al., 1990 ; Milat et al., 1991a ; Rickauer et al., 1992 ; Sticher et al., 1997). L'éthylène induit également l'expression de



Figure 5 : Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes

certains gènes de défense, notamment les gènes qui codent pour certaines protéines PR (Boller et al., 1983; Boller, 1990). En contre partie, l'augmentation de la synthèse de l'éthylène chez le tabac n'induit pas la production des inhibiteurs de protéases (Rickauer et al., 1992). Réciproquement, des inhibiteurs de la synthèse de l'éthylène (l'acide salicylique par exemple) n'inhibent pas la production des inhibiteurs de protéases induite par élicitation. De plus, l'application de méthyljasmonate induit la production des inhibiteurs de protéases et inhibe partiellement la synthèse de l'éthylène. Chez le tabac, l'induction de certaines protéines PR est beaucoup plus importante lorsque le méthyljasmonate et l'éthylène sont appliqués en combinaison (Xu et al., 1994). Par ailleurs, des mutants d'A. thaliana, insensibles à l'éthylène, sont toujours résistants à une bactérie pathogène Pseudomonas syringae (Bent et al., 1992). Des plantes de tabac transformées par un gène qui les rend insensibles à l'éthylène sont également toujours résistantes au virus de la mosaïque du tabac (Knoester et al., 1998). Outre l'activation de la synthèse de certaines protéines PR, l'éthylène pourrait également intervenir dans le renforcement de la paroi végétale en induisant la liaison oxydative des glycoprotéines riches en hydroxyprolines (HRGP) (Enyedi et al., 1992). Il a été suggéré que l'éthylène pourrait être le signal mobile impliqué dans l'établissement de la résistance systémique acquise (Boller, 1990). Des tissus de pois infectés expriment fortement une -1,3 glucanase et une chitinase malgré un traitement avec un inhibiteur de la synthèse de l'éthylène (Mauch et al., 1984). De même, des tabacs traités avec l'étéphon, un produit qui se décompose en éthylène, ne développent pas de résistance systémique acquise à la suite de l'infection par le virus de la mosaïque du tabac (Brederode et al., 1991). Ce résultat indique que l'éthylène n'est pas impliqué ou n'est pas suffisant pour induire seul la résistance systémique acquise. Cette hypothèse a été vérifiée grâce à des mutants d'A. thaliana insensibles à l'éthylène (Lawton et al., 1994 ; 1995).

3) Acide salicylique

L'acide salicylique est un composé phénolique issu de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (figure 5). Il est formé par hydroxylation de l'acide benzoïque par l'acide benzoïque 2-hydroxylase. L'acide salicylique joue un rôle clé dans les mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes. En effet, ce composé est impliqué à la fois dans la mise en place d'une résistance locale et d'une résistance générale (résistance systémique acquise) chez les plantes (Malamy et Klessig, 1992 ; Durner et al., 1997 ; Andersen et al., 1998 ; Mauch-Mani et Métraux, 1998). Ainsi, des plants de tabac transformés par un gène codant pour une salicylate hydroxylase, enzyme qui catalyse la dégradation de l'acide salicylique en catéchol inactif, montrent une très faible synthèse des protéines PR. Ces plantes transgéniques sont incapables de développer une résistance systémique acquise (Gaffney et al., 1993 ; Delaney et al., 1994). En plus, l'inhibition de la phénylalanine ammonia-lyase, enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'acide salicylique, rend les plants d'Arabidopsis sensibles à une souche avirulente de Peronospora parasitica. La résistance peut être restaurée par une application exogène de l'acide salicylique (Mauch-Mani et Slusarenko, 1996). Récemment, il a été montré également que des mutants d'Arabidopsis, incapables de produire de l'acide salicylique, sont susceptibles aux pathogènes Pseudomonas syringae et Peronospora parasitica. Ces mutants sont pourtant capables de synthétiser de très fortes quantités de phytoalexines (camaléxines) et de certaines protéines PR (Nawrath et Métraux, 1999). Toutefois, des expériences de marquage d'acide salicylique ont mis en évidence que plus de 60% d'acide salicylique mesuré dans les zones non infectées de la plante provenait du transport d'acide salicylique initialement synthétisé au niveau des zones infectées (Shulaev et al. 1995). En effet, certains groupes de recherche ont suggéré que l'acide salicylique est transporté par le phloème vers les parties non infectées de la plante (Hunt et al., 1997). Ces observations montrent que l'acide salicylique est indispensable pour mettre en place à la fois une résistance locale et une résistance systémique acquise chez les plantes terrestres. Cependant dans certains cas précis, l'acide salicylique n'est pas nécessaire à l'expression de la résistance systémique acquise. En effet, les plantes d'A. thaliana colonisées par une bactérie non pathogène, Pseudomonas fluorescens, deviennent très résistantes à l'infection par deux champignons pathogènes Fusarium oxysporium f sp raphani et P. syringae (Pieterse et al., 1998; Glazebrook, 1999). Cette résistance contrôlée par la bactérie *P. fluorescens* est appelée ISR (Induced Systemic Resistance) (Dong, 1998). Cette résistance contrôlée est également mise en place chez les plantes d'Arabidopsis qui n'accumulent pas d'acide salicylique. En revanche, cette résistance contrôlée semble être dépendante de l'acide jasmonique et de l'éthylène (Pieterse et al., 1998 ; Glazebrook, 1999). Chez Arabidopsis ainsi que chez le radis, l'induction de certains peptides de défense (défensines) est également indépendante de l'acide salicylique (Penninckx et al., 1996 ; Terras et al., 1998). De même, la mise en place de la résistance locale et systémique induite par la bactérie *Erwinia carotovora* est indépendante de l'acide salicylique (Vidal et al., 1998). D'autres signaux potentiels de la résistance systémique acquise ont été recherchés. Les groupes de Shulaev (1997) et de Seskar (1998) ont émis l'hypothèse que le méthylsalicylate, un composé volatil, pouvait induire la résistance systémique acquise par voie aérienne ou encore après transport par le phloème. En effet, des tabacs inoculés par le virus de la mosaïque du tabac synthétisent du méthylsalicylate à partir de l'acide salicylique. En isolant les différentes parties de la plante les unes des autres, les auteurs ont pu corréler la diffusion du méthylsalicylate avec l'induction à distance de certaines protéines PR dans des plantes non inoculées (Shulaev et al., 1997).

Le mode d'action de l'acide salicylique n'est pas clairement établi. Par une approche biochimique, une protéine liant l'acide salicylique a été identifiée comme étant une catalase (Chen et al., 1993). Il a été également montré que l'acide salicylique est capable d'inhiber l'activité catalase (Chen et al., 1993 ; Conrath et al., 1995). Ces observations ont conduit à élaborer un modèle dans lequel le blocage de l'activité catalase a pour conséquence une accumulation du peroxyde d'hydrogène qui agirait comme intermédiaire dans l'activation de l'expression des gènes de défense et de la résistance systémique acquise (Chen et al., 1995).

III) Mécanismes de défenses

La plante réagit très tôt à la tentative d'invasion des agents pathogènes. Les mécanismes de défense induits chez le végétal se caractérisent par un bouleversement du métabolisme. On note ainsi la synthèse ou l'augmentation de la synthèse de molécules constitutives ou non de la plante, pouvant entraîner des modifications morphologiques visant essentiellement à empêcher ou à stopper la colonisation du pathogène. Plusieurs mécanismes de défense sont mis en place au moment de l'infection ou de l'élicitation. On note ainsi :

1) une réaction d'hypersensibilité qui se traduit par l'apparition de nécrose des tissus végétaux autour du site d'infection. Cette nécrose, due à la mort de quelques cellules végétales entourant les cellules infectées, induit une résistance locale ;
Introduction générale

2) un renforcement de la paroi qui constitue une des premières étapes de lutte contre les agressions. Une modification de cette paroi limite la progression de l'agresseur et favorise la résistance d'une plante à un agent pathogène ;

3) l'accumulation de protéines PR ;

4) la synthèse de certains peptides antimicrobiens tels que les thionines et les défensines ;

5) l'induction des voies de synthèse des métabolites secondaires.

a-Réaction hypersensible

La réaction hypersensible est un mécanisme particulier de résistance mis en place en réponse aux agressions des agents pathogènes. Elle est très étudiée dans différentes interactions plante-agent pathogène aussi bien lors d'une résistance spécifique que lors d'une résistance non spécifique. Elle présente deux caractéristiques principales : apparition de lésions nécrotiques au niveau de chaque point d'infection et accumulation d'une multitude de molécules antimicrobiennes autour de la zone infectée par le pathogène. L'induction de cette réaction hypersensible est caractérisée par trois phases successives :

1) la reconnaissance de l'agresseur ou de l'un de ces composants par la plante ;

2) la production d'une cascade de signaux ;

3) l'expression des réponses de défense dont la mort cellulaire.

Les mécanismes moléculaires de cette mort hypersensible ne sont pas connus. Cependant, de nombreux travaux suggèrent que cette réaction est une mort cellulaire génétiquement programmée (Dietrich et al., 1994 ; Greenberg et al., 1994 ; Greenberg, 1997). Les espèces activées de l'oxygène interviendraient dans le processus en initiant la mort cellulaire par peroxydation des lipides membranaires et en régulant des gènes de protection cellulaire (Levine et al., 1994 ; Jabs et al., 1996 ; Dietrich et al., 1997 ; Mittler et al., 1998 ; Yu et al., 1998 ; Huckelhoven et al., 1999). Par ailleurs, il a été montré que le peroxyde d'hydrogène n'est pas le signal primaire qui induit l'établissement de la mort cellulaire hypersensible dans les cultures de cellules de tabac (Dorey et al., 1999). De nombreux travaux ont également montré qu'il existe plusieurs types morphologiques de cette mort cellulaire (Bestwick et al., 1995 ; Mittler et Lam, 1995 ; Mittler et al., 1995 ; Levine et al., 1996 ; Ryerson et Heath, 1996) : 1) une fragmentation de l'ADN nucléaire et l'induction d'endonucléases spécifique chez le tabac infecté par le virus de la mosaïque du tabac ;

2) un clivage de l'ADN nucléaire en nucléosome chez la dolique infectée par le champignon *Uromyces vignae*;

3) une altération de la membrane plasmique conduisant à la lyse des cellules chez la laitue infectée par Pseudomonas syringae pv. phaseolicola.

Toutefois, cette mort cellulaire n'est pas indispensable pour déclencher les mécanismes de résistance chez A. thaliana infecté par une souche avirulente de *Pseudomonas* (Yu et al., 1998). En effet, des mutants d'Arabidopsis, incapables de développer une mort cellulaire, sont toujours résistants à leur pathogène *Pseudomonas*. Ces mutants possèdent des taux élevés d'acide salicylique et une expression constitutive des protéines PR avant même l'infection par cette souche avirulente.

b- Renforcement de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire est une barrière physique naturelle très efficace face aux agresseurs qui synthétisent des enzymes et composés capables de la dégrader. Lors d'une infection par un agent pathogène cette paroi va être renforcée par des dépôts de composés phénoliques (lignines), d'esters tels que la subérine, de polysaccharides tel que la callose et par l'accumulation de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) (Benhamou, 1996).

L'accumulation de lignine en réponse à l'infection a été décrite chez diverses plantes (Lawton et Lamb, 1987 ; Campbell et Ellis, 1992 ; Messner et Boll, 1993 ; Benhamou et Lafontaine, 1995). La lignine est un polymère phénolique, insoluble et très résistant aux enzymes de la dégradation de la paroi sécrétées par les agents pathogènes. L'inhibition de l'alcool cinnamylique déshydrogénase, une enzyme spécifique de la voie de biosynthèse de la lignine, induit la croissance du champignon dans l'interaction normalement incompatible blé-*Puccinia graminis* f. sp. *Tritici*. De même, le traitement de plants d'A. *thaliana* par un inhibiteur de la phénylalanine ammonia-lyase, l'enzyme clé du métabolisme des phénylpropanoïdes, provoque une réaction de type compatible avec diminution de la lignification après inoculation avec l'oomycète avirulent *Phytophthora infestans* (Mauch-Mani et Slusarenko, 1996). Bien entendu, l'inhibition de la phénylalanine ammonia-lyase a des conséquences sur de nombreuses voies biosynthétiques (acide salicylique, phytoalexines, flavonoïdes, anthocyanines) et la seule baisse de la lignification n'est probablement pas suffisante pour expliquer le passage vers une réaction de type compatible.

La formation des papilles est une réponse de défense très rapide se traduisant par l'apparition de zones d'épaississement sur la paroi des cellules végétales au niveau des sites d'infection du pathogène. La callose, un polymère de -1,3 glucane, participe à cet accroissement de la paroi (Benhamou et Lafontaine, 1995 ; Brown et al., 1998). Ces dépôts polymériques fortement réticulés vont conférer à la matrice extracellulaire une très grande résistance aux enzymes microbiennes. Ces dernières sont des éléments du pouvoir pathogène essentiels à la dégradation de la paroi et ainsi à l'infection de l'hôte 1996 : Kombrink et Somssich, 1995). (Benhamou, D'autres macromolécules interviennent aussi dans le renforcement de la paroi : il s'agit des protéines riches en hydroxyproline (HRGP). Elles s'accumulent lors de l'infection, parallèlement à l'augmentation de la résistance (Benhamou, 1996). Ce sont des protéines qui forment un réseau serré, empêchant ainsi la pénétration du pathogène, et possèdent aussi la propriété d'agglutiner les bactéries réduisant ainsi leur mobilité.

c- Protéines PR (PRP)

Les protéines PR représentent un ensemble de protéines dont la production est fortement induite lors de l'infection (Fritig et al., 1998). Elles ont été détectées pour la première fois dans des feuilles de tabac réagissant de façon hypersensible à l'infection par le virus de la mosaïque du tabac (VMT) (Gianinazzi et al., 1970 ; Van Loon et Van Kammen, 1970). Depuis, elles ont été identifiées chez de nombreuses espèces végétales aussi bien mono que dicotylédones, mais c'est dans le tabac qu'elles sont le plus étudiées et le mieux caractérisées (Stintzi et al., 1993a ; Kombrink et Somssich, 1995 ; Fritig et al.,1998). L'accumulation de ces protéines a été observée après infection par différents pathogènes mais aussi dans d'autres situations de stress (Stintzi et al., 1993a ; Eckey-Kaltenbach et al., 1997). Les protéines PR se divisent en 11 familles selon la comparaison des séquences en acides aminés, la détermination des relations sérologiques et lorsqu'elles sont caractérisées, leurs fonctions ou propriétés biologiques. Elles ont en commun des propriétés physico-chimiques particulières : elles sont stables à pH acide et très résistantes à l'action des protéases produites par la plante elle-même ou par les micro-organismes pathogènes. Ces deux propriétés confèrent aux protéines PR une grande stabilité dans les environnements défavorables où elles s'accumulent, notamment dans les vacuoles, et les espaces intercellulaires occupés par les pathogènes. Ces protéines sont supposées interagir directement avec des composés structuraux ou des enzymes impliquées dans le pouvoir pathogène de l'agresseur. Certaines sont des glycoside hydrolases comme les chitinases et les glucanases. Ces protéines sont capables de dégrader la paroi des champignons et des bactéries, libérant ainsi des petits fragments de chitine et de glucane. Ces oligosaccharides constituent alors des éliciteurs hétérologues des réactions de défense chez les plantes (Heitz et al., 1994 ; Legrand et al., 1987; Ponstein et al., 1994; Stintzi et al., 1993b; Kauffmann et al., 1987). D'autres protéines PR ont des activités antifongiques en interagissant avec la membrane plasmique du pathogène (Niderman et al, 1995 ; Abad et al., 1996). Certaines sont des peroxydases qui interviennent dans l'insolubilisation des protéines et des composés phénoliques permettant ainsi le renforcement de la paroi (Fritig et al., 1998). Les agents pathogènes sécrètent des protéases et des polygalacturonases qui dégradent la paroi des végétaux. La plante lutte contre ces facteurs d'agressivité en synthétisant des inhibiteurs de protéases et de polygalacturonases (Ryan, 1990 ; Cervone et al., 1989). Les polygalacturonases dégradent les pectines de la paroi végétale et libèrent ainsi des mono et des disaccharides. Les inhibiteurs de polygalacturonases synthétisés par la plante diminuent l'activité de cette enzyme et favorisent ainsi la synthèse des fragments oligosaccharidiques qui ont un degré de polymérisation plus élevé. Ces oligosaccharides possèdent une activité élicitrice des réactions de défense (Devoto et al., 1997 ; De Lorenzo et Cervone, 1997). Ces protéines PR sont fortement synthétisées au niveau des cellules entourant les lésions nécrotiques (Heitz et al., 1994 ; Fritig et al., 1998).

d- Peptides antimicrobiens (les thionines et les défensines)

Ces peptides sont fortement synthétisés par la plante en réponse à une agression des pathogènes (Terras et al., 1995 ; Epple et al., 1997 ; Broekaert et al., 1997 ; Vignutelli et al., 1998). Les thionines forment une famille multigénique dont l'expression est spécifique du tissu. Leur localisation cellulaire a été étudiée chez les céréales. Les thionines sont majoritairement vacuolaires (Carmona et al., 1993; Romero et al., 1997) mais on en trouve aussi dans la paroi cellulaire (Bohlmann et Apel, 1991). Les thionines sont supposés agir sur l'agent pathogène après la mort des cellules végétales et libération du contenu vacuolaire. Le mode d'action de ces peptides est particulier : ils modifient la perméabilité membranaire chez les champignons par influx de calcium et efflux de potassium et protons suivis d'un relargage du contenu cellulaire (Thevissen et al., 1996). Les défensines ressemblent aux thionines de par leur taille (45-54 aminoacides) et l'abondance des ponts disulfures. En revanche, leur structure tridimensionnelle est totalement différente de celle des thionines. Ces défensines de plantes ressemblent aux défensines d'insectes (Broekaert et al., 1997). Le mode d'action des défensines est encore inconnu. Récemment, il a été montré que ces peptides pénètrent à travers la membrane plasmique du champignon Neurospora Crassa et inhibent ainsi sa croissance (Thevissen et al., 1999). L'expression de ces peptides, thionines et défensines, semble être sous le contrôle de l'acide jasmonique et de l'éthylène mais ne semble pas impliquer l'acide salicylique (Epple et al., 1995 ; Penninckx et al., 1996 ; Bohlmann et al., 1998 ; Terras et al., 1998).

e-Voies des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés synthétisés par la plante pour inhiber ou bloquer la propagation des pathogènes. Parmi ces métabolites : les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les stilbènes, les anthocyanines, les coumarines..... Différentes voies de biosynthèse de ces métabolites sont impliquées dans la mise en place des processus de défense contre les agents pathogènes chez les plantes supérieures. Les enzymes qui participent à ces synthèses sont induites lors de l'interaction avec l'agent pathogène ou en réponse à l'application d'éliciteurs. En effet, toutes les enzymes de la voie de biosynthèse de l'acide shikimique sont fortement induites en réponse à une attaque par un pathogène ou à une élicitation chez plusieurs plantes supérieures (McCue et Conn, 1989; Keith et al., 1991; Görlach et al., 1995; Bischoff et al., 1996). Cet acide shikimique constitue le précurseur principal de la synthèse des acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine (Hermann, 1995a ; 1995b). L'inhibition de cette voie shikimique induit une inhibition de la synthèse de certains métabolites secondaires et augmente ainsi la susceptibilité de la plante à son pathogène (Holliday et Keen, 1982 ; Keen et al., 1982 ; Johal et Rahe, 1988 ; Sharon et al., 1992). La phénylalanine ammonia-lyase, une enzyme permettant la dégradation de la phénylalanine en acide cinnamique, est également induite en réponse à la présence des agresseurs ou des éliciteurs chez les plantes (Fritig et al., 1973 ; Pelligrini et al., 1994 ; Smith-Becker et al., 1998 ; Durner et al., 1998 ; Katz et al., 1998 ; Dorey et al., 1999). L'acide cinnamique permet la synthèse de l'acide salicylique et de plusieurs métabolites secondaires tels que la lignine, les phytoalexines, les coumarines etc... (Bate et al., 1994 ; Katz et al, 1998). L'inhibition de la phénylalanine ammonia-lyase induit une dimunition importante de la synthèse de l'acide salicylique et d'autres composés de la voie des phénylpropanoïdes (voie de biosynthèse de composés phénoliques). Cette inhibition supprime la mise en place de la résistance systémique acquise et rend les plantes sensibles à leur pathogène (Maher et al., 1994 ; Pallas et al., 1996 ; Felton et al., 1999). Parmi les composés phénoliques qui sont induits chez les plantes après élicitation ou aprés inoculation par un pathogène, on trouve les composés phénoliques autofluorescents (Bennett et al., 1996). Ces métabolites, qui autofluorescent après excitation dans l'UV, sont très fortement synthétisés autour des zones de pénétration par les pathogènes (Bennett et al., 1996 ; Dorey et al., 1997 ; McLusky et al., 1999). Ils permettent de bloquer la propagation de l'agresseur et confèrent ainsi une résistance à la plante vis à vis de son pathogène. Certaines enzymes de la voie de biosynthèse de l'éthylène telles que l'ACC synthase (1-AminoCyclopropane-1-Carboxylate synthase) et l'ACC oxydase (1-AminoCyclopropane-1-Carboxylate oxydase) sont également induites en réponse à une attaque des agresseurs ou des éliciteurs (Oetiker et al., 1997 ; Blume et Grierson, 1997 ; Simpson et al., 1998). De même, certaines enzymes du métabolisme des sesquiterpènoïdes impliquées dans la synthèse de certaines phytoalexines sont aussi induites au moment des interactions entre la plante et son pathogène (Choi et al., 1992). En effet, les phytoalexines (isoflavonoïdes et les sesquiterpénoïdes) sont fortement induites en réponse à des agressions ou à des éliciteurs chez de nombreuses plantes (Milat et al., 1990 ; Rustérucci et al., 1996). Ces composés organiques de faible poids moléculaire possèdent des propriétés antimicrobiennes et sont synthétisés en grande quantité lors de la réaction hypersensible (Darvill et Albersheim, 1984; Meier et al., 1993; Kuc, 1995; Rogers et al., 1996). Ces métabolites jouent un rôle très important dans la défense chez les plantes supérieures. En effet, des plantes transgéniques de tabac dans lesquelles on introduit un gène de la voie de biosynthèse des phytoalexines deviennent plus résistantes que les plantes sauvages vis à vis de leur pathogène Botrytis cinerea (Hain et al., 1993). De plus, des mutants d'A. thaliana, incapables de produire des phytoalexines, sont susceptibles à un champignon Alternaria brassicicola alors que les plantes non mutantes sont toujours résistantes à ce pathogène (Thomma et al., 1999). Par ailleurs, ces mêmes mutants sont capables de développer une résistance vis à vis de plusieurs pathogènes notamment la bactérie Pseudomonas syringae et deux champignons Peronospora parasitica et Erysiphe orontii (Glazebrook et Ausubel, 1994; Glazebrook et al., 1997; Reuber et al., 1998). D'autre part des mutants d'Arabidopsis, incapables de produire de l'acide salicylique, sont susceptibles aux pathogènes Pseudomonas syringae et Peronospora parasitica. Ces mutants présentent une accumulation importante en phytoalexines (camaléxines) et en certaines protéines PR (Nawrath et Métraux, 1999).

IV) Résistance induite chez les végétaux supérieurs

Outre l'utilisation des pesticides, qui consiste à tuer les organismes pathogènes, divers stratégies de phytoprotection sont à l'étude, qui visent toutes à conférer une meilleure résistance aux plantes. Une stratégie qui repose sur la surexpression des gènes de résistance ou des composants de défense par transgenèse. En effet, des plantes transgéniques surexprimant une protéine à activité antimicrobienne (chitinase, -1,3 glucanase...) présentent des taux de protection significatifs contre les pathogènes. Une autre stratégie consiste en des prétraitements des plantes par d'autres microorganismes non pathogènes capables d'induire une résistance chez ces plantes contre leurs agresseurs (Benhamou et Nicole, 1999). En particulier, un prétraitement des tomates par une bactérie *Pseudomonas fluorescens* induit une résistance contre le champignon

Introduction générale

Fusarium oxysporium f. sp. radicis-lycopersici (Mpiga et al., 1997). De même, des tomates traitées simultanément par du chitosan et une bactérie endophyte Bacillus pumilus sont resistantes au champignon F. oxysporium f. sp. radicis-lycopersici (Benhamou et al., 1998). Un prétraitement du concombre par une bactérie endophyte Serratia plymuthica est aussi capable de conférer une protection vis à vis de leur pathogène Pythium ultimum (Benhamou et Nicole, 1999). Une autre stratégie de protection des plantes, essentiellement préventive, consiste en des traitements externes avec des substances capables de stimuler les défenses naturelles. En particulier, le benzothiodiazole, un analogue structural de l'acide salicylique, et les oligosaccharides sont capables de conférer aux plantes une meilleure protection vis à vis de leurs pathogènes (Joubert et al., 1998 ; Benhamou et Nicole, 1999). En effet, appliqué sur des plants de tabac, d'Arabidopsis, de tomate et de concombre le benzothiodiazole confère une protection contre plusieurs pathogènes (Friedrich et al., 1996 ; Görlach et al., 1996 ; Lawton et al., 1996 ; Benhamou et Bélanger, 1998a ; 1998b). Cependant, les oligosaccharides protègent efficacement les plantes, y compris des plantes de grande culture (blé, orge, riz, vigne, pommiers, tomates) contre l'infection par des pathogènes causant d'importants préjudices à ces cultures (Benhamou et Thériault, 1992 ; Benhamou et al., 1994 ; El Ghaouth et al., 1994 ; Benhamou et Lafontaine, 1995 ; Joubert et al., 1998 ; Benhamou et Nicole, 1999).

Hôte	Espèce (hôte)	Pathogène	Localisation dans l'hôte	Symptomes	Réference
Rhodophytes	Palmaria mollis	Petersenia palmariae	Intracellulaire	Tâches blanches, destruction des cellules	Pueschel & Van der Meer (1985)
	Palmaria mollis Porphyra porferata	Petersenia palmariae Puthium marinum	Intracellulaire	Tâches, destruction des cellules	Van der Meer & Pueschel (1985) Kazama & Fuller (1970)
	Porphyra Joucosticta	Fythium marinum	Non détorminé	Rupture des organenes	A_{loom} (1090)
	Porphyra vozoonsis	Fylinun marnhurae	Intracellulaire	Pourrissement des tissus	Aleeni (1900) Sasaki & Sakurai (1079)
	Chondrus crispus	Petersenia pollagaster	Extracellulaire	Nécrose des tissus	Molina et al. (1988) Craigie & Shacklock (1989)
	Apophlaea lyallii	Mycospharella apophlaeae	Immergé dans les tissus de l'hôte	Protrusion des nodules noires	Kolhmeyer & Demoulin (1981)
	Apophlaea lyallii	Polystigma apophlaeae	Intracellulaire	Protrusion des nodules	Kolhmeyer & Demoulin (1981)
Chlorophyte s	Chaetomorpha media	Pontisma lagenidioides	Intracellulaire	Brunissement des cellules	Raghukumar (1987)
	Cladophora glomerata	Acremonium kiliense	Non déterminé	Chlorose des cellules, inhibition de la croissance	Bot & Rogenmuser (1980)
	Cladophora frascatii	Sirolpidium bryopsidis	Intracellulaire	Brunissement des cellules terminales	Raghukumar (1986)
	Cladophora frascatii	Olpidium rostriferum	Intracellulaire	Brunissement des cellules Destruction des filaments	Raghukumar (1986)
	Cladophora frascatii	Labyrinthula sp.	Intracellulaire	Blanchissement	Raghukumar (1986)
Phéonhytes	Cystoseira osmundacea	Haloguignardia irritans	Intracellulaire	Calles	Ant (1988a)
r neophytes			Extracellulaire	Ganes	Apt (1000a)
	Cystoseira balearica	Haloguignardia cystoseirae	Non déterminé	Galles	Kolhmeyer & Demoulin (1981)
	Sargassum undulatum	Haloguignardia tumefaciens	Non déterminé	Galles	Kolhmeyer & Demoulin (1981)

Figure 6 : Interaction champignons-algues (Correa, 1996)

B- Interactions hôte-pathogène chez les algues marines

I) Différentes pathologies des algues marines

Les populations sauvages d'algues marines sont également confrontées à des agressions par des pathogènes, causant ainsi la destruction des thalles et une dimunition des récoltes. L'extension croissante des cultures d'algues dans le monde s'accompagne également de l'apparition de diverses maladies dans les populations cultivées. Nos connaissances sur ces pathologies sont très fragmentaires, en particulier en ce qui concerne l'étiologie et les facteurs déterminant la susceptibilité aux agents infectieux (Correa et Craigie, 1991 ; Craigie et Correa, 1996). Les agents pathogènes les plus rencontrés chez les algues marines sont les champignons, les bactéries et les endophytes.

a- Champignons

Comme chez les plantes terrestres, les plantes marines sont également attaquées par les champignons (figure 6). Deux pathogènes, Phythium sp. et Olpidiopsis sp, ont été découverts dans des cultures de Porphyra spp au Japon. Ces champignons engendrent des lésions au niveau des thalles de l'algue rouge (Correa, 1997). Un brunissement des cellules a été également observé chez une algue verte Chaetomorpha media après infection par un champignon, Pontisma lagenidioides. Cette pigmentation brunâtre est due à une dimunition de la composition en chlorophylle provoquée par l'infection (Raghukumar et Chandramohan, 1988). Une interaction entre le champignon Petersenia palmariae et l'algue rouge Palmaria mollis a été également décrite. Cette association se traduit par l'apparition de tâches blanches, causées par le champignon, sur la surface des thalles de P. mollis, provoquant en phase finale de l'infection une destruction de la fronde (Van der Meer et Pueschel, 1985). Les observations structurales ont montré que ce champignon pénètre bien dans les cellules de l'algue rouge mais reste confiné entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire (Pueschel et Van der Meer, 1985). Le champignon Didymosphaeria danica provoque des décolorations et des nécroses dans les cystocarpes de l'algue rouge Chondrus crispus (Goff, 1983). En revanche, le champignon Petersenia

Hôte	Espèce (hôte)	Pathogène	Localisation dans l'hôte	Symptomes	Réference
Rhodophytes	Prionitis lanceolita	Non identifié Non identifié	Intercellulaire	Galle	Apt & Gilbor (1989) Techos (1982)
	Gigailina teeun	Non identifié	Intercentulaire	Tulleur Evtrámitás blonobos	Tsekus (1962) Eriadlandar & Cunkal (1002)
		non identifie	Intercentiaire	fragmentation du thalle	Weinberger et al. (1994)
	Porolithon onkodes	Bacillus	Intercellulaire	Nécrose des tissus Pigmentation orange	Littler & Littler (1995)
	Chondrus crispus	Cytophaga- Flavobactérium	Intercellulaire	Tâches vertes	Craigie & Correa (1996)
	Chondrus crispus	Non identifié	Non déterminé	Petites tâches verdâtres, perforation et amollissement des tissus	Craigie & Shacklock (1989)
	Kappaphycus alvaresii	Cytophaga sp . Vibrio sp.	Intercellulaire	Blanchiment des branches	Largo et al. (1995)
	Eucheuma denticulatum	Cytophaga sp . Vibrio sp .	Intercellulaire	Blanchiment des branches	Largo et al. (1995)
Phéophytes	Undaria pinnatifida	Non identifié	Intercellulaire	Tâches vertes, perforation des tissus	Ishikawa & Saga (1989)
	Undaria pinnatifida	Non identifié	Intercellulaire	Pigmentation jaune, perforation et amollissement des tissus	Ishikawa & Saga (1989)
	Nereocystis sp	Acinetobacter sp .	Intercellulaire	Pigmentation blanche, perforation et amollissement des tissus	Andrews (1976)
	Nereocystis luetkeana	Leucrothix mucor	Intercellulaire	Pourrissement des tissus	Albright et al. (1982)
	Laminaria sp.	Vibrio sp.	Intercellulaire	Pourrissement et amollissement des tissus	Uchida & Nakayama (1993)
	Laminaria japonica	Pseudomonas sp .	Intercellulaire	Pourrissement des spores	Wu et al. (1983)
	Laminaria japonica	Micrococcus spp .	Intercellulaire	Pourrissement et amollissement des frondes	Wu et al. (1983)
	Laminaria japonica	Pseudoalteromonas bacteriolytica	Intercellulaire	Pigmentation rouge, destruction et amollissement des tissus	Sawabe et al. (1998)

Figure 7 : Interaction bactéries-algues (modifiée, Correa, 1996)

pollagaster attaque la région méristématique de la fronde et bloque ainsi la croissance de *C. crispus* (Craigie et Shachlock, 1989 ; Craigie et Correa, 1996).

b-Bactéries

Les interactions entre les bactéries marines et les algues marines ont été très peu étudiées (figure 7). *Pseudoalteromonas bacteriolytica* est une bactérie marine qui, récemment, a été décrite comme étant un agent pathogène d'une algue brune *Laminaria japonica*. Cette infection se traduit par des tâches rouges sur les thalles de l'algue brune *L. japonica* (Sawabe et al., 1998). Chez l'algue rouge *Gracilaria conferta*, des nécroses des cellules apicales de l'épiderme ont été observées. Ces lésions ont été attribuées à plusieurs groupes de bactéries marines (Weinberger et al., 1994 ; 1997).

c- Endophytes

De nombreux agents pathogènes observés dans les populations sauvages d'algues marines sont des endophytes (figure 8). Plusieurs endophytes ont été décrits chez les algues brunes et en particulier dans l'ordre des Laminariales. Ces pathogènes endophytes sont d'autres algues brunes capables de pénétrer à l'intérieur des thalles et de s'y développer. Ils envahissent tous les tissus de l'hôte et provoquent l'apparition de tâches noires et de lésions au niveau des frondes de certaines algues brunes (Peters et Ellertsdottir, 1996; Peters et Burkhardt, 1998; Heesch et Peters, 1999). Les endophytes les plus étudiés sont des endophytes d'algues rouges. Endophyton ramosum est un pathogène endophyte qui envahit les tissus de l'algue rouge Mazzaella laminarioides et de toutes les carraghénophytes⁶ alors qu'il n'arrive pas à infecter les algues agarophytes⁷ (Sanchez et al., 1996). Acrochaete operculata est un pathogène endophyte capable de vivre et de se reproduire seul, mais il est souvent associé à l'algue rouge C. crispus. Cette interaction se traduit par l'apparition de tâches vertes sur les frondes de l'algue rouge C. crispus. Le sporophyte est complètement infecté par l'endophyte, tandis que le gamétophyte est résistant à l'infection. Le pathogène est ainsi bloqué au niveau des premières cellules du cortex des gamétophytes (Correa et al., 1988 ; Correa et

⁶ Plantes dont les polysaccharides matriciels sont des carraghénanes

Hôte	Espèce (hôte)	Pathogène	Localisation dans l'hôte	Symptomes	Réference
Rhodophytes	Chondrus crispus	Acrochaete operculata	Endophyte	Tâches vertes, Envahissement des tissus, destruction des thalles	Correa et al. (1988)
	Chondrus crispus	Acrochaete heteroclada	Epi/endophyte	Envahissement des tissus	Correa et al. (1988)
	Iridea laminarioides	Endophyton ramosum	Endophyte	Tâches vertes, Amollissement des tissus	Correa et al. (1994)
	Hypnea musciformis	Hypneocolax stellaris	Intercellulaire	Galles	Apt (1984)
Phéophytes	Nereocystis luetkeana	Streblonema sp.	Intercellulaire	Galles	Apt (1988b)
	Macrocystis integrifolia	Streblonema sp .	Intercellulaire	Galles	Apt (1988b)
	Laminaria japonica	Streblonema sp .	Intercellulaire	Galles	Apt (1988b)
	Indaria sp .	Streblonema aecidioides	Endophyte	Tâches brunes, pourrissement des tissus	Yoshida & Akiyama (1979)
	Laminaria spp.	Laminarionema elsbetiae	Endophyte	Tâches brunes, Envahissement des tissus, destruction des thalles	Ellertsdottir & Peters (1997) Heesch & Peters (1999)
	Laminaria spp.	Laminariocolax tomentosoides	Endophyte	Tâches brunes, Envahissement des tissus, destruction des thalles	Ellertsdottir & Peters (1997) Heesch & Peters (1999)
Chlorophyte s	Ulva rigida	Acrochaete geniculata	Endophyte	Tâches vertes, perforation et destruction des tissus	Campo et al. (1998)

Figure 8 : Interaction algues-algues (modifiée, Correa, 1996)

McLachlan, 1991 ; 1992 ; 1994). Cet endophyte envahit complètement les sporophytes de la famille des Gigartinacées et des Phyllophoracées (Correa et al., 1988).

II) Evénements de reconnaissance et de transduction du signal

Contrairement aux plantes terrestres, peu de données sont disponibles quant aux événements de reconnaissance et de transduction des signaux dans les interactions algue-pathogène. On peut se demander si les phénomènes décrits chez les plantes supérieures sont des mécanismes généraux mis en place avant la diversification des eucaryote supérieurs, et/ou si des systèmes particuliers ont été sélectionnés chez les végétaux marins. Deux modèles d'étude ont fourni des résultats préliminaires : d'une part il s'agit d'une algue brune Laminaria digitata qui est capable de reconnaître des oligoalginates de type oligo-guluronates qui proviennent de sa propre paroi. Cette reconnaissance se traduit par un burst oxydatif, dont la cinétique et l'amplitude sont comparables aux caractéristiques du burst observé chez les végétaux supérieurs (Küpper et al., 2000). Une étude pharmacologique a montré l'implication des phospholipases, des flux ioniques et des protéines kinases dans la transduction du signal élicité par les oligo-guluronates chez L. digitata (Küpper et al., 2000). Le deuxième modèle concerne une algue rouge Gracilaria conferta infectée par une bactérie pathogène. Cette bactérie dégrade la paroi de l'algue rouge et libère ainsi des oligosaccharides de type oligo-agars qui sont reconnus par l'algue rouge (Weinberger et al., 1997; 1999). Cette reconnaissance se traduit par une consommation importante d'oxygène et une production de peroxyde d'hydrogène dans les premières minutes qui suit la reconnaissance (Weinberger et al., 1999; 2000).

⁷ Plantes qui produisent de l'agar (polymère de galactose)

Introduction générale

III) Les réactions de défense

A la différence des plantes supérieures, les mécanismes de défense chez les algues marines sont pratiquement inconnus. Quelques travaux ont été publiés sur le rôle éventuel des composés halogénés dans les réactions de défense chez les algues. Ces composés sont impliqués dans la réponse au burst oxydatif induit par les éliciteurs oligosaccharidiques chez l'algue brune L. digitata (Küpper et al., 1998 ; 2000) et chez l'algue rouge G. conferta (Weinberger et al, 1999). Ces métabolites sont également émis en concomitance par les espèces activées de l'oxygène induites par des stress abiotiques comme la salinité (Pedersén et al., 1996). Outre un rôle important dans la détoxication des espèces activées de l'oxygène, ces composés pourraient être impliqués dans les réactions de défenses chez les algues marines (Wever et al., 1991). Les haloperoxydases jouent un rôle clé dans la production de ces composés toxiques (Hewson et Hager, 1980 ; Theiler et al., 1978). Ces enzymes interviennent probablement aussi dans la régulation des espèces activées de l'oxygène et dans le pontage des molécules pariétales, consécutifs au burst oxydatif. En effet, de nouveaux isoformes sont induits chez L. digitata en réponse à un burst oxydatif élicité par les oligoalginates (Küpper et al., 2000). Le gène qui code pour une bromoperoxydase a été cloné chez une algue rouge Corallina pilulifera (Shimonishi et al., 1998). Des résultats préliminaires ont montré l'induction de l'expression de certains gènes chez une algue rouge Gracilaria gracilis en réponse à l'infection par des bactéries. Cependant, la fonction des protéines codées par ces gènes n'est pas liée aux réactions de défense (Jaffray et Coyne, 1999).

IV) Modèle biologique Chondrus crispus-Acrochaete operculata a- Biologie de l'hôte C. crispus

C. crispus est une algue rouge appartenant à l'ordre des Gigartinales et à la famille des Gigartinacées. Elle occupe les zones intertidales et subtidales de l'océan atlantique européen et nord américain. Le cycle biologique de l'algue est de type haplodiplophasique trigénétique isomorphe (figure 9) (Chen et McLachlan, 1972). Ce cycle est caractérisé par la succession d'une génération gamétophytique haploïde, d'une génération carposporophytique diploïde qui se développe sur les gamétophytes femelles et d'une phase tétrasporophytique diploïde (figure 9). La fécondation se fait



Figure 9 : Le cycle biologique de Chondrus crispus.

.

Introduction générale

par trichogamie. Le carpogone, un gamétocyste femelle inséré sur le gamétophyte, surmonté de son trichogyne est fertilisé par un gamète mâle dépourvu de flagelles (spermatie). Le zygote qui en résulte se développe en une génération diploïde de petite dimension, nommée carposporophyte, épiphyte du gamétophyte femelle. Les carposporocystes vont libérer des carpospores qui vont germer pour donner de nouveaux tétrasporophytes. Ces derniers différencient à maturité des cellules spécialisées, les tétrasporocystes. Parvenus à maturité ces cystes subissent la méiose et engendrent les méiospores (tétraspores haploïdes). Celles-ci germeront en de nouveaux gamétophytes. La reproduction asexuée se fait par germination des spores (paraspores) qui vont redonner des individus semblables aux parents, morphologiquement et cytologiquement. La multiplication végétative est la forme la plus simple de propagation. Elle se réalise par fragmentation des thalles. Le sporophyte (diploïde) et les gamétophytes (haploïdes) sont identiques sur le plan morphologique **(figure 9)**.

b- Paroi cellulaire de C. crispus

La constitution pariétale de *C. crispus* et des algues macrophytes en général est caractérisée par une organisation complexe où deux structures se répartissent inégalement dans la paroi. Ces structures correspondent à une phase squelettique (aspect fibrillaire) et une phase matricielle (aspect amorphe). La phase squelettique est essentiellement constituée de microfibrilles de cellulose. La phase matricielle est composée essentiellement des polysaccharides sulfatés appelés carraghénanes. Cette paroi permet de soutenir l'organisme, de résister à la pression osmotique intracellulaire et de se protéger contre les agressions extérieures.

1) Carraghénanes et leurs propriétés

Les carraghénanes sont des D-galactanes sulfatés constituants de la matrice des parois cellulaires de *C. crispus* et certaines algues rouges. Ces polymères sont des produits gélifiants ou épaississants à haute valeur commerciale. Le schéma commun à toutes ces molécules est l'alternance des liaisons (1, 3) et (1, 4) entre les résidus



Figure 10 : Structure idéale des carraghénanes d'algues rouges

galactose. Le galactose de configuration peut être sous forme 3, 6- annydro (figure 10). Ils sont classés en deux familles :

1) la famille kappa constituée du kappa, du iota carraghénane et deux précurseurs mu et nu ;

2) la famille lambda qui comporte essentiellement du lambda carraghénane.

Ces galactanes sulfatés jouent un rôle prépondérant dans l'adaptation de l'algue à son environnement. En effet, par les propriétés de liaison de leurs groupements sulfates avec des cations, ils pourraient être impliqués dans les phénomènes de régulation osmotique ou ionique (Kloareg et Quatrano, 1988).

Les carraghénanes sont utilisés, pour leurs propriétés gélifiantes, dans l'industrie agroalimentaire. Ils sont principalement utilisés comme gélifiants sous leur forme sel de calcium ou de potassium. A chaud, ils sont utilisés pour leurs propriétés épaississantes. Ils se combinent aussi aux protéines. Ainsi, avec le lait, ils provoquent un gel faisant intervenir la caséine et les ions calcium. Cette propriété est largement exploitée pour la préparation de divers produits (crèmes, glaces, gateaux, flans, yaourts etc). Ils sont aussi utilisés dans l'industrie pharmaceutique et en cosmétologie (crèmes de beauté). Comme beaucoup de composés chargés de haut poids moléculaire, ces galactanes sulfatés présentent des propriétés hypocholestéroliques et antitumorales (Noda et al., 1989). L'action de ces trois galactanes sulfatés a été mis en évidence *in vitro* dans l'inhibition de la multiplication des virus à ARN et ADN, en particulier le virus de type 1 (HIV 1) du syndrome d'immunodéficiense acquise (SIDA) (Baba et al., 1988), le virus de la fièvre jaune, les virus de l'herpès (HSV 1 et HSV 2) et de la vaccine (Gonzalez et al., 1987).

2) Alternance de génération chez les Gigartinacées et les Phyllophoracées et localisation des carraghénanes dans l'algue

Chez certaines algues rouges carraghénophytes, les deux générations haploïde (gamétophytes) et diploïde (sporophytes) se ressemblent et présentent de très faibles divergences au point de vue biochimique et ultrastructural. La synthèse des carraghénanes suit le cycle biologique de l'algue. Ainsi chez *C. crispus* et certaines carraghénophytes, les sporophytes contiennent des carraghénanes de type lambda tandis que les gamétophytes contiennent exclusivement des carraghénanes de type kappa et iota. Cette alternance biochimique de la composition des générations en polysaccharides matriciels a été constatée chez les Gigartinacées et certaines Phyllophoracées (McCandless et al., 1983). Chez Kappaphycus alvarezii, une carraghénophyte de la famille des Solieriacées et qui ne présente pas d'alternance biochimique de génération, le kappa carraghénane est localisé préférentiellement dans la région médullaire et représente 80 % des polysaccharides matriciels des gamétophytes. Le iota carraghénane se trouve au niveau de l'épiderme ainsi que d'une partie du cortex et constitue 20 % des galactanes sulfatés des gamétophytes (Zablackis et al., 1991).

c- Culture de *C. crispus*

La demande sans cesse croissante de *C. crispus* et en général des algues à destination alimentaire, médicale, agricole et cosmétique a fini par dépasser les possibilités de récolte sur les peuplements sauvages. Cela a provoqué la mise en place de la mariculture des algues. La culture de thalles de *C. crispus* a été tentée à maintes reprises pour étudier la physiologie et la productivité de cette algue d'un grand intérêt économique (Chen et Taylor, 1980 ; Bidwell et al., 1985 ; Greene et Gérard, 1990 ; Craigie et al., 1999). Une attention particulière a été portée aux conditions favorisant une productivité élevée en carraghénanes et à la sélection de souches à croissance rapide et à forte teneur en carraghénanes (Simpson et Shacklock, 1979). Les algues sont multipliées par fragmentation des thalles en suspension dans l'eau de mer et sont dépourvues de leur disque basal. Deux types de bassin de cultures ont été adoptés par plusieurs sociétés : dans le premier, une roue à aubes génère un courant qui crée un mouvement d'eau de mer. On parle alors d'un système <oméga>. Le deuxième système, appelé <autoroute>, utilise des impulseurs multiplaes et des déflecteurs permettant de modifier le courant.



Figure 11 : Interaction *C. crispus-A. operculata*. Le gamétophyte (A, C) est très peu infecté tandis que le sporophyte (B, D) est entièrement envahi par l'endophyte.

- (A, B) : vues de surface
- (C, D) : coupes transversales.

А



в



Figure12: Observation du site d'infection de C. *crispus* par les zoospores d'A. *operculata* par microscopie électronique à balayage (Correa et al., 1991; 1994) A : gamétophyte B : sporophyte

d- Interaction Chondrus crispus-Acrochaete operculata

A. operculata est une algue verte filamenteuse qui appartient à l'ordre des Ulvales et à la famille des Chaetophoracées. La plupart des espèces de cette famille ont un cycle de vie haplo-diplophasique digénétique isomorphe (O'Kelly, 1982). Elles présentent un mode de vie très particulier. En effet, elles vivent généralement sous forme d'épi/endophytes souvent d'algues rouges ou dans des coquillages. Ces algues vertes, notamment A. operculata, A. heteroclada et Phaeophila dendroïdes, partagent le même biotope que C. crispus. A. operculata est un pathogène endophyte très spécifique qui envahit les sporophytes de C. crispus et d'autres algues à carraghénanes de type lambda (Correa et McLachlan, 1991). En revanche, ce pathogène n'arrive pas à envahir les gamétophytes de C. crispus qui eux contiennent les carraghénanes de type kappa (figure 11). L'étude du déroulement de l'infection révèle que seules les zoospores ont un pouvoir pathogène. La germination de ces zoospores traversent la cuticule du gamétophyte comme celle du sporophyte, mais leur développement est bloqué au niveau des premières cellules du cortex chez les gamétophytes de C. crispus. Un réarrangement très important des microfibrilles autour de la zone infectée a été observé chez le gamétophyte tandis qu'il est beaucoup moins important au niveau des sites d'infection chez le sporophyte (figure 12). Cette infection engendre une destruction totale des sporophytes tandis que les gamétophytes sont très peu endommagés (Correa et al., 1988 ; Correa et McLachlan, 1992; 1994). Des cellules du pathogène développées à l'intérieur des thalles de *C. crispus* se différencient en sporocystes. Ces derniers libèrent des zoospores dans le milieu, par les ouvertures effectuées lors de l'infection, qui envahissent d'autres thalles de sporophytes de C. crispus. Les thalles de sporophytes infectés sont ainsi facilement détruits par d'autres pathogènes et notamment des bactéries. En revanche, cet endophyte est incapable d'infecter la partie basale proche du crampon des thalles de sporophytes (Correa et al., 1987). Ceci permet à l'algue rouge C. crispus de se régénérer après destruction de la partie médiane et apicale des thalles. Par contre en culture en bassins, les algues étant dépourvues de disque basal, les frondes sont totalement détruites par les maladies car elles ne disposent pas de possibilités de régénération.



Figure 13 : Interaction des différents signaux de transduction du signal régulant l'expression des mécanismes de défense, d'après Hammond-Kosack et Jones (1996).

BAG : glucoside d'acide benzoïque; BA2H : acide 2-benzoïque hydroxylase; CA : acide cinnamique; CHS : chalcone synthase; EFE : éthylène"forming enzyme"; HO2° : radical hydroperoxyde; HPDase : hydroperoxyde déhydrase; GP : gluthation peroxydase; GST : gluthation S-transférase; K : kinase; OGA et OGA-R : fragments d' oligogalacturonide et son récepteur; p : phosphatase; PAL : phénylalanine amonialyase; PGase : polygalacturonase; PGIPS : inhibiteurs de polygalacturonase; Phe : phénylalanine; PR : protéines PR; Rp : récepteur de l'hôte; SA et SAG : acide salicylique et son glucoside; SA* : radical de l'acide salicylique; SOD : superoxyde dismutase.

C- Conclusion

Les résultats obtenus dans le domaine des interactions plantes supérieurespathogènes montrent bien l'existence de différentes voies de transduction des signaux qui sont induits par des molécules libérées au moment de l'interaction. Ces voies de signalisations aboutissent à la mise en place de plusieurs réponses de défense qui ont pour but le confinement du pathogène sur son site de pénétration et également la résistance de la plante entière. La **figure 13** reflète bien la complexité de ces événements (reconnaissance, signalisation et mécanismes de défense). Par ailleurs, la plupart des événements de transduction des signaux sont conservés dans les différents systèmes étudiés. D'autre part, plusieurs voies de signalisation intercellulaire semblent coexister chez les plantes. Une voie impliquant l'acide salicylique et une autre impliquant l'acide jasmonique et l'éthylène. Ces deux voies interagissent dans le but de conférer à la plante une meilleure résistance possible vis à vis de différents agresseurs. Cependant, des travaux récents ont montré que le pathogène est aussi capable de reconnaître des signaux provenant de l'hôte. Ces signaux élicitent certaines MAP kinases qui seraient responsables de la formation de l'appressorium et de l'activation du pouvoir pathogène.

A la différence des plantes supérieures, les événements de reconnaissance, de signalisation et de mécanismes de défense chez les algues restent encore inconnus. Quelques études réalisées sur deux modèles, oligoalginates-*Laminaria digitata* et oligoagar-*Gracilaria conferta*, montrent que ces éliciteurs sont également reconnus par les plantes marines. Cette reconnaissance induit la synthèse de certains composés tels que les composés halogénés volatils qui ne sont pas élicités chez les plantes supérieures au moment de l'interaction avec leur pathogène (Küpper et al., 1998 ; Weinberger et al., 1999). Par ailleurs, aucune reconnaissance spécifique de type gène pour gène n'a été démontré chez les algues marines.

D-Objectifs

Plusieurs algues marines d'intêret économique sont confrontées à des attaques par des agents pathogènes. Ces agresseurs peuvent conduire à la destruction massive des espèces incapables de les détecter. Parmi ces algues commercialisées et qui sont attaquées par plusieurs pathogènes, on trouve *Chondrus crispus*. L'objectif de la thèse présentée dans ce manuscrit était donc d'élucider les bases biochimiques de l'interaction entre l'algue rouge *Chondrus crispus* et son pathogène endophyte *Acrochaete operculata*. En particulier, nous souhaitions tester l'hypothèse que la nature chimique des polysaccharides pariétaux des deux générations de l'hôte pouvait influencer la spécificité d'hôte soit,

- en bloquant la progression des filaments du pathogène dans les tissus de l'hôte par un mécanisme physique.

- en modulant la virulence du pathogène par un effet "signal".

 - en favorisant la susceptibilité de la phase sensible ou au contraire la mise en place de défense dans la génération résistante de l'hôte.

Par ailleurs, nous avons abordé l'identification et la purification de la molécule signal libérée par le pathogène A. operculata et qui est reconnue par le gamétophyte de C. crispus. D'autre part, nous avons recherché l'existence d'éliciteurs qui seraient reconnus par la phase sensible au pathogène, le sporophyte de C. crispus, et si ces éliciteurs étaient capables de conférer une résistance à cette algue rouge vis à vis de leur pathogène endophyte A. operculata. Nous avons également suivi les différents événements de signalisation et les réponses de défense induites au moment de l'interaction et leurs rôles dans la mise en place des mécanismes de défense chez C. crispus.

RESULTATS ET DISCUSSION

A- Les oligocarraghénanes modulent un dialogue hôte-pathogène dans l'interaction *Chondrus crispus-Acrochaete operculata* (Article 1).

La paroi cellulaire végétale joue un rôle très important dans les interactions plante-pathogène. Dans ce domaine, cette paroi a pour rôle d'empêcher la propagation des pathogènes et ainsi de conférer à la plante une protection physique contre ces agresseurs. Ces derniers sont dotés d'enzymes capables de dégrader la paroi de la plante et libèrent ainsi des oligosaccharides. Ces oligomères sont impliqués dans la mise en place des mécanismes de défense chez les plantes terrestres. Chez *C. crispus*, la phase matricielle de la paroi cellulaire est composée essentiellement de carraghénanes. Ces polymères sont dégradés par des enzymes spécifiques, appelées carraghénases, dont les produits d'hydrolyse sont des oligocarraghénanes. Ces enzymes carraghénolytiques, ,

et -carraghénases, sont purifiées à partir de trois genres de bactéries marines *Cytophaga, Alteromonas* et *Pseudomonas*. Elles sont spécifiques des liaisons -1,4 dans le polymère, et également de leurs substrats : une -carraghénase ne peut hydrolyser que du -carraghénane et ne peut pas hydrolyser du -carraghénane ou du -carraghénane. Il en est de même pour la -carraghénase et la -carraghénase. Les gènes correspondants à ces carraghénases ont été identifiés et clonés (Barbeyron et al., 1994 ; 1998 ; Michel et al., 1999). Les oligocarraghénanes obtenus avec ces enzymes ont été purifiés et analysés par HPLC et par RMN (Potin et al., 1991 ; 1995).

L'algue verte A. operculata est un pathogène qui envahit complètement le sporophyte de *C. crispus* et toutes les carraghénophytes de type , tandis que les gamétophytes (carraghénophytes de type) sont résistants à l'infection par cet endophyte. Ces observations suggèrent que ces carraghénanes seraient impliqués dans le modèle d'interaction *C. crispus*-A. operculata. L'effet des polymères et des oligomères de carraghénanes sur cette interaction a donc été étudié à deux niveaux :

1) leur effet sur le pathogène ;

2) l'action des extraits issus du pathogène préalablement élicité par ces carraghénanes sur l'hôte.



Figure 14 : Emission du peroxyde d'hydrogène par *A. operculata* élicité par les différents oligocarraghénanes

I) Le pathogène A. operculata possède une activité carraghénolytique modulée par les oligocarraghénanes.

Les pathogènes de plantes supérieures sont dotés d'enzymes capables de digérer les constituants de la paroi cellulaire de l'hôte et libèrent ainsi des signaux qui sont reconnus par l'hôte. Ces signaux élicitent la mise en place des réactions de défense et confèrent ainsi à la plante une protection vis à vis de son pathogène. La présence d'une hydrolase capable de dégrader les polymères de carraghénane a été étudiée chez A. *operculata*. En utilisant un substrat radioactif, les résultats montrent que l'endophyte A. *operculata* possède une activité carraghénolytique. Cette carraghénase dégrade beaucoup plus les carraghénanes du sporophyte (-carraghénane) que ceux du gamétophyte (et -carraghénanes). Cette activité carraghénolytique est également modulée par la structure des oligocarraghénanes. Il faut noter que les oligocarraghénanes les plus sulfatés induisent fortement l'activité de cette enzyme. En revanche, les polymères de carraghénanes sont incapables d'induire une activité carraghénolytique chez le pathogène A. *operculata* (Article 1).

II) Les oligocarraghénanes contrôlent la physiologie et la virulence du pathogène A. operculata.

L'effet de l'application des polymères et des oligomères de carraghénane sur l'émission des espèces activées de l'oxygène et la néosynthèse des protéines a été étudiée chez le pathogène *A. operculata.* Les oligo- et -carraghénanes sont capables d'éliciter une émission des espèces activées de l'oxygène chez l'endophyte (figure 14). Cependant, la production de peroxyde d'hydrogène est plus importante chez le pathogène élicité par les oligo- -carraghénanes que par les oligo- -carraghénanes. En outre, l'endophyte élicité par les oligo- -carraghénanes et le contrôle (l'endophyte non élicité) produisent de très faibles quantités de peroxyde d'hydrogène. Enfin, contrairement aux oligocarraghénanes, les polymères de carraghénanes sont incapables d'induire une émission des espèces activées de l'oxygène chez le pathogène *A. operculata.*

Les oligocarraghénanes issus de la paroi de C. crispus régulent également la synthèse des protéines chez le pathogène. En effet, 16 et 48 heures après élicitation par les oligo- et -carraghénanes on observe une absorption importante de la méthionine et la cystéine marquées au soufre 35 chez le pathogène. A la différence de ces oligosaccharides très sulfatés, les oligo- -carraghénanes provoquent une diminution de l'absorption de ces deux acides aminés chez l'endophyte 16, 48 et 96 heures après élicitation. Les oligo- -carraghénanes induisent la néosynthèse d'une protéine acide de 70 kDa et une forte expression d'une autre protéine acide de 38 kDa chez A. operculata, 6 jours après élicitation. Cette protéine apparaît également dans les extraits protéiques issus du pathogène élicité par les oligo- -carraghénanes pendant 8 jours. D'autre part, elle est toujours présente chez l'endophyte 8 jours après élicitation par les oligo-carraghénanes. En revanche, cette protéine est absente chez le pathogène non élicité ainsi que chez l'endophyte élicité par les oligo- -carraghénanes. De même, deux protéines de 38 et 40 kDa sont fortement exprimées chez A. operculata élicité par les oligo- -carraghénanes et les oligo- -carraghénanes pendant 8 jours (Article 1). Comme pour l'activité carraghénolytique et l'émission des espèces activées de l'oxygène, les polymères de carraghénanes n'induisent pas la néosynthèse de ces trois protéines (P70; P40; P38). Ces observations montrent que les oligo- -carraghénanes et les oligo- carraghénanes sont reconnus par l'endophyte A. operculata. Cette reconnaissance se traduit par une induction d'activité carraghénolytique, un burst oxydatif et la néosynthèse de nouvelles protéines.

Les oligosaccharides de la paroi de l'hôte *C. crispus* sont aussi capables de contrôler le pouvoir pathogène de l'endophyte *A. operculata*. En particulier, les zoospores issues d'A. operculata préalablement élicité par les oligo- -carraghénanes, provenant du sporophyte, envahissent complètement les gamétophytes qui normalement sont résistants au pathogène (figure 15). Cette infection est comparable à celle observée chez le sporophyte, la phase sensible à l'endophyte. Ces zoospores développent des filaments qui infectent à la fois la zone corticale et médullaire. Inversement, les sporophytes infectés par les zoospores issues du pathogène préalablement élicité par les oligo- -carraghénanes, provenant du gamétophyte, présentent des taux d'infection très faibles. Les zoospores qui arrivent à infecter ces thalles développent des filaments qui restent toujours confinés entre l'épiderme et le



Figure 15 : Effet du prétraitement du pathogène *A. operculata* par les oligo- λ -carraghénanes sur l'infection du gamétophyte de *C. crispus*.

(A, C) : gamétophyte infecté par le pathogène non prétraité (A, vue de surface ; C, coupe transversale)

(B, D) : gamétophyte infecté par l'endophyte préalablement traité par les oligo- λ -carraghénanes (B, vue de surface ; D, coupe transversale).

cortex (figure 16). Ces résultats suggèrent que les oligocarraghénanes contrôlent la virulence du pathogène *A. operculata* : les oligo- -carraghénanes élicitent cette virulence tandis que les oligo- -carraghénanes l'inhibent.

III) Les oligocarraghénanes modulent la composition des extraits d'A. *operculata* qui déclenchent un burst oxydatif chez les gamétophytes de *C. crispus*.

L'effet des extraits issus du pathogène non élicité ou mis en présence de différents oligo-carraghénanes sur le burst oxydatif chez les gamétophytes et les sporophytes de C. crispus a été également testé (figure 17). Les extraits de l'endophyte, élicité ou non, induisent une accumulation faible du peroxyde d'hydrogène chez les sporophytes. En revanche, les gamétophytes produisent des quantités importantes de peroxyde d'hydrogène au contact des extraits d'A. operculata. L'amplitude de cette "explosion" oxydative est comparable à celle observée chez les plantes supérieures. Le gamétophyte non élicité produit de très faible quantité de peroxyde d'hydrogène (contrôle). L'intensité de ce burst oxydatif est indirectement modulée par ces oligocarraghénanes. En effet, les extraits issus du pathogène élicité par les oligo- -carraghénanes induisent un burst oxydatif beaucoup plus important que celui observé en présence des extraits de l'endophyte non élicité chez le gamétophyte de C. crispus. Toutefois, les extraits provenant de l'endophyte élicité par les oligo- -carraghénanes sont incapables d'éliciter un burst oxydatif chez les gamétophytes de C. crispus. De plus, les extraits issus du pathogène mis en présence des oligo- -carraghénanes sont capables de réduire le burst oxydatif déclenché préalablement par les extraits de l'endophyte élicité par les oligocarraghénanes. Ce résultat montre que les oligo- -carraghénanes élicitent une (des) molécule (s) et ou des enzymes, chez A. operculata, qui sont capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène libéré par les gamétophytes de C. crispus après élicitation. Dans ce contexte nous avons commencé à chercher si ces oligo- -carraghénanes induisent la synthèse de certaines enzymes de détoxication du peroxyde d'hydrogène (peroxydases et catalases). J'ai ainsi montré que les oligo- -carraghénanes élicitent une isoforme de peroxydase chez A. operculata, absente chez le contrôle et en présence des oligo-carraghénanes. Par ailleurs, les polymères et les oligomères de carraghénanes ne sont pas directement reconnus par l'algue rouge C. crispus. Les oligosaccharides sulfatés de la



Figure 16 : Effet du prétraitement du pathogène *A. operculata* par les oligo-κcarraghénanes sur l 'infection du sporophyte de *C. crispus*.

(A, C) : sporophyte infecté par le pathogène non prétraité (A, vue de surface ; C, coupe transversale)

(B, D) : sporophyte infecté par l'endophyte préalablement traité par les oligo- κ -carraghénanes (B, vue de surface ; D, coupe transversale).



Figure 17 : Le burst oxydatif induit par les extraits d'A. operculata élicité par les différents oligocarraghénanes chez C. crispus. A : sporophytes; B : gamétophytes

Résultats et Discussion

paroi de l'hôte *C. crispus* jouent donc un rôle primordial dans le contrôle de la physiologie et la virulence du pathogène *A. operculata.* Le seul exemple connu du rôle des groupements ester-sulfoniques dans les interactions plantes-microorganismes est celui des facteurs nod dans le système Rhizobiacées-Légumineuses (Lerouge et al., 1990; Roche et al., 1991 ; Truchet et al., 1991). Cependant, l'héparane sulfate, qui est une glycosaminoglycane, est reconnu par les systèmes animaux. Il se lie essentiellement au collagène et aux interférons de type gamma de ces cellules animales. Cette reconnaissance confère à ces cellules des moyens de protection contre plusieurs maladies (Lortat-Jacob et al., 1995; Praillet et al., 1998; Sadir et al., 1998; Amara et al., 1999).

IV) Le burst oxydatif est indispensable pour la mise en place des réactions de défense chez les gamétophytes de *C. crispus*.

Le rôle des espèces activées de l'oxygène dans la résistance des gamétophytes de C. crispus contre le pathogène A. operculata a été également étudié. En effet, les gamétophytes traités par le DPI (diphénylène iodonium), un inhibiteur de la NADPH oxydase de mammifères et d'autres flavoprotéines, sont incapables de produire du peroxyde d'hydrogène après élicitation par les extraits du pathogène (figure 18A), ces gamétophytes sont également incapables de développer une résistance contre leur agresseur. Ce dernier envahit toute la plante et infecte tous les tissus de l'hôte (figure 18D; 18E). Ces résultats montrent que le peroxyde d'hydrogène joue un rôle clé dans la mise en place des réactions de défense chez l'algue rouge C. crispus. L'inhibition du burst oxydatif par le DPI suggère la présence d'une NADPH oxydase similaire à celle découverte chez les animaux (Segal et Abo, 1993) et les plantes supérieures (Jabs et al., 1997; Pugin et al., 1997; Keller et al. 1998; Romeis et al., 1999). Chez certaines plantes supérieures, l'inhibition du burst oxydatif par le DPI supprime les réponses de défense et rend les plantes susceptibles à leur pathogène (Jabs et al., 1997). Les espèces activées de l'oxygène sont impliquées dans l'induction de la résistance locale et générale (résistance systémique acquise) chez certains végétaux supérieurs (Alvares et al., 1998 ; Van Camp et al., 1998). Cependant, le peroxyde d'hydrogène n'est pas suffisant pour


Figure 18 : Le DPI inhibe le burst oxydatif et la résistance contre le pathogène *A. operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus*.

(A) : burst oxydatif induit par les extraits du pathogène et inhibition par le traitement au DPI (B, C, D, E) : infection du gamétophyte par *A. operculata* ; (B, D) contrôle ; (C, E) gamétophyte traité par 5 μ M de DPI

(B, C) : vues de surface

(D, E) : coupes transversales.

Résultats et Discussion

induire la réaction hypersensible, l'activité phénylalanine ammonia-lyase et l'accumulation de l'acide salicylique chez le tabac (Dorey et al., 1999).

Comme les mammifères et les plantes supérieures, les algues sont aussi capables de produire un burst oxydatif en réponse à un éliciteur libéré par le pathogène ou par la plante elle-même, comme dans la reconnaissance des oligoalginates par *L. digitata* (Küpper et al., 2000) et les oligoagars par *G. conferta* (Weinberger et al., 1999). Ces observations suggèrent que ce mécanisme de défense, uniquement connu chez les mammifères et les plantes terrestres, est une stratégie ancienne qui a été inventée avant la diversification des eucaryotes et probablement présente chez la majorité des eucaryotes.

Extrait d'A. operculata





Figure 19 : Les étapes de purification du signal d'A. *operculata* reconnu par les gamétophytes de *C. crispus*.

B- Caractérisation et purification du signal, provenant du pathogène A. *operculata*, reconnu par l'hôte *C. crispus*.

L'activation des événements de signalisation qui induisent la mise en place des mécanismes de défense chez les plantes supérieures est initiée par des molécules élicitrices libérées par le pathogène ou par les plantes. Ces molécules ont été caractérisées et purifiées à partir de plusieurs plantes terrestres et de certains pathogènes. Ces éliciteurs purs isolés induisent les mêmes réponses de défense que le pathogène entier dans le cas d'une réaction incompatible.

Les oligosaccharides issus de la paroi des algues marines après digestion par des enzymes spécifiques ont été caractérisés et purifiés au laboratoire (Potin et al., 1991 ; 1999 ; Lépagnol-Descamps et al., 1998). Ces éliciteurs purs sont reconnus par certaines plantes supérieures, comme le blé, l'orge, le riz, la vigne, le pommier et la tomate, et sont capables d'induire des mécanismes de défense contre l'infection par des pathogènes causant d'importants dégâts à ces plantes d'intérêt agronomique (Joubert et al., 1998). Ces oligosaccharides sont aussi reconnus par les plantes marines. Cette reconnaissance se traduit par un burst oxydatif et une induction de composés halogénés volatils (Weinberger et al., 1999 ; Küpper et al., 2000). En outre, aucune molécule élicitrice provenant de pathogènes d'algues marines n'a été caractérisée et purifiée à ce jour. Le gamétophyte de C. crispus est capable de produire du peroxyde d'hydrogène et de mettre en place des réactions de défense en réponse à des extraits du pathogène A. operculata. Le but de ce travail était donc de caractériser et purifier la (ou les) molécule(s) libérée(s) par l'endophyte et reconnue(s) par les gamétophytes de C. crispus au moment de l'infection. La figure 19 résume les différentes étapes de purification du signal d'A. operculata. Les fractions actives sont retenues pour leur capacité à induire un burst oxydatif chez les gamétophytes de C. crispus. Le surnageant obtenu après l'étape de précipitation (figure 19) dans l'éthanol 70% est actif. L'analyse de ce surnageant par chromatographie d'échange d'anions de haute performance et détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD, DIONEX) en utilisant une méthode de séparation d'oligosaccharides peu chargés, montre la présence de plusieurs oligosaccharides de degrés de polymérisation variables (figure 20A). Après passage sur une colonne d'échanges d'anions DEAE sepharose et sur une colonne de filtration sur gel, la fraction



Figure 20 : Profils chromatographiques des oligosaccharides présents dans l'extrait (A) et la fraction active de l'endophyte *A. operculata* (B), et l'extrait de ce pathogène élicité par les oligo- λ -carraghénanes (C).

active contient un oligosaccharide de poids moléculaire proche de 3000 Da. Après une deuxième analyse par HPAEC-PAD (DIONEX), le chromatogramme montre un pic majeur numéroté 5 (figure 20B). Le dosage qualitatif des acide uroniques par HPAEC-PAD (DIONEX) et quantitatif par spectrophotométrie montre que cette fraction est riche en acides uroniques notamment en acide glucuronique. Un traitement de cette fraction active par l'acide trifluoracétique qui dégrade les liaisons osidiques hydrolyse cet oligosaccharide de 3000 Da et rend cette fraction incapable d'induire un burst oxydatif chez les gamétophytes. Comme indiqué précédemment, l'extrait issu de l'endophyte préalablement élicité par les oligo- -carraghénanes est incapable d'éliciter la production des espèces activées de l'oxygène chez les gamétophytes de C. crispus. Remarquablement, l'analyse de cet extrait montre un chromatogramme complètement différent de celui obtenu pour la fraction active purifiée à partir d'un extrait d'A. operculata non élicité et notamment l'absence du pic numéroté 5 (figure 20C). Enfin l'analyse de la composition en monosaccharides de ces deux extraits a été réalisée. Les résultats montrent que l'application des oligo- -carraghénanes modifient la composition du signal du pathogène en molécules saccharidiques (figure 21). En effet, l'extrait issu de l'endophyte préalablement élicité par les oligo--carraghénanes ne contient pratiquement pas de galactose et de fucose (figure 21B). En revanche, la fraction active est riche en galactose et en fucose (figure 21A). A noter que le glucose et le rhamnose existent en quantité similaire dans les deux extraits. Ces résultats suggèrent que la molécule signal libérée par *A. operculata* au moment de son interaction avec *C. crispus* serait un oligosaccharide d'un poids moléculaire proche de 3000 Da et composé de fucose et de galactose ainsi que d'acides uroniques (acide glucuronique).



Figure 21 : Profils chromatographiques des monosaccharides obtenus par dégradation de la fraction active de l'endophyte (A) et de l'extrait d'*A. operculata* élicité par les oligo- λ -carraghénanes (B).

- (1) : fucose
- (2) : rhamnose
- (3) : galactose
- (4) : glucose

C- Les réactions de défense et la protection induite par les éliciteurs oligosaccharidiques chez *C. crispus* (Article 2).

L'effet des oligosaccharides dans la mise en place des réactions de défense est maintenant bien établi chez les plantes supérieures. En revanche, rien n'est encore connu chez les algues. Cette partie illustre les réactions de défense élicitées par le signal d'A. operculata chez les gamétophytes de *C. crispus* ainsi que celles induites par les oligoalginates, via le burst oxydatif, chez les sporophytes de *C. crispus*. Cette partie traite également de l'effet des inhibiteurs de la production du peroxyde d'hydrogène, et de la voie de biosynthèse de l'acide shikimique dans la mise en place de ces réactions de défense chez les gamétophytes de *C. crispus*.

I) Des composés autofluorescents sont fortement synthétisés autour des zones de pénétration par les zoospores d'A. *operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus*.

Comme signalé précédemment, A operculata est un pathogène endophyte qui envahit complètement les sporophytes de *C. crispus* tandis que les gamétophytes sont résistants à ce pathogène. Cet endophyte est confiné au niveau des premières cellules du cortex des gamétophytes de *C. crispus* (Correa et al., 1988). De plus, ces gamétophytes sont capables de produire un burst oxydatif en présence des extraits d'A. operculata. Ces derniers sont très faiblement reconnus par la phase sensible au pathogène et induisent une production faible de peroxyde d'hydrogène chez ces sporophytes.

Il est maintenant bien établi que les composés autofluorescents observés chez les plantes supérieures, après excitation dans l'UV, correspondent à des composés phénoliques (Bennett et al., 1996). Ces métabolites sont issus de la voie des phénylpropanoïdes et sont induits en réponse à une agression chez les végétaux supérieurs. Ces composés autofluorescents s'accumulent en général autour des zones de pénétration de l'agent pathogène. Ils sont toxiques et également supposés participer aux processus de renforcement des parois par pontage oxydatif, et permettent de bloquer la propagation du pathogène et de conférer ainsi une protection vis à vis des agresseurs (Bennett et al., 1996 ; Dorey et al., 1997 ; McLusky et al., 1999). Chez *C. crispus*, les gamétophytes, la phase résistante au pathogène *A. operculata*, présentent une très forte



Figure 22 : Accumulation des composés autofluorescents au niveau des sites de pénétration des zoospores d'A. operculata (flèches) chez C. crispus.

- (A, C) : gamétophytes
- (B, D) : sporophytes
- (A, B : observations en microscope optique ;
 (C, D) : observations en microscope à fluorescence avec excitation dans l'UV.

Résultats et Discussion

accumulation de composés fluorescents dans l'UV autour des zones de pénétration par les zoospores du pathogène (figure 22A, 22C). En revanche, cette accumulation est absente chez la phase susceptible à l'endophyte, les sporophytes (figure 22B, 22D). Ces observations montrent que les gamétophytes sont capables de reconnaître le pathogène en accumulant des métabolites autour des zones d'infection pour empêcher ainsi la propagation de ce pathogène. Par contre, les sporophytes sont incapables de reconnaître cet endophyte et sont donc incapables de synthétiser ces composés autofluorescents. Ainsi l'envahissement total de la phase diploïde par le pathogène A. *operculata* pourrait être facilité par l'absence de modification des parois des cellules au contact de la germination de l'endophyte.

II) Le burst oxydatif contrôle la synthèse des composés autofluorescents autour des zones de pénétration par les zoospores d'A. *operculata* chez les gamétophytes de *C*. *crispus*.

Le burst oxydatif joue un rôle prépondérant dans la mise en place des réactions de défense chez certaines plantes supérieures (Jabs et al., 1997 ; Alvares et al., 1998). Précédemment, nous avons montré que des gamétophytes de *C. crispus* traités par le DPI, un inhibiteur de la NADPH oxydase de mammifères, sont incapables de produire du peroxyde d'hydrogène après élicitation par le signal d'A. *operculata* et sont ainsi susceptibles à l'endophyte (Article 1). Ces plantes présentent également une très faible accumulation de ces composés autofluorescents autour des zones d'infection (figure 23C, 23D). De même, les gamétophytes de *C. crispus* sont sensibles à l'infection par des zoospores de l'endophyte préalablement élicité par des oligo- -carraghénanes. Ces gamétophytes synthétisent également de très faibles quantités de composés autofluorescents autour des zones de pénétration par les endophytes préalablement élicités par des oligo- -carraghénanes (figure 23E, 23F). Tous ces résultats montrent bien l'implication du burst oxydatif dans l'élicitation de la synthèse des composés autofluorescents et la mise en place des réponses de défense autour des zones d'infection par A. *operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus*.



Figure 23 : L'inhibition du burst oxydatif supprime l'accumulation des composés autofluorescents autour des zones de pénétration par les zoospores d'*A. operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus.*

(A, B) : contrôles

(C, D) : gamétophytes traités par 5 μ M de DPI

(E, F) : gamétophytes infectés par l'endophyte préalablement élicité par les oligo- λ -carraghénanes

(A, C, E) : vues de surface sous microscope optique

(B, D, F) : vues de surface sous microscope à fluorescence avec excitation dans l'UV).



(1-4) β-D-mannuronate



(1-4) α-L-guluronate



В

3

D

Ő

но



Μ

G





- 0

HO









Figure 24 : Structure de l'alginate : les monomères d'acide uronique (A), les blocs GG (B), les blocs MM (C) et les blocs MG (D).

Résultats et Discussion

III) Les oligoalginates sont capables de produire un burst oxydatif chez *C. crispus.*

Les alginates sont des polymères, constituants principaux de la matrice de la paroi des algues brunes. Ils sont composés de résidus de -1,4 - D - mannuronate et d' -1,4 -L -guluronate qui peuvent être liés en blocs composés d'un seul acide uronique ou en séquences mixtes. Les blocs d'acide polyguluroniques présentent une conformation ordonnée proche de celle des séquences polygalacturoniques des pectines des végétaux supérieurs (figure 24). Ces polymères sont dégradés par des enzymes spécifiques, les alginates lyases, libérant ainsi des oligoalginates (Boyen et al., 1990a ; 1990b). Ces oligosaccharides sont reconnus par une algue brune *Laminaria digitata* (Küpper et al., 2000). Cette reconnaissance se traduit par une consommation importante de l'oxygène et une émission massive de peroxyde d'hydrogène quelques minutes après élicitation par ces oligoalginates (Küpper et al., 2000). J'ai montré que certains oligoalginates sont également capables d'induire un burst oxydatif chez les gamétophytes et les sporophytes de *C. crispus* (figure 25). La concentration de peroxyde d'hydrogène produit est maximale à une concentration de 150 µg/ml d'oligoalginates. La cinétique de ce burst oxydatif est similaire entre les gamétophytes et les sporophytes de *C. crispus*.

IV) Les oligoalginates induisent une protection efficace chez C. crispus vis à vis de son pathogène endophyte A. operculata.

Les oligoalginates, reconnus par *C. crispus*, qui déclenchent un burst oxydatif sont aussi capables de conférer une protection aux sporophytes de *C. crispus* vis à vis de leur pathogène *A. operculata*. Cette résistance se traduit par une réduction très importante du taux d'infection à partir d'une concentration en éliciteur de 50 µg/ml et atteint un maximum de réduction à 150 µg/ml et 500 µg/ml (**figure 26**). Ces oligoalginates sont capables d'induire l'accumulation des composés autofluorescents autour des zones d'infection chez les sporophytes de *C. crispus* (**figure 26**). En effet, l'application d'une concentration de 150 ou 500 µg/ml d'oligoalginates élicitent une très forte accumulation de ces composés autofluorescents autour des zones de pénétration par le pathogène chez les sporophytes de *C. crispus*. Le temps de contact nécessaire pour reconnaître ces oligoalginates et induire ainsi tous les événements de signalisation et une protection



Figure 25 : Le burst oxydatif élicité par différentes concentrations d'oligoalginates chez les sporophytes (A) et les gamétophytes (B) de *C. crispus*.



Figure 26 : Les oligoalginates induisent la résistance et l'accumulation des composés autofluorescents autour des zones de pénétration par les zoospores d'*A. operculata* chez les sporophytes de *C. crispus*.

(A, B, C) : contrôles

(D, E, F) : sporophytes élicités par 20 $\mu g/ml$ d'oligoalginates et infectés 24 heures après traitement

(G, H, I) : sporophytes élicités par 50 $\mu g/ml$ d'oligoalginates et infectés 24 heures après traitement

 $(J,\,K,\,L)$: sporophytes élicités par 150 $\mu g/ml$ d'oligoalginates et infectés 24 heures après traitement

(A, D, G, J) : vues de surface sous microscope optique

 $(B, E, H, K): vues \ de \ surface \ sous \ microscope \ à \ fluorescence \ avec \ excitation \ dans \ l'UV$

(C,F,I,L): coupes transversales



Figure 27 : La cinétique de développement de la résistance contre A. operculata après traitement par 150 μ g/ml d'oligoalginates chez les sporophytes de C. crispus. La fréquence d'infection du contrôle (sporophyte non traité par les oligoalginates) est de 100%.

efficace est de 30 min. Cette protection est maximale à partir de 24 heures après élicitation et peut durer jusqu'à 7 jours (figure 27). De plus, des gamétophytes de *C. crispus* prétraités par une concentration de 150 μ g/ml d'oligoalginates sont très résistants à l'infection par l'endophyte préalablement élicité par les oligo- carraghénanes et dont les zoospores sont massivement virulentes contre les gamétophytes de *C. crispus* (Article 1). Le pathogène est bloqué au niveau des premières cellules du cortex. Certains de ces endophytes présentent un long poil qui émerge vers l'extérieur.

Dans l'interaction *C. crispus-A. operculata*, la résistance systémique acquise et le burst systémique sont absents. En effet, Le traitement d'une partie des thalles de sporophytes de *C. crispus* par des oligoalginates induit une résistance et une production du peroxyde d'hydrogène uniquement dans la partie élicitée. La résistance systémique acquise est mise en place chez les végétaux supérieurs par des transmissions intercellulaires d'un messager qui est pour l'instant non identifié bien que l'acide jasmonique, l'éthylène et l'acide salicylique soient impliqués dans cette transmission. De même, l'inoculation des plantes d'Arabidopsis thaliana par une souche avirulente de *Pseudomonas syringae* induit un burst oxydatif local au niveau des zones d'infection et un burst oxydatif systémique au niveau des tissus non infectés. Ces deux bursts (local et systémique) sont impliqués dans la mise en place d'une résistance systémique acquise chez ces plants d'A. thaliana (Alvares et al., 1998).

Mes résultats suggèrent que les oligoalginates sont capables de protéger localement et efficacement l'algue rouge *C. crispus* vis à vis de son pathogène *A. operculata.* Cette protection est associée à l'accumulation de composés fluorescents dans l'UV autour des zones de pénétration par l'endophyte. Une protection totale de l'algue nécessite un traitement de la plante entière par ces oligosaccharides. D'un point de vue évolutif il est possible que l'acquisition des mécanismes de résistance systémique ait évolué avec la vascularisation chez les spermaphytes. V) L'inhibition de la voie de l'acide shikimique supprime la résistance et l'accumulation des composés autofluorescents autour des zones d'infection par A. operculata chez C. crispus.

L'acide shikimique est un composé responsable de la synthèse des acides aminés aromatiques, le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Ce dernier acide aminé est le précurseur de la formation de plusieurs métabolites secondaires notamment les composés phénoliques chez les végétaux supérieurs. Une inhibition de la synthèse de l'acide shikimique induit une suppression de la synthèse de certains métabolites secondaires et rend ainsi les plantes susceptibles à leurs pathogènes. En effet, une plante légumineuse, Cassia obtusifolia, traitée par le glyphosate, un inhibiteur de la 5énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP), est incapable de synthétiser certains métabolites secondaires notamment les phytoalexines. Ces plantes traitées deviennent susceptibles à leur pathogène Alternaria cassiae (Sharon et al., 1992). L'effet de cet inhibiteur sur la résistance des gamétophytes de C. crispus contre leur pathogène A. operculata a été étudié. Les résultats montrent que des gamétophytes, naturellement résistants à l'endophyte, traités par cet inhibiteur deviennent sensibles au pathogène avec des taux d'infection comparables à ceux de la phase sensible à A. operculata (figure 28). Ce pathogène envahit complètement l'épiderme, le cortex et la medulla de ces thalles traités par le glyphosate (figure 28F). Remarquablement, ces gamétophytes présentent de faible accumulation des composés autofluorescents autour des zones de pénétration par l'endophyte (figure 28D). Ces résultats montrent que l'acide shikimique est indispensable pour induire l'accumulation de ces composés autofluorescents et conférer ainsi une protection efficace chez les gamétophytes de C. crispus vis à vis de son pathogène A. operculata.



Figure 28 : Le glyphosate inhibe la résistance et l'accumulation des composés autofluorescents autour des zones de pénétration par les zoospores d'*A. operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus.*

(A, C, E) : contrôles (A, C, vues de surface respectivement sous microscope optique et à fluorescence avec excitation dans l'UV ; E, coupe transversale)

(B, D, F) : gamétophytes traités par 50 μ M de glyphosate (B, D, vues de surface respectivement sous microscope optique et à fluorescence avec excitation dans l'UV ; F, coupe transversale).

VI) Effet du glyphosate sur l'activité shikimate déshydrogénase induite par le signal d'A. *operculata* chez les gamétophytes et par les oligoalginates chez les sporophytes de *C. crispus*.

La plupart des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de l'acide shikimique sont activées par l'application d'un éliciteur ou en réponse à une attaque par des pathogènes chez les végétaux supérieurs. L'effet du signal d'A. operculata et des oligoalginates sur l'activité shikimate déshydrogénase, une enzyme responsable de la formation de l'acide shikimique, a été testé chez les sporophytes et les gamétophytes de C. crispus. En effet, l'activité de cette enzyme est fortement induite 24 heures après élicitation par le signal d'A. operculata chez les gamétophytes de C. crispus (figure 29A). De même, elle est fortement élicitée, 24, 72 et 168 heures après traitement par une concentration de 150 µg/ml d'oligoalginates chez les sporophytes (figure 29B). Cette concentration d'oligoalginates est également capable d'induire une protection efficace, 24, 72 et 168 heures après traitement, contre le pathogène A. operculata chez les sporophytes de C. crispus (figure 27). Le traitement des thalles de gamétophytes et de sporophytes de C. crispus par cet inhibiteur de la voie de biosynthèse de l'acide shikimique (le glyphosate) induit une inhibition de l'activité shikimate déshydrogénase élicitée par le signal d'A. operculata chez les gamétophytes ainsi que celle élicitée par les oligoalginates chez les sporophytes de C. crispus (figure 29). Ces observations montrent que la voie de biosynthèse de l'acide shikimique est impliquée dans l'interaction C. crispus-A. operculata et est activée par la reconnaissance des oligoalginates par *C*. crispus. Ce métabolite pourrait être le précurseur des composés autofluorescents induits dans les algues résistantes à l'infection.



Figure 29 : Elicitation de l'activité shikimate déshydrogénase, inhibée par le glyphosate, par le signal d'*A. operculata* et les oligoalginates chez *C. crispus*.

A : gamétophytes (1, contrôle ; 2, 24 heures après élicitation par le signal d'*A. operculata* ; 3, traitement par 50 μ M de glyphosate et élicitation par le signal d'*A. operculata*

B : sporophytes (a, élicitation par 50 μ g/ml d'oligoalginates ; b, traitement par 50 μ M de glyphosate et élicitation par 150 μ g/ml d'oligoalginates).

D- Les événements de transduction du signal chez C. crispus (Article 3).

Les événements de signalisation qui suivent la reconnaissance d'un éliciteur des réactions de défense ont été bien étudiés chez les plantes terrestres (Ebel and Mithöfer, 1998). L'utilisation des inhibiteurs et des activateurs des différentes voies de signalisation chez les animaux a permis d'élaborer des modèles de transduction des signaux et d'induction des réponses de défense chez les plantes supérieures. Ces études à caractère pharmacologique ont montré l'implication des protéines G, des phospholipases, des canaux ioniques, des protéines kinases, de la NADPH oxydase, du NO et de la lipoxygénase dans la transduction du signal suite à une élicitation ou une infection (Wojtaszek, 1997 ; Ebel et Mithöfer, 1998). Pour étudier les différents événements et voies de signalisation induites chez *C. crispus* en réponse à l'éliciteur libéré par le pathogène A. operculata, j'ai conduit une approche pharmacologique en utilisant des inhibiteurs et des activateurs étudiés chez les plantes terrestres.

I) Les événements qui précèdent le burst oxydatif chez C. crispus.

Les études pharmacologiques ont prouvé l'implication des phospholipases (A2 et C), des canaux ioniques et des protéines kinases dans les événements de signalisation qui précèdent le burst oxydatif induit par le signal d'A. operculata chez C. crispus. En effet, le traitement des gamétophytes par des inhibiteurs spécifiques des phospholipases A2 et C, respectivement le chlorpromazine-HCl et l'U73122, engendre une suppression de la production de peroxyde d'hydrogène élicité par le signal d'A. operculata chez les gamétophytes de C. crispus. Le lanthanum et l'anthracène-9-carboxylate, inhibiteurs respectivement des canaux calciques et des canaux anioniques chez les plantes supérieures, inhibent également le burst oxydatif déclenché par le signal d'A. operculata chez C. crispus traités par l'ionophore de calcium (A23187). Une application combinée de l'ionophore et du signal d'A. operculata induit une accumulation de peroxyde d'hydrogène beaucoup plus importante que celle observée en présence soit de l'ionophore seul soit du signal d'A. operculata seul chez les gamétophytes de C. crispus. La phosphorylation et déphosphorylation des protéines jouent un rôle important dans



Figure 30 : Effet des inhibiteurs de kinases sur le burst oxydatif élicité par le signal d'A. *operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus*. La production du peroxyde d'hydrogène est mesurée 2 heures après élicitation.

les événements de signalisation chez les plantes supérieures. L'inhibition de ce phénomène supprime la production de peroxyde d'hydrogène chez les animaux et les végétaux supérieurs. L'application de la staurosporine, un inhibiteur général de ces protéines kinases, induit une inhibition de la production du peroxyde d'hydrogène chez les gamétophytes de *C. crispus* élicités par le signal d'A. *operculata*. Ces résultats montrent que les événements de signalisation qui précèdent le burst oxydatif induit par le signal d'A. *operculata* chez *C. crispus* sont similaires à ceux observés chez les animaux et les végétaux supérieurs. De même, des études pharmacologiques ont également montré que ces événements qui précédent le burst oxydatif induit par les oligoalginates chez l'algue brune *Laminaria digitata* sont similaires à ceux observés chez les plantes supérieures et *C. crispus* (Küpper et al, 2000).

II) La source des espèces activées de l'oxygène chez C. crispus.

La quinacrine, un inhibiteur de la phospholipase A2 et de flavoprotéines comme la NADPH oxydase, ainsi que le DPI, suppriment le burst oxydatif élicité par le signal d'A. operculata chez les gamétophytes de C. crispus. Par ailleurs, l'azide de sodium (NaN₃) et le cyanure de potassium (KCN), des inhibiteurs de peroxydases, ne bloquent pas le burst oxydatif déclenché par le signal d'A. operculata et les oligoalginates respectivement chez C. crispus et L. digitata. Ces résultats suggèrent que la production de O₂⁻ au cours du burst oxydatif est catalysée par la NADPH oxydase chez C. crispus. Cette enzyme est aussi impliquée dans la production des espèces activées de l'oxygène chez les animaux et plusieurs plantes supérieures.

III) Les MAP kinases sont indispensables aux événements de signalisation et à la mise en place de la résistance chez les gamétophytes de *C. crispus*.

Les gamétophytes de *C. crispus* traités par des inhibiteurs spécifiques des MAP kinases (PD 98059 et l'apigénine) répondent toujours à l'application de signaux d'A. *operculata* par l'émission de peroxyde d'hydrogène (figure 30). L'inhibition du burst oxydatif par la staurosporine (figure 30) rend les gamétophytes sensibles à leur pathogène et supprime l'accumulation des composés autofluorescents autour des zones

Résultats et Discussion

d'infection par l'endophyte (figure 31D, 31E, 31F) qui sont pourtant en fortes quantités autour des zones de pénétration par A. operculata dans les gamétophytes résistants (figure 31A, 31B, 31C). Par ailleurs, les gamétophytes traités par le PD 98059 et l'apigénine sont incapables de développer une résistance contre l'endophyte (figure 31G à L). Ces gamétophytes sont complètement envahis par le pathogène A. operculata (figure 31G, 31I, 31J, 31L) et présentent aussi de très faibles accumulations de composés autofluorescents autour des zones d'infection (figure 31H, 31K). Ces résultats suggèrent la présence de certaines kinases en amont du burst oxydatif et d'autres en aval ou indépendantes de ce burst oxydatif chez l'hôte. Ces résultats montrent que les MAP kinases sont indispensables à la mise en place des réactions de défense chez les gamétophytes de *C. crispus*. Ces observations suggèrent la présence d'au moins deux voies de signalisation nécessaires à la mise en place de la même réponse de défense chez l'algue rouge *C. crispus*. Ces voies peuvent également être interconnectées pour conférer à l'algue une meilleure protection. Ces observations sont aussi décrites chez les plantes terrestres (Yang et al., 1997; Romeis et al., 1999; Desikan et al., 1999).

IV) Le SHAM, un inhibiteur de lipoxygénase, inhibe la résistance et l'accumulation des composés autofluorescents autour des zones d'infection par *A*. *operculata* chez les gamétophytes de *C*. *crispus*.

La lipoxygénase est une enzyme responsable de la synthèse de plusieurs octadécanoïdes notamment l'acide jasmonique chez les plantes supérieures. Cette enzyme est fortement induite par l'application des éliciteurs ou en réponse à une agression chez les végétaux supérieurs. Elle est inhibée par plusieurs inhibiteurs comme le SHAM, la quercétine, l'esculétine et le n-propylgallate (Fournier et al., 1993). L'effet d'une concentration de 1 mM de SHAM a été testé sur les gamétophytes de *C. crispus*. Cette concentration n'a pas d'effet sur le burst oxydatif élicité par le signal d'A. *operculata*. En revanche, les gamétophytes traités par cet inhibiteur sont complètement envahi par le pathogène A. *operculata*. Ces gamétophytes présentent également de très faibles accumulations des composés autofluorescents autour des zones de pénétration par l'endophyte (figure 32). Ces résultats suggèrent que la voie de synthèse des



Figure 31 : Les inhibiteurs de kinases suppriment la résistance et l'accumulation des composés autofluorescents autour des zones d'infection par les zoospores d'*A. operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus.*

(A, B, C) : contrôles

(D, E, F) : gamétophytes traités par 20 $\mu \textbf{M}$ de straurosporine

(G, H, I) : gamétophytes traités par 20 µM d'apigénine

(J, K, L) : gamétophytes traités par 250 µM de PD98059

(A, D, G, J) : vues de surface sous microscope optique

(B, E, H, K) : vues de surface sous microscope à fluorescence avec excitation dans l'UV

(C, F, I, L) : coupes transversales.

oxylipines pourrait être également impliquée dans la mise en place des réactions de défense chez *C. crispus.*



Figure 32 : Le SHAM inhibe la résistance et l'accumulation des composés autofluorescents autour des zones d'infection par les zoospores d'*A. operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus*.

(A, C, E) : contrôles (A, C, vues de surface respectivement sous microscope optique et à fluorescence avec excitation dans l'UV ; E, coupe transversale) (B, D, F) : gamétophytes traités par 1 mM de SHAM (B, D, vues de surface respectivement sous microscope optique et à fluorescence avec excitation dans l'UV ; F, coupe transversale).

E- Elicitation des composés halogénés et des mycosporines like aminoacids par le signal d'*A. operculata* et les oligoalginates chez *C. crispus*.

I) Composés halogénés volatils

Les composés halogénés sont des halocarbones volatils présents à l'état de traces dans les eaux côtières et océaniques (Lovelock et al., 1973). Ces halocarbones sont soit iodés, chlorés ou bromés. Parmi ceux ci, on trouve de l'iodométhane, l'iodoéthane, le chlorobromométhane, le bromoforme et le chloroforme. Certains de ces composés sont d'origines anthropiques comme les chlorofluorocarbones (Fréons). A la différence des plantes terrestres, les plantes marines sont capables de produire la plupart de ces composées halogénés volatils (Moore, 1977; Gschwend et al., 1985 ; Gschwend et Macfarlane, 1986; Manley et Dastoor, 1987; Manley et al 1992; Abrahamsson et al., 1995 ; Nightingale et al., 1995). Ces halocarbones volatils sont induits par une augmentation de pH du milieu et de l'intensité lumineuse chez une algue rouge Eucheuma denticulatum (Mtolera et al., 1996). La production de ces composés est également accrue en présence de peroxyde d'hydrogène (Collén et al., 1994). Cette accumulation est inhibée partiellement par l'azide de sodium, un inhibiteur de peroxydases. Il a été suggéré que cette enzyme est impliquée dans la production de ces halocarbones (Collén et al., 1994). Récemment, il a été mis en évidence l'implication d'une haloperoxydase dans l'absorption de l'iode chez l'algue brune L. digitata (Küpper et al., 1998). Par ailleurs, le stress oxydatif élicite également l'efflux de l'iode chez L. digitata. De plus, il a été montré que les oligoalginates sont capables d'induire un burst oxydatif chez cette algue brune (Küpper et al., 2000). Ces oligosaccharides sont aussi responsables de l'accroissement de l'émission de ces composés halogénés chez cette algue brune (Küpper et al., communication personnelle). Les oligoagars, responsables du burst oxydatif chez l'algue rouge agarophyte Gracilaria conferta, élicitent aussi l'activité haloperoxydase, responsable de la synthèse de ces composés halogénés, chez cette algue rouge (Weinberger et al., 1999). De plus, une application exogène de peroxyde d'hydrogène induit cette activité haloperoxydase chez cette algue rouge (Weinberger et al., 1999). Ces résultats suggèrent que les composés halogénés sont impliqués dans les interactions algue-pathogène ou algue-éliciteur.

Le signal d'A. operculata est capable d'induire une production importante de peroxyde d'hydrogène chez les gamétophytes de *C. crispus*. En outre, cette accumulation est très faible chez les sporophytes. Le but de ce travail est d'étudier l'effet du signal d'A. operculata sur la synthèse de ces composés halogénés chez l'algue rouge *C. crispus*.

Les composés halogénés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) chez les gamétophytes de C. crispus 30, 60 et 180 min après élicitation par le signal d'A. operculata. Les résultats illustrent l'induction des composés halocarbonés volatils chez les gamétophytes de C. crispus en réponse à une élicitation par le signal du pathogène (figure 33). Les composés induits par l'élicitation sont : l'iodométhane $(CH_{3}I),$ l'iodoéthane le dichlorobromométhane $(CH_{3}CH_{2}I),$ (CHBrCl₂), le dibromochlorométhane (CHBr₂Cl) et le bromoforme (CHBr₃). Certains de ces halogènes ne sont pas induits par le signal de l'endophyte chez les gamétophytes de C. crispus. Parmi ceux ci, il y a les fréons, le chloroforme (CHCl₂), le méthyl chloroforme (CH₃CCl₃), le chloroiodométhane (CH₂ClI). La figure 34 montre une comparaison de chromatogrammes obtenus chez les gamétophytes élicités par le signal d'A. operculata (en vert) et ceux non élicités, contrôle (en rouge). Ces résultats suggèrent qu'au moment de la reconnaissance, du signal libéré par l'endophyte, les gamétophytes de *C. crispus* libèrent certains composés halogénés volatils potentiellement toxiques pour le pathogène. Ces composés pourraient ainsi empêcher la survie des spores de cet endophyte à la surface de l'hôte C. crispus.

Les haloperoxydases sont des enzymes impliquées dans la formation de ces composés halogénés volatils (Küpper et al., 1998). L'effet de ce signal sur l'activité haloperoxydase a été également testé chez les gamétophytes de *C. crispus*. En effet, un nouvel isoforme d'haloperoxydase est induit par ce signal 24 heures après élicitation (figure 35). D'autres expériences complémentaires sont nécessaires pour montrer l'implication de ces composés dans l'interaction *C. crispus*-A. operculata. Parmi ces expériences :

1) l'effet des extraits de l'endophyte préalablement élicité par les différents oligocarraghénanes sur la libération de ces composés. A noter que les extraits de l'endophyte préalablement élicité par les oligo- -carraghénanes sont incapables de déclencher un burst oxydatif chez *C. crispus*. En revanche, les extraits de l'endophyte





En rouge : les CHVs produits par le contrôle (gamétophyte non élicité)

En vert : les CHVs produits par le gamétophyte élicité pendant 60 minutes par le signal d'A. operculata.



Figure 35 : Elicitation de l'activité bromoperoxydase par le signal d*'A. operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus*. (1) : contrôle

(2) : 24 heures après élicitation par le signal d'A. operculata.

préalablement élicité par les oligo- -carraghénanes élicitent une production plus importante de peroxyde d'hydrogène chez *C. crispus.*

 2) l'action du signal du pathogène sur la synthèse de ces composés chez la phase sensible à l'endophyte, le sporophyte.

3) L'effet des oligoalginates sur la production des ces composés chez les sporophytes et les gamétophytes de *C. crispus*.

4) l'effet des inhibiteurs du burst oxydatif sur la synthèse de ces composés chez les gamétophytes et les sporophytes de *C. crispus*.

II) "Mycosporine-like amino acids"

Les "mycosporine-like amino acids" (MAAs) sont des métabolites secondaires découverts pour la première fois chez les champignons (Trione et al., 1966). Depuis, ces composés ont été mis en évidence chez plusieurs organismes marins : les macroalgues (Tsujino et al., 1980; Sivalingam et al., 1976; Karsten et al., 1998), le phytoplancton (Carreto et al., 1990), les invertébrés (Dunlap et Chalker, 1986 ; Shick et al., 1991 ; 1995 ; Adams et Shick, 1996) et les poissons (Dunlap et al., 1989). La voie de biosynthèse de l'acide shikimique est impliquée dans la synthèse de ces métabolites (Favre-Bonvin et al., 1987). Les MAAs sont des composés qui absorbent dans l'UV entre 310 et 360 nm, avec un maximum d'absorption à 320 nm. Le rôle physiologique de ces composés n'est pas encore bien connu. Cependant, certains auteurs suggèrent leur implication dans la protection contre les dommages causés par la lumière ultraviolette (Karentz et al., 1991 ; Dionsio-Sese et al., 1997 ; Carefoot et al., 1998). Ces composés sont induits par la lumière normale et ultraviolette chez C. crispus (Karsten et al., 1998; Franklin et al., 1999). Des travaux de Dunlap et Yamamoto (1995) ont montré que ces composés, notamment la mycosporine glycine et l'usijirène, sont fortement élicités par le stress oxydatif. Ils ont suggéré que ces métabolites ont des activités antioxydantes.

Comme signalé précédemment, l'éliciteur d'A. operculata induit un burst oxydatif chez les gamétophytes tandis qu'il n'a pas d'effet sur les sporophytes de *C. crispus*. De même les oligoalginates sont capables d'éliciter un burst oxydatif chez les gamétophytes et les sporophytes de *C. crispus*. J'ai entrepris l'étude de l'effet de ces éliciteurs, via le burst oxydatif, sur la synthèse de ces métabolites secondaires chez *C. crispus*.



Longueur d'onde (nm)

Figure 36 : Effet du signal d'*A. operculata* sur la synthèse des MAAs chez *C. crispus.*

En bleu : contrôles

En rouge : 24 heures après élicitation par le signal d'*A. operculata* (A, B) : gamétophytes (B, traitement du gamétophyte par 50 μ M de glyphosate avant élicitation par le signal d'*A. operculata*) (C) : sporophytes.

Résultats et Discussion

La figure 36A montre que le signal du pathogène élicite également la production de ces métabolites, avec un maximum d'absorption à 320 nm, chez les gamétophytes de *C. crispus.* En outre, ce signal n'a pas d'effet sur l'accumulation de ces métabolites chez les sporophytes (figure 36B). La synthèse de ces composés induite par le signal d'A. operculata est inhibée par le glyphosate, l'inhibiteur de la voie de biosynthèse de l'acide shikimique, chez les gamétophytes de C. crispus (figure 36C). Ce résultat montre que la production de ces métabolites constitue une conséquence de l'activation de la voie de biosynthèse de l'acide shikimique chez les gamétophytes de C. crispus par le signal d'A. operculata. Par ailleurs, les oligoalginates élicitent la synthèse de ces composés, 4 jours après traitement, chez les gamétophytes et les sporophytes de C. crispus (figure 37). Ces résultats suggèrent que ces métabolites secondaires sont induits en réponse à l'élicitation par les oligoalginates et le signal d'A. operculata. Une étude de différentes MAAs induites par ces éliciteurs chez l'algue rouge C. crispus est en cours en collaboration avec le laboratoire dirigé par le Dr. Shick (USA). Ces métabolites représentent des marqueurs de l'activation du métabolisme secondaire mais ils sont moins spécifiques que les composés autofluorescents car les MAAs sont induites par tous les types de stress lumineux (Karsten et al., 1998; Franklin et al., 1999). D'autre part leur localisation dans la cellule, ainsi que leurs fonctions potentielles restent encore indéterminées.





En bleu : contrôles

En rouge : 4 jours après élicitation par 150 $\mu\text{g/ml}$ d'oligoalginates

- (A) : gamétophytes
- (B) : sporophytes.
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A- Du point de vue de l'hôte

Un des résultats majeurs de mon travail de thèse a été de montrer que l'algue rouge C. crispus est aussi capable de reconnaître les éliciteurs oligosaccharidiques. Le gamétophyte, la phase résistante à l'endophyte A. operculata, reconnaît l'oligosaccharide libéré par le pathogène au moment de l'infection, ainsi que des oligoalginates. Le sporophyte, la phase sensible au pathogène, ne réagit pas à la présence du signal d'A. operculata tandis qu'il reconnaît un autre oligosaccharide, les oligoalginates. Contrairement à Gracilaria conferta, une agarophyte qui réagit aux oligoagars provenant de sa paroi cellulaire, C. crispus ne reconnaît pas des oligocarraghénanes provenant de ses parois cellulaires. La figure 38 illustre un modèle des différents événements de signalisation élicités par le signal d'A. operculata chez C. crispus. Chez cette algue rouge, la reconnaissance de l'éliciteur libéré par A. operculata se traduit par une induction des activités phospholipases (A2 et C), des flux ioniques et des protéines kinases. Ces trois composantes élicitent l'activation de la NADPH oxydase qui serait le seul complexe enzymatique responsable du burst oxydatif chez C. crispus. Le peroxyde d'hydrogène produit, induit la formation des composés halogénés via l'haloperoxydase qui pourrait être impliquée dans les phénomènes de pontage de la paroi de l'hôte. Ce burst oxydatif pourrait être également responsable de la péroxydation des lipides. Cependant, une phospholipase A2 pourrait libérer un acide gras, l'acide arachidonique. Ce dernier serait dégradé par la lipoxygénase, induite par l'éliciteur, pour donner un équivalent de l'acide jasmonique chez les plantes terrestres. Cet eicosanoïde agirait sur la voie de biosynthèse des composés phénoliques et permettrait également l'induction d'autres réponses de défense. Les résultats obtenus suggèrent la présence de certaines kinases en amont du burst oxydatif et d'autres en aval ou indépendantes de ce burst oxydatif chez C. crispus. Ces MAP kinases sont indispensables pour la mise en place de ces réactions de défense. Ces observations suggèrent la présence d'une autre voie de signalisation qui serait indépendante du burst oxydatif chez C. crispus. D'autre part, une autre voie de signalisation qui ferait appel à un analogue de l'acide salicylique serait à rechercher. Ces voies de signalisation pourraient aussi interagir entre elles pour conférer à la plante marine une meilleure protection contre son agresseur. Ainsi tous ces résultats suggèrent que les événements de signalisation décrits chez les plantes terrestres sont conservés



Figure 38 : Les événements de signalisation induits par le signal *d'A. operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus.* AS : acide salicylique ; CHVs : composés halogénés volatils ; HPO : haloperoxydase ; MAP : mitogen activated protein ; LOX : lipoxygénase ; PLA₂ : phospholipase A2 ; PLC : phospholipase C. chez les algues rouges. Cependant certaines réponses de défense, qui jusqu'à maintenant ne sont pas encore décrites chez les plantes supérieures, sont élicitées par ces éliciteurs chez les algues marines. Parmi ces réponses, l'induction des composés halogénés volatils et la synthèse des "mycosporine-like amino acids". Plusieurs études supplémentaires sont nécessaires pour affiner et compléter ce modèle. Notamment, au niveau de la reconnaissance du signal d'A. operculata: une étude des récepteurs qui seraient responsables de cette reconnaissance chez les gamétophytes est indispensable. Il serait également intéressant de savoir si ces récepteurs existent chez la phase sensible à l'endophyte, les sporophytes. L'étude de la répartition temporelle des événements de signalisation qui précèdent le burst oxydatif est également indispensable. De plus, une caractérisation moléculaire d'enzymes liées à ce métabolisme oxydatif est importante pour étudier leur régulation par ces éliciteurs. Les espèces activées de l'oxygène sont en même temps toxiques pour la plante. Chez les plantes supérieures plusieurs enzymes de détoxication ainsi que leurs gènes correspondants ont été mis en évidence. Une recherche de ces enzymes de protection est essentielle pour comprendre comment *C*. crispus peut produire ces enzymes de détoxication des formes activées de l'oxygène alors que ces dernières sont indispensables pour induire des mécanismes de défense. De même la recherche des MAP kinases impliquées dans l'interaction C. crispus-A. operculata est primordiale pour comprendre ces phénomènes de signalisation et de mise en place des réactions de défense chez C. crispus. La voie de l'acide shikimique et celle des phénylpropanoïdes semblent impliquées dans les réactions de défense chez C. crispus. Une étude des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de ces métabolites est indispensable. De même, la recherche des gènes liés à la défense chez C. crispus est essentielle pour comprendre la régulation de leur expression par ces éliciteurs et le burst oxydatif. D'autres réponses de défense décrites chez les plantes terrestres comme la synthèse de phytoalexines, de flavonoïdes ou d'inhibiteurs de protéases sont à rechercher. D'autres part, il semblerait que ces oligosaccharides soient incapables d'induire une résistance systémique acquise chez C. crispus. Il serait donc intéressant de savoir si d'autres groupes d'algues sont capables de mettre en place une résistance systémique acquise. Les éliciteurs oligosaccharidiques pourraient également constituer une stratégie préventive de protection de culture d'algues contre différentes pathologies.

B- Du point de vue du pathogène

Les oligocarraghénanes de la paroi de l'hôte *C. crispus* sont reconnus par le pathogène endophyte *A. operculata.* Cette reconnaissance se traduit par une induction ou une inhibition de la virulence de ce pathogène. Une étude des récepteurs qui seraient responsables de cette reconnaissance ainsi que les événements de signalisation, s'ils existent, est essentielle pour comprendre les différents événements nécessaires pour induire ou inhiber la virulence chez cette plante verte. L'activité biologique des éliciteurs oligosaccharidiques dépend de la configuration des extrémités réductrices, de la longueur des chaînes et de leur conformation. Il apparaît donc nécessaire de bien établir les bases structurales de la reconnaissance des oligocarraghénanes par des récepteurs du pathogène *A. operculata.* Certaines protéines sont induites par les oligocarraghénanes les plus sulfatés (P70, P40 et P38). Ces protéines pourraient être responsables de la virulence de ce pathogène. Il est donc indispensable de les microséquencer afin de chercher les gènes correspondants.

Par ailleurs, la caractérisation préliminaire des signaux impliqués dans la reconnaissance du pathogène par l'hôte indique qu'il s'agit d'une petite molécule, de nature saccharidique riche en acide glucuronique. Ce signal n'est pas reconnu par les sporophytes, indiquant que la génération diploïde de l'algue ne possède pas de récepteurs fonctionnels permettant leur reconnaissance. De plus, ce signal n'est pas présent dans les extraits acellulaires d'A. *operculata* préalablement élicité par les oligo- - carraghénanes. La perception des composés matriciels de la génération sensible de l'hôte induit donc chez le pathogène des modifications de surface, qui aboutissent à sa non-reconnaissance, et à la mise en place des composés permettant de combattre d'éventuelles réactions de défense. il est donc indispensable de terminer la purification de ce signal oligosaccharidique provenant du pathogène A. *operculata*. De même, une comparaison de la structure des signaux oligosaccharidiques provenant de l'endophyte après élicitation par les différents oligocarraghénanes est essentielle pour déterminer les bases de l'évitement.

Conclusion et Perspectives

Enfin	ce travail	montre que les	s oligosaccha	rides modulent un d	lialogue hôte-
pathogène	dans	l'interaction	Chondrus	crispus-Acrochaete	operculata.

MATERIEL ET METHODES

A- Matériel végétal

Les différents isolats du pathogène Acrochaete operculata ainsi que les cultures unialgales de sporophytes (JC 001PC-S) et de gamétophytes (JC 002PC-G) de Chondrus crispus proviennent du laboratoire du professeur Juan Correa (Santiago) et sont cultivés dans un milieu de culture SFC (composition en annexe) selon Correa et al (1988). Les cultures sont maintenues à 15°C avec une photopériode de 16 / 8 (Jour / Nuit) et un flux lumineux de 40 µmol m⁻² s⁻¹. Le milieu de culture est renouvelé chaque semaine.

B- Préparation et analyse des éliciteurs oligosaccharidiques

I) Préparation des oligocarraghénanes.

Des oligomères de kappa- (SBI), iota (SBI) et lambda- carraghénane (SBI) ont été produits au laboratoire par hydrolyse enzymatique en utilisant respectivement une recombinante de la bactérie marine Pseudoalteromonas kappa-carraghénase carrageenovora (Michel et al., 1999), une iota-carraghénase native de la bactérie Zobellia galactonovora (Potin et al., 1991) et la lambda-carraghénase de Pseudoalteromonas carrageenovora (Johnston et McCandless, 1973). Une hydrolyse à complétion d'une solution de carraghénane à 5 g l⁻¹ a été réalisée en l'incubant durant 24 h-48h à 30°C en présence d'enzyme à 0.2U ml⁻¹ (Potin et al., 1991). Les oligosaccharides produits sont majoritairement des tétrasaccharides et des hexasaccharides, mais leur distribution s'échelonne jusqu'aux dodécasaccharides. Ces hydrolysats ont été analysés par résonance magnétique nucléaire (RMN) du carbone 13 et du proton dans l'Unité INRA-URPOI à Nantes.

II) Extraits acellulaires d'Acrochaete operculata.

Une quantité de 1.5 g des différents échantillons du pathogène élicité ou non par les oligocarraghénanes est réduite en poudre dans l'azote liquide et reprise dans 1 ml de tampon d'extraction 0.5 M de Tris HCl pH 6.5, 50 mM de NaCl et 10 mM de MgCl₂. Cette extraction peut se faire à froid ou à chaud à 100°C pendant 15 min. Après centrifugation à 12 000 g pendant 30 min, le surnageant est récupéré puis utilisé pour les expériences d'élicitations.

III) Analyse des oligosaccharides provenant d'Acrochaete operculata

Les oligosaccharides libérés par le pathogène *A. operculata* sont analysés par chromatographie d'échanges d'anions de haute performance et détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD). Ce système est équipé d'une boucle d'injection de 50 μ l, d'une colonne de garde (4 x 50 mm), d'une colonne CarboPac PA100 (4 x 250 mm) et d'un détecteur électrochimique avec une électrode en or soumis aux potentiels suivants : E1 = 0.05 V, 400 ms; E2 = 0.75 V, 200 ms; E3 = -0.15 V, 400 ms. L'élution est effectuée à 1 ml/min avec un gradient isocratique de 70 % de NaOH 150 mM (éluant A) et 30 % de NaOH 150 mM, NaOAc 500 mM (éluant B) pendant 5 min puis un gradient linéaire jusqu'à 60 % de B pendant 11 min puis jusqu'à 100 % de B en 4 min.

Les monosaccharides issus de la dégradation des oligosaccharides du pathogène par l'acide trifluoroacétique sont aussi analysés par chromatographie HPAEC-PAD. Les standards et les échantillons à tester sont injectés sur la colonne CarboPac PA100. L'élution est effectuée sans gradient avec 100 % de NaOH 15 mM dans les mêmes conditions de détection.

Les acides uroniques contenus dans la chaine oligosaccharidique du pathogène sont dosés qualitativement par chromatographie HPAEC-PAD. L'élution est effectuée à 1 ml/min avec un gradient isocratique de 90 % de NaOH 65 mM (éluant A) et 10 % de NaOH 65 mM et d'acétate 0.96 M (éluant B) pendant 15 min. De même, ces acides uroniques sont dosés quantitativement en utilisant la méthode de Blumenkrantz (1973) : 400 μ l d'échantillon à doser sont versés dans un tube contenant 2.4 ml de solution A (tétraborate de sodium 0.0125 M dans H₂SO₄ concentré). Après refroidissement des tubes dans de la glace pilée et agitation au vortex, ils sont chauffés au bain-marie à 100°C pendant 5 min et refroidis dans la glace. Ensuite, 40 μ l de solution B (métahydroxydiphényl 0.15 % dans du NaOH 0.5 %) sont ajoutés au mélange. Après agitation au vortex et 5 min d'incubation à température ambiante, nous réalisons une mesure de densité optique à 520 nm. En utilisant une solution connue d'acide

mannuronique lactone, une gamme étalon est réalisée pour permettre de déduire les concentrations en acide uroniques dans les différents échantillons du pathogène *A. operculata*.

IV) Préparation des oligoalginates.

Des oligomères d'alginate de sodium de *Laminaria hyperborea* (DANISCO Ingrédients, Landerneau, France) ont été produits au laboratoire par hydrolyse enzymatique en utilisant une mannuronate lyase de l'ormeau *Haliotis tuberculata* (Boyen et al, 1990a, Heyraud et al., 1996). Une hydrolyse à complétion d'une solution d'alginate à 5 g l⁻¹ a été réalisée en incubant durant 24 h-48h à 30°C en présence d'enzyme à 0.2 U ml⁻¹ (Heyraud et al. 1996). La distribution des oligosaccharides produits s'échelonne du trisaccharide au nonasaccharide. Ces hydrolysats ont été analysés par résonance magnétique nucléaire (RMN) du carbone 13 et du proton (Heyraud et al, 1996).

C- Elicitation du pathogène et de l'hôte

Les oligo- , et -carraghénanes variant en taille du tétrasaccharide au dodécasaccharide, en quantité de 150 μ g / ml, sont mis séparément dans 3 ml de milieu SFC avec 300 mg, en poids frais, d'*A. operculata.* Ces expériences d'élicitations sont faites à des temps variables et sont destinées à l'étude de l'activité carraghénolytique, des protéines néosynthétisées chez le pathogène ainsi qu'à la préparation des extraits acellulaires de l'endophyte *A. operculata.*

Les gamétophytes et les sporophytes de *C. crispus* (500 mg de poids frais) sont mis dans 10 ml d'eau de mer filtrée en présence de 300 µl d'extrait acellulaire du pathogène ou différentes concentration d'oligoalginates. Ces expériences d'élicitations sont destinées à l'étude du burst oxydatif, de l'activité bromoperoxydase et shikimate déshydrogénase ainsi qu'à la résistance induite par ces éliciteurs chez l'hôte *C. crispus*.

D-Expériences d'inoculations

Des fragments des extrémités d'environ 1 cm des thalles des gamétophytes et des sporophytes de *C. crispus* sont préparés et cultivés dans le milieu SFC (annexe). Ces fragments sont ensuite infectés par des zoospores issues du pathogène élicités par les différents oligocarraghénanes. Le milieu de culture des fragments infectés est changé tous les 3 jours. Trois semaines après infection, ces fragments sont nettoyés et un comptage du nombre de tâches vertes, correspondant à l'endophyte, est réalisé par microscope optique sur la surface de ces thalles.

L'effet des oligoalginates et des inhibiteurs des événements de signalisation et de réponses de défense sur l'infection chez les sporophytes et les gamétophytes de *C. crispus* a été également testé. Après traitement des fragments de thalles des gamétophytes et des sporophytes de *C. crispus* par des oligoalginates ou des inhibiteurs des événements de signalisation et de réponses de défense, ils sont ensuite rincés et infectés par le pathogène comme décrit ci dessus.

E- Mesure des espèces activées de l'oxygène

La cinétique de l'émission du peroxyde d'hydrogène induite par les oligocarraghénanes chez le pathogène *A. operculata* (300 mg de poids frais dans 10 ml d'eau de mer filtrée) a été réalisée en utilisant un luminomètre (Berthold, Lumat LB 9507, EG&G Berthold, Evry, France). Cet appareil est doté de deux injecteurs reliés à des solutions de réactifs. Ces dernières utilisées dans ces expériences sont le luminol (50 μ l à 0.3 mM par injection) et la peroxydase de raifort hrp (100 μ l à 20 unités par ml dans 10 mM de tampon phosphate à pH 7.8 par injection). En présence de peroxydase et du peroxyde d'hydrogène, le luminol est oxydé et émet de la luminescence mesurée par cet appareil. La luminescence émise dans les aliquots de 400 μ l de milieu de culture du pathogène élicité par les oligocarraghénanes a été mesurée par ce luminomètre. Une gamme étalon en utilisant des concentrations connues de peroxyde d'hydrogène a été également réalisée. Ceci permet de déduire la concentration de peroxyde d'hydrogène produit par le pathogène en présence des différents oligocarraghénanes.

La cinétique de la production du peroxyde d'hydrogène induite par les extraits d'A. operculata élicité par les différents oligocarraghénanes et les oligoalginates chez les gamétophytes et les sporophytes de *C. crispus* (500 mg de poids frais dans 10 ml d'eau de mer filtrée) a été réalisée comme décrit ci dessus.

F- Méthodes biochimiques

I) Extraction des protéines néosynthétisées chez A. operculata

A la fin de chaque expérience d'élicitation du pathogène (16 heures ; 2 ; 4 ; 6 et 8 jours), une concentration de 5 mégaBecquerel / ml de soufre 35 (Pro-mix L-35S cell labelling ; AMERSHAM / référence SJQ-0079 ou DUPONT NEN / référence NEG-072 ; 70% de méthionine et 30% de cystéine) est ajoutée pour marquer toutes les protéines néosynthétisées. Au bout de 16 heures de marquage, l'échantillon est rincé 2 fois avec le milieu SFC avant d'en extraire les protéines.

Les protéines sont extraites au phénol selon la méthode décrite par Schuster et Davies (1983). Cette méthode s'est avérée également efficace pour l'extraction des protéines de la plante hôte *C. crispus*. Les différents échantillons sont réduits en poudre dans l'azote liquide et repris dans 500 µl de tampon d'extraction : 0,7 M de saccharose; 0.5 M de Tris HCl pH 8 ; 50 mM de EDTA ; 0.1 M de KCl ; 2 mM de PMSF (fluorure de phénylméthyl-sulfonyl) et 2% de -mercaptoéthanol. L'ensemble est maintenu à 0°C pendant 10 minutes avant d'ajouter 500 µl de phénol. Après une heure d'incubation à température ambiante, l'échantillon est centrifugé à 12000 g pendant 5 minutes. La fraction phénolique est rincée, 3 fois, à l'aide de 500 µl de tampon d'extraction. Les protéines solubles dans le phénol sont précipitées, pendant une nuit, à -20°C en ajoutant 500 µl d'acétate d'ammonium 0.1 M (pris dans le méthanol) pour 200 µl de fraction phénolique. Après centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes, le culot est rincé deux fois avec 400 µl de méthanol puis avec 200 µl d'acétone. Le précipité est solubilisé dans le tampon d'O'Farrell pour l'isoélectrofocalisation (Hilbert et al., 1991).

La quantité de radioactivité incorporée est mesurée, par un compteur à scintillation (TRI-CARB 1500), à partir de 2 µl de protéines marquées par le soufre 35. Une extraction des protéines marquées, en utilisant la méthode de Laemmli (1970), a également été réalisée : après broyage et solubilisation dans du tampon de Laemmli, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 10 minutes. Les protéines du surnageant sont récupérées et la quantité de radioactivité est mesurée dans 2 μl.

II) Electrophorèse bidimensionnelle

Les électrophorèses bidimensionnelles sont réalisées avec des minicuves Bio-Rad (MINI PROTEAN).

a- Isoélectrofocalisation

L'isoélectrofocalisation est réalisée dans des gels de 1 mm de diamètre et 7.5 cm de long dont la concentration est de 4% d'acrylamide, 9.2 M d'urée, 2% de Triton X-100, 2% d'ampholytes Bio-Rad (1.6% à pH 5/7 et 0.4% à pH 3/10). L'hydroxyde de sodium 20 mM sert d'anolyte et l'acide phosphorique 10 mM de catholyte.

Pour avoir la même quantité de radioactivité dans les gels, le volume déposé dépend de la valeur mesurée, pour chaque échantillon, par le compteur à scintillation. Au dessus de chaque dépôt, on ajoute un même volume de tampon: urée 9 M, 1% d'ampholytes (0.8% à pH 5/7 et 0.2% à pH 3/10) et du bleu de bromophénol.

La migration se fait à voltage constant de 400 V pendant 5 heures.

b- SDS-PAGE

La seconde dimension est réalisée sur des gels en plaque (0.75 mm x 13.5 cm x 7.5 cm). Elle ne comporte pas de gel de concentration. Le gel de séparation est à une concentration d'acrylamide de 12%. Sans équilibration, les gels de la première dimension sont déposés sur les gels de la deuxième dimension. La migration est effectuée à un voltage constant de 100 V dans une cuve remplie de tampon de migration : Tris 0.025 M, glycérol 0.192 M et 0.1% de SDS.

Les gels radioactifs sont ensuite séchés et exposés contre des films autoradiographiques (KODAK, X-OMAT, XAR-5) en utilisant un écran (KODAK, X-Omat cassette). La durée d'exposition est de 2 jours. Le développement des films se fait en trois étapes successives : révélation, rinçage et fixation.

III) Dosage des protéines

Les protéines contenues dans les extraits acellulaires d'A. operculata ainsi que dans ceux de gamétophytes et de sporophytes de *C*. crispus sont dosées par la méthode de Bradford (1976).

Les échantillons sont solubilisés dans un tampon MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, pefablock 1 mM, Tris HCl 50 mM à pH 7.5 et centrifugés 10 minutes à 12000g.

Le réactif de dosage est un produit commercial (Bio-Rad protein assay). C'est une forme anionique de bleu de coomassie qui se fixe préférentiellement aux protéines par interaction avec leurs groupements cationiques.

A 800 μl d'extrait dilué, contenant entre 1 et 10 μg de protéines, sont additionnés 200 μl de réactif Bio-Rad et la densité optique est mesurée à 595 nm. L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une gamme étalon effectuée avec de la sérum albumine de boeuf.

VI) Recherche d'activités enzymatiques

a- Activité carraghénolytique élicitée chez A. operculata

1) Extraction des carraghénanes marqués au soufre 35 à partir de

C. crispus

Les gamétophytes et les sporophytes de *C. crispus* (5 g de poids frais) sont mis séparément dans 100 ml d'eau de mer artificielle dépourvue de sulfates (450 mM de NaCl ; 10 mM de KCl ; 46 mM de MgCl₂ et 2 mM de NaHCO₃). Les nitrates, les phosphates, les métaux et les vitamines sont additionnés avec un volume de 2 ml/l chacun (Annexe). Avant incubation, pendant 4 jours, on ajoute 80 mégaBecquerel/l de sulfate de sodium radioactif (S-35 as Sodium Sulfate Carrier free; DUPONT NEN / référence NEX-041H). Les échantillons sont ensuite broyés à l'azote liquide et repris dans un volume de NaCl 50 mM (15 ml/g de poids frais) pendant 2 heures à 90°C. Après centrifugation à 1 600 g (15 minutes), les carraghénanes du culot sont précipités par 3 volumes d'éthanol. Ils sont ensuite rincés avec de l'éthanol 75% et solubilisés dans un tampon de NaCl 50 mM et 10 mM de phosphate de sodium (pH 7.5). Le taux de radioactivité est mesuré dans 2 µl, par compteur à scintillation.

2) Mise en évidence d'une activité carraghénolytique.

Les échantillons, issus des expériences d'élicitations, du pathogène par les oligocarraghénanes, sans marquage radioactif, sont broyés et solubilisés dans un tampon Tris HCl 50 mM à pH 7.5 contenant 5 mM de MgCl₂ et 0.1 mM de PMSF (PhénylMéthylSulfoxide). Ensuite, 30 μ l d'extraits acellulaires obtenus après centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes, sont incubés séparément en présence de 30 μ l des carraghénanes marqués resuspendus à une concentration de 5 mg/ml dans un tampon phosphate de sodium 10 mM contenant 50 mM de NaCl. Après 3 jours d'incubation, 3 volumes d'éthanol sont ajoutés et le mélange est centrifugé à 12 000 g pendant 10 min. Les éventuels produits de dégradation sont contenus dans le surnageant éthanolique. La radioactivité contenue dans ce surnageant éthanolique est mesurée par compteur à scintillation. Un contrôle sans extrait acellulaire est également effectué.

b- Recherche d'activité peroxydase élicitée par les oligocarraghénanes chez A. operculata

L'activité de la peroxydase a été réalisée sur gel natif (Laemmli, 1970) en utilisant un substrat spécifique le 3-amino-9-éthylcarbazole (Manchenko, 1994). 40 μ g de protéines totales, issu du pathogène élicité séparément par les oligo- et carraghénanes pendant 8 jours et du contrôle (le pathogène non élicité), sont utilisées pour mettre en évidence cette activité. Après migration, les gels sont rincés avec de l'eau distillée et sont mis dans un tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5 contenant 500 μ g/ml de 3-amino-9-éthylcarbazole (solubilisé dans une goutte d'acétone) et 1 mM de peroxyde d'hydrogène. Les gels sont ainsi incubés dans cette solution à l'obscurité jusqu'à ce que des bandes rouges correspondant à l'activité de l'enzyme apparaissent. Les gels sont ensuite rincés et fixés dans 50 % glycérol. c- Mesure d'activité shikimate déshydrogénase induite par le signal d'A. operculata et les oligoalginates respectivement chez les gamétophytes et les sporophytes de C. crispus

L'activité shikimate déshydrogénase a été mise en évidence sur un gel natif (Laemmli, 1970) en utilisant de l'acide shikimique comme substrat (Manchenko, 1994). Les gamétophytes et les sporophytes (500 mg de poids frais dans 10 ml d'eau de mer filtrée) élicités respectivement par les extraits d'A. operculata et les oligoaginates sont broyés à l'azote liquide et sont resuspendus dans un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 9.5 contenent 500 mM de KCl et 10 mM de -mercaptoéthanol. Après centrifugation à 12 000 g pendant 10 min, les protéines contenues dans le surnageant sont dosées. 30 µg de protéines totales issues de ces échantillons ainsi que de leurs contrôles correspondants (les gamétophytes et les sporophytes non élicités) sont déposés sur un gel non dénaturant de 20 % d'acrylamide. Après migration à 80 my, les gels sont rincés dans de l'eau distillée et sont trempés dans un tampon Tris HCl 0.1 M à pH 7.1 contenant de l'acide shikimique (840 µg/ml), du NADP (170 µg/ml) et du MTT (200 µg/ml) pendant 30 min à l'obscurité et à 37°C. En suite, le PMS (40 µg/ml) est ajouté au mélange. Les gels sont ainsi incubés dans cette solution jusqu'à ce que des bandes bleu- foncé correspondant à l'activité de l'enzyme apparaissent. Les gels sont ensuite rincés et fixés dans 50 % d'éthanol. L'effet du glyphosate sur cette activité shikimate déshydrogénase induite par les extraits d'A. operculata chez les gamétophytes et par les oligoalginates chez les sporophytes de C. crispus a été également testé. Les thalles de gamétophytes et de sporophytes sont traités par 50 mM de glyphosate pendant 6 heures et sont ensuite élicités par les extraits du pathogène et les oligoalginates.

d- Mesure d'activité bromoperoxydase induite par le signal d'A. operculata chez les gamétophytes de *C. crispus*

L'activité bromoperoxydase a été mise en évidence sur un gel natif (Laemmli, 1970) en utilisant de l'o-dianisidine comme substrat (Manchenko, 1994). 30 μ g de protéines, de gamétophytes élicité par les extraits du pathogène et du contrôle (gamétophytes non élicités), sont extraits et déposés sur un gel natif de 12 % de la même manière que l'activité shikimate déshydrogénase. Après migration, les gels sont mis dans une solution d'o-dianisidine 1 mM, 100 mM de tampon phosphate de potassium et 100 mM de bromure de potassium pendant 30 min. Les gels sont ensuite rincés et mis dans une solution de peroxyde d'hydrogène (1 mM) jusqu'à ce que des bandes rouges correspondant à l'activité de l'enzyme apparaissent. Les gels sont ensuite rincés et fixés dans 50 % de glycérol.

V) Analyse des composés halogénés volatils

L'analyse des composés halogénés volatils libérés par les gamétophytes de *C. crispus* élicités ou non par le signal d'A. *operculata* (5 g de poids frais dans 100 ml d'eau de mer filtrée) a été réalisée en utilisant la méthode de Pruvost et al. (1999). Les prélèvements ont été fait 30, 60 et 180 minutes après élicitation, à l'aide d'un préleveur destiné à l'échantillonnage d'eau en vue de l'analyse des composés volatils dissous. Ce préleveur est constitué d'une ampoule en verre de 30 ml surmontée à chacune de ses extrémités par des robinets 3 voies en PTFE (plastique). L'eau est pompée sous vide par l'intermédiaire d'un tube relié à une bouteille en verre contenant les algues jusqu'au préleveur préalablement rempli d'azote ultrapure. L'ampoule est rincée par écoulement de l'eau avec 3 fois son équivalent en volume. L'échantillon est isolé par fermeture des robinets et il peut être stocké durant plusieurs jours dans une glacière remplie d'eau de mer jusqu'à l'analyse au laboratoire. C'est un prélèvement qui évite les contacts de l'échantillon avec l'atmosphère.

La méthode d'extraction liquide-gaz couplée à une séparation par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire et à une détection par capture d'électrons (ECD) a été utilisée pour l'analyse des composés halogénés volatils. Le système analytique permet le dosage des composés chlorés (CH₂Cl₂, CHCl₃, CH₃CCl₃,

CCl₄, CHCl=CCl₂, CCl₂=CCl₂), bromés (CH₂Br₂, CHBrCl₂, CHBr₂Cl, CHBr₃) et iodés (CH₃I, CH₃CH₂I, CH₂CII, CH₂I₂). L'eau de mer est transférée du préleveur au dégazeur par de l'azote ultrapure, puis les composés volatils en sont extraits par dégazage à l'azote pendant 20 min avec un débit de 90 ml/min. Les composés volatils sont piégés dans un tube vide de 50 cm de long qui est immergé dans un bain acétone-azote liquide. Après la pré-concentration, les composés volatils sont désorbés thermiquement, en plongeant le micropiège dans de l'eau bouillante, et injectés pendant 30 secondes sur la colonne capillaire. Les rendements d'extraction sont quantitatifs pour tous les composés à l'exception du CHBr₃ et du CH₂I₂. La séparation est réalisée par un chromatographe en phase gazeuse Chrompack CP 9000 équipé d'une "fused silica megabore DB-624 column". La durée de la séparation est de 23 min. La détection est assurée par un ECD : détecteur spécifique des composés halogénés et électrophiles. Le signal est acquis et le chromatographe est intégré à l'aide du logiciel Maestro (Chrompack). L'étalonnage est effectué en injectant, à l'aide de microseringues, de standards dilués dans le méthanol dans un préleveur rempli d'eau de mer préalablement dégazée. L'étalon est ensuite analysé de la même manière que les échantillons.

Les limites de détection sont comprises entre 0.003 et 0.09 ng l^{-1} pour tous les composés à l'exception du CHBr₃ (0.17 ng. l^{-1}) (Pruvost et al., 1999).

VI) Analyse des "mycosporines-like amino acids"

Les "mycosporine-like amino acids" de *C. crispus* sont extraites par une solution aqueuse de méthanol (Karsten et al., 1998). 20 mg de thalles des gamétophytes et sporophytes élicités respectivement par des extraits d'*A. operculata* et des oligoalginates, ainsi que de leurs contrôles correspondant (gamétophytes et sporophytes non élicités) sont broyés et suspendus dans 3 ml de solution aqueuse de méthanol (80 %). Le mélange est mis en agitation à 4°C et à l'obscurité pendant 1 heure. Après centrifugation, à 15 000 g pendant 30 min, et récupération du surnageant méthanolique, le culot est resuspendu dans le même volume de solution aqueuse de méthanol. L'extraction est refaite 3 fois sur le même échantillon de départ afin d'y extraire le maximum de MAAs contenus dans le surnageant méthanolique. Ensuite les 3 volumes

de surnageant méthanolique sont regroupés et des spectres d'absorption sont réalisés à partir de ces extraits.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abad LR, D'Urzo MP, Liu D, Narasimhan ML, Reuveni M, Zhu JK, Niu X, Singh NK, Hasegawa PM & Bressan RA (1996). Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. Plant Sci. 118, 11-23.

Abrahamsson K, Ekdahl A, Collén J & Pedersén M (1995). Marine algae; a source of trichloroethylene and perchloroethylene. Limnol. Oceanogr. 40, 1321-1326.

Adam AL, Pike S, Hoyos ME, Stone JM, Walker JC & Novacky A (1997). Rapid and transient activation of a myelin basic protein kinase in tobacco leaves treated with harpin from *Erwinia amylovora*. Plant Physiol. *115*, 853-861.

Adams NL & Shick JM (1996). Mycosporine-like amino acids provide protection against ultraviolet radiation in eggs of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. Photochem. Photobiol. 64, 149-158.

Alvarez ME, Pennell RI, Meijer P, Ishikawa A, Dixon RA & Lamb C (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell 92, 773-784.

Amara A, Lorthioir O, Valenzuela A, Magerus A, Thelen M, Montes M, Virelizier J-L, Delepierre M, Baleux F, Lortat-Jacob H & Arenzana-Seisdedos F (1999). Stromal cell-derived factor-1 associates with heparan sulfates through the first -strand of the chemokine. J. Biol. Chem. 274, 23915-23925.

Amicucci E, Gaschler K & Ward JM (1999). NADPH oxidase genes from tomato (Lycopersicon esculentum) and curly-leaf pondweed (Potamogeton crispus). Plant Biol. 1, 524-528.

Anderson MD, Chen Z & Klessig DF (1998). Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acidmediated induction of PR-1 gene expression. Phytochemistry 47, 555-566.

Arlat M, Gijsegem FV, Huet JC, Pernollet JC & Boucher CA (1994). PopA1, a protein which induces a hypersensitive-like response on specific Petunia genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. EMBO J. 13, 543-553.

Atkinson MM, Midland SL, Sims JJ & Keen NT (1996). Syringolide 1 triggers Ca²⁺ influx, K⁺ efflux, and extracellular alkalization in soybean cells carrying the disease resistance gene *Rpg4*. Plant Physiol. *112*, 297-302.

Ayers AR, Ebel J, Valent B & Albersheim P (1976). Host-pathogen interactions X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Plant Physiol. 57, 760-765.

Baba M, Nakajima M, Schols D, Pauwels R, Balzarini J & De Clercq E (1988). Pentosan polysulfate, a sulfated oligosaccharide, is a potent and selective anti-HIV agent *in vitro*. Antivir. Res. 9, 335-343.

Baillieul F, Fritig B & Kauffmann S (1996). Occurrence among *Phytophthora* species of a glycoprotein eliciting a hypersensitive response in tobacco and its relationships with elicitins. Mol. Plant-Microbe Interact. 9, 214-216.

Baillieul F, Genetet I, Kopp M, Saindrenan P, Fritig B & Kauffmann S (1995). A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defence genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance. Plant J. 8, 551-560.

Baker CJ & Orlandi EW (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 33, 299-321.

Baker CJ, Mock N, Atkinson MM & Hutcheson S (1990). Inhibition of the hypersensitive response in tobacco by pectate lyase digests of cell wall and of polygalacturonic acid. Physiol. Mol. Plant Pathol. *37*, 155-167.

Baker CJ, Orlandi EW & Mock NM (1993). Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. Plant Physiol. *102*, 1341-1344.

Barber MS, Bertram RE & Ride JP (1989). Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. Physiol. Mol. Plant Pathol. 34, 3-12.

Barbeyron T, Gerard A, Potin P, Henrissat B & Kloareg B (1998). The kappa carrageenase of the marine bacterium *Cytophaga drobachiensis*. Stuctural and phylogenetic relationships within family-16 glycoside hydrolases. Mol. Biol. Evol. 15, 528-537.

Barbeyron T, Henrissat B & Kloareg B (1994). The gene encoding the kappa-carrageenase of Alteromonas carrageenovora is related to -1,3-1,4-glucanases. Gene 139, 105-109.

Barbier-Brygoo H, Joyard J, Pugin A & Ranjeva R (1997). Intracellular compartmentation and plant cell signalling. Trends Plant Sci. *2*, 214-222.

Bate NJ, Orr J, Ni W, Meromi A, Nadler-Hassar T, Doerner PW, Dixon RA, Lamb CJ & Elkind Y (1994). Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci USA *91*, 7608-7612.

Beffa R, Szell M, Meuwly P, Pay A, Vögeli-Lange R, Métraux JP, Neuhaus G, Meins F & Nagy F (1995). Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. EMBO J. *14*, 5753-5761.

Beligni MV & Lamattina L (1999). Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. Nitric Oxide 3, 199-208.

Bendahmane A, Kohn BA, Dedi C & Baulcombe DC (1995). The coat protein of potato virus X is a strainspecific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato. Plant J. *8*, 933-941.

Benhamou N & Bélanger RR (1998a). Benzothiadiazole-mediated induced resistance to Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici in tomato. Plant Physiol. 118, 1203-1212.

Benhamou N & Bélanger RR (1998b). Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. Plant J. 14, 13-21.

Benhamou N & Lafontaine PJ (1995). Ultrastructural and cytochemical characterization of elicitorinduced responses in tomato root tissues infected by Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici. Planta 197, 89-102.

Benhamou N & Nicole M (1999). Cell biology of plant immunization against microbial infection: The potential of induced resistance in controlling plant diseases. Plant Physiol. Biochem. 37, 703-719.

Benhamou N & Thiériault G (1992). Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici. Physiol. Mol. Plant Pathol. 41, 33-52.

Benhamou N (1996). Elicitor-induced plant defense pathways. Trends Plant Sci. 1, 233-240.

Benhamou N, Kloepper JW & Tuzun S (1998). Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: Ultrastructure and cytochemistry of the host response. Planta 204, 153-168.

Benhamou N, Lafontaine PJ & Nicole M (1994). Seed treatment with chitosan induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. Phytopathol. 84, 1432-1444.

Bennett M, Gallagher M, Fagg J, Bestwick C, Paul T, Beale M & Mansfield J (1996). The hypersensitive reaction, membrane damage and accumulation of autofluorescent phenolics in lettuce cells challenged by *Bremia lactucae*. Plant J. 9, 851-865.

Bent AF, Innes RW, Ecker JR & Staskawicz BJ (1992). Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. Mol. Plant-Microbe Interact. *5*, 372-378.

Bergey DR & Ryan CA (1999). Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. Plant Mol. Biol. 40, 815-823.

Bergey DR, Howe GA & Ryan CA (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12053-12058.

Bergey DR, Orozco-Cardenas M, De Moura DS & Ryan CA (1999). A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *96*, 1756-1760.

Berna A & Bernier F (1999). Regulation by biotic and abiotic stress of weath germin gene encoding oxalate oxidase, a H_2O_2 -producing enzyme. Plant Mol. Biol. 39, 539-549.

Bestwick CS, Bennett MH & Mansfield JW (1995). Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. Plant Physiol. 108, 503-516.

Bestwick CS, Brown IR, Bennet MHR & Mansfield JW (1997). Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. Plant Cell 9, 209-221.

Bestwick, CS., Brown, IR., and Mansfield, JW. (1998). Localised change in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a non host hypersensitive reaction in lettuce. Plant Physiol. *118*, 1067-1078.

Bhagwat AA, Mithöfer A, Pfeffer PE, Kraus C, Spickers N, Hotchkiss A, Ebel J & Keister DL (1999). Further studies of the role of cyclin beta-glucans in symbiosis. An NdvC mutant of *Bradyrhizobium jasponicum* synthesizes cyclodecakis-(1-->3)-beta-glucosyl. Plant Physiol. 119, 1057-1064.

Bidwell RGS, Mc Lachlan J & Lloyd NDH (1985). Tank cultivation of Irish moss, Chondrus crispus Stack. Bot. Mar. 28, 87-97.

Bischoff M, Rosler J, Raesecke HR, Gorlach J, Amrhein N & Schmid J (1996). Cloning of a cDNA encoding a 3-dehydroquinate synthase from a higher plant, and analysis of the organ-specific and elicitor-induced expression of the corresponding gene. Plant Mol. Biol. *31*, 69-76.

Bishop PD, Pearce G, Bryant JE & Ryan CA (1984). Isolation and characterization of the proteinase inhibitor-inducing factor from tomato leaves. Identity and activity of poly- and oligogalacturonide fragments. J. Biol. Chem. *259*, 13172-13177.

Bloch CB, De Wit PJGM & Kuc J (1984). Elicitation of phytoalexins by arachidonic acid and eicosapentaenoic acids: a host survey. Physiol. Plant Pathol. *25*, 199-208.

Blume B & Grierson D (1997) Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. Plant J. 12, 731-746.

Blumenkrantz N & Asboe-Hansen G (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. Anal. Biochem. *54*, 484-489.

Bohlmann H & Apel K (1991). Thionins. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 227-240.

Bohlmann H, Vignutelli A, Hilpert B, Miersch O, Wasternack C & Apel K (1998). Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene Thi2.1, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. FEBS Lett. 437, 281-286.

Boissy G, de la Fortelle E, Kahn R, Huet JC, Bricogne G, Pernollet JC & Brunie S (1996). Crystal strucure of a fungal elicitor secreted by *Phytophtora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. Structure 4, 1429-1439.

Boller T (1990). Ethylene and plant-pathogen interaction. Curr. Top. Plant Physiol. 5, 873-907.

Boller T, Gehri A, Mauch F & Vögeli U (1983). Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. Planta *157*, 22-31.

Bolwell GP & Wojtaszek P (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence-a broad perspective. Physiol. Mol. Plant Pathol. *51*, 347-366.

Bolwell PG (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. Cur. Opi. Plant Biol. *2*, 287-294.

Bonas U & Van den Ackerveken G (1997). Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases Plant J. *12*, 1-7.

Bostock RM, Kuc JA, Laine RA (1981). Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophtora infestans* elicit fungotoxic sesquiterpenes in the potato. Science 212, 67-69.

Bostock RM, Shaeffer DA & Hammerschmidt R (1986). Comparison of elicitor activities of arachidonic acid, fatty acid and glucans from *Phytophtora infestans* in hypersensitivity expression potato tuber. Physiological Mol. Plant. Phathol. *29*, 349-360.

Bostock RM, Yamamoto H, Choi D, Ricker K & Ward BL (1992). Rapid stimulation of 5-lipoxygenase activity in potato by the fungal elicitor arachidonic acid. Plant Physiol. *100*, 1448-1456.

Boudart G, Dechamp-Guillaume G Lafitte C, Ricart G, Barthe JP, Mazau D & Esquerré-Tugayé M-T (1995). Elicitors and suppressors of hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation are solubilized from plant cell walls by endopolygalacturonase. Eur. J. Biochem. *232*, 449-457.

Boudart G, Lafitte C, Barthe JP, Frasez D, Esquerré-Tugayé M-T (1998). Differential elicitation of defense responses by pectic fragments in bean seedlings. Planta *206*, **86**-94.

Références bibliographiques

Boyen C, Bertheau Y, Barbeyron T & Kloareg B (1990b). Preparation of guluronate lyase from *Pseudomonas alginovora* for protoplast isolation in *Laminaria*. Enzyme Microb. Technol. 12, 885-890.

Boyen C, Kloareg B, Polne-Fuller M & Gibor A (1990a). Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae. Phycologia *29*, 173-181.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principe of protein-dye-binding. Anal. Biochem. *72*, 248-254.

Brady JD & Fry SC (1997). Formation of di-isodityrosine and loss of isodityrosine in the cell walls of tomato cell-suspension cultures treated with fungal elicitors or H_2O_2 . Plant Physiol. 115, 87-92.

Brederode FT, Linthorst HJ & Bol JF (1991). Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. Plant Mol. Biol. *17*, 1117-1125.

Broekaert F & Peumans W (1988). Pectic polysaccharides elicit chitinase accumulation in tobacco. Physiol. Plant. 74, 740-744.

Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MFC, Thevissen K, De Samblanx GW & Osborn RW (1997). Antimicrobial peptides from plants. Crit. Rev. Plant Sci. 16, 297-323.

Brown I, Trethowan J, Kerry M, Mansfield J & Bolwell GP (1998). Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. Plant J. 15, 333-343.

Camp WV, Van Montagu M & Inzé D (1998). H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance.Trends Plant Sci. *3*, 330-333.

Campbell MM & Ellis BE (1992). Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. I. Induction of phenylpropanoid metabolism. Planta 186, 409-417.

Carefoot TH, Harris M, Taylor BE, Donovan D & Karentz D (1998). Mycosporine-like amino acids: possible UV protection in eggs of the sea hare *Aplysia dactylomela*. Mar. Biol. 130, 389-396.

Carmona MJ, Molina A, Fernandez JA, Lopez-Fando JJ & Garcia-Olmedo F (1993). Expression of the alpha-thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. Plant J. 3, 457-462.

Carreto JI, Carignan MO, Daleo D & Demarco SG (1990). Occurrence of mycosporine-like amino acids in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*: UV-photoprotective compounds. J. Plankton Res. *12*, 909-922.

Cervone F, De Lorenzo G, Degra L, Salvi G & Bergami M (1987). Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol. 85, 631-637.

Cervone F, Hahn MG, De Lorenzo G, Darvill A & Albersheim P (1989). Host-Pathogen Interactions XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. Plant Physiol. *90*, 542-548.

Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann H Van Montagu M, Inzé D & Van Camp W (1998). Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *95*, 5818-5823.

Chandra S & Low PS (1995). Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *92*, 4120-4123.

Chandra S & Low PS (1997). Measurement of Ca²⁺ fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. J. Biol. Chem. *272*, **28274**-28280.

Chandra S, Heinstein PF & Low PS (1996a). Activation of phopholipase A by plant defense elicitors. Plant Physiol. *110*, 979-986.

Chandra S, Martin GB & Low PS (1996b). The Pto kinase mediates a signaling pathway leading to the oxidative burst in tomato. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13393-13397.

Chen LCM & Mc Lachlan J (1972). The life history of Chondrus crispus in culture. Can. J. Bot. 50, 1055-1066.

Chen LCM & Taylor ARA (1980). Investigations of distinct strains of *Chondrus crispus* Stackh. II. Culture studies. Bot. Mar. 23, 441-448.

Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sanchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J & Klessig DF (1995). Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *92*, 4134-4137.

Chen Z, Silva H & Klessig DF (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science *262*, 1883-1886.

Choi D, Ward BL & Bostock RM (1992). Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. Plant Cell 4, 1333-1344.

Cohen Y, Gisi U & Niderman T (1993). Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. Phytopathol. *83*, 1054-1062.

Collén J, Ekdahl A, Abrahamsson K & Pedersén M (1994). The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated organic compounds by *Meristiella gelidium*. Phytochem. *36*, 1197-1202.

Conrath U, Chen Z, Ricigliano JR & Klessig DF (1995). Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *92*, 7143-7147.

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

Cook RJ (1998). The molecular mechanisms responsible for resistance in plant-pathogen interactions of the gene-for-gene type fonction more broadly than previously imagined. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 9711-9712.

Correa JA & Mc Lachlan JL (1991). Endophytic algae of Chondrus crispus (Rhodophyta). III. Host specificity. J. Phycol. 27, 448-459.

Correa JA & Mc Lachlan JL (1992). Endophytic algae of *Chondrus crispus* (Rhodophyta). IV. Detrimental effects on the host following infections by *Acrochaete operculata* and *A. heteroclada*. (Chlorophyta). Mar. Ecol. progr. Ser. 81, 73-87.

Correa JA & Mc Lachlan JL (1994). Endophytic algae of *Chondrus crispus* (Rhodophyta). V. Fine stucture of the infection by Acrochaete operculata. Eur. J. Phycol. 29, 33-47.

Correa JA (1994). Infections by pigmented algal endophytes: misuse of concepts and terminology. Revista Chillena de Historia Natural, 67, 4-8.

Correa JA (1996). Algal infectious diseases: interaction levels and the chilean experience. Cur. Tren. Mar. Bot. Res. in the East African Region, 25-38.

Correa JA (1997). Infectious diseases in marine algae: Current knowledge and approaches. Pogr. Phycol. Res. *12*, 140-180.

Correa JA, Nielsen R & Grund DW (1988). Endophytic algae of Chondrus crispus (**Rhodophyta**). II. Acrochaete heteroclada **sp. nov.**, A. operculata **sp. nov.**, and Phaeophila dendroides (**Chlorophyta**). J. **Phycol.**, 24, 528-539.

Correa JA, Nielsen R, Grund DW & McLachlan (1987). Endophytic algae of Irish moss (*Chondrus crispus* stackh.)

Correa JA & Craigie JS (1991). Algal pathology. In: (G. Garcia-Reina and M. Pedersén, eds) Seaweed cellular biotechnology, physiology and intensive cultivation. COST 48, Universidad De Las Palma De Gran Canaria. 67-82.

Côté F & Hahn MG (1994). Oligosaccharins: structures and signal transduction. Plant Mol. Biol. 26, 1375-1411.

Côté F, Ham KS, Hahn MG & Bergmann CW (1998). Oligosaccharides elicitor in host-pathogen interactions. Generation, perception and signal transduction. In Subcellular Biochemistry, Plant-Microbe Interactions, Vol. 29, B. B. Bismas and H. K. Das, eds (New York: Plenum Press), pp. 385-432.

Craigie JS & Correa JA (1996). Etiology of infectious diseases in cultivated *Chondrus crispus*. (Gigartinales, Rhodophyta). Hydrobiol. 326/327, 97-104.

Craigie JS & Shachlock PF (1989). Culture of Irish moss. In cold water aquaculture in Atlantic Canada, ed. Boghen AD, The canadian institute for research on regional development, University of Moncton, Moncton, NB, pp. 243-270.

Craigie JS, Staples LS & Archibald AF (1999). Rapid bioassay of a red algae: accelerated growth rates of *Chondrus crispus*. World Aquaculture 30, 26-28.

Creelman RA & Mullet JE (1997). Biosynthesis and action of jasmonate in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 355-381.

Creelman RA, Tierney ML & Mullet JE (1992). Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *89*, 4938-4941.

Dangl JL (1998). Plants just say NO to pathogens. Nature 394, 525-527.

Dangl JL (1994). The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. Curr. Top Microbiol. Immunol. 192, 99-118.

Darvill AG & Albersheim P (1984). Phytoalexins and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. *35*, 243-275.

Darvill AG, Augur C, Bergmann C, Carlson RW, Cheong J-J, Eberhard S, Hahn MG, Lo VM, Marfa V, Meyer B, Mohnen D, O'Neill Ma, Spiro MG, van Halbeek H, York WS & Albersheim P (1992). Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. Glycobiology *2*, 181-198.

Davis KR & Hahlbrock K (1987). Induction of plant defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. Plant Physiol. *84*, 1286-1290.

Dean RA (1997). Signal pathways and appressorium morphogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 35, 211-234.

Delaney TP, Ukness S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto N, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E & Ryals J (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science 266, 1247-1250.

Delledonne M, Xia Y, Dixon RA & Lamb C (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. Nature 394, 585-588.

Desikan R, Clarke A, Atherfold P, Hancock JT & Neill SJ (1999). Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defence responses in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. Planta 210, 97-103.

Desikan R, Hancock JT, Coffey MJ & Neill SJ (1996). Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. FEBS Lett. 382, 213-217.

Desikan R, Reynolds A, Hancock JT & Neill SJ (1998). Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. Biochem. J. 330, 115-120.

Devoto A, Clark AJ, Nuss L, Cervone F & De Lorenzo G (1997). Developmental and pathogen-induced accumulation of transcrips of polygalacturonase-inhibiting protein in *Phaseolus vulgaris*. Planta 202, 284-292.

De Lorenzo G & Cervone F (1997). Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs): their role in specificity and defense against pathogenic fungi. In Plant-Microbe Interact., G. Stacey and N; T. Keen, eds. (New York: Chapman and Hall), pp. 76-93.

De Wit PJGM (1992). Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. *30*, 391-418.

De Wit PJGM (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. Trends Plant Sci. *2*, 452-458.

De Wit PJGM & Spikman G (1982). Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. Physiol. Plant Pathol. *21*, 1-11.

Dietrich RA, Delaney TP, Uknes SJ, Ward ER, Ryals JA & Dangl JL (1994). Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. Cell 77, 565-577.

Dietrich RA, Richberg MH, Schmidt R, Dean C & Dangl JL (1997). A novel zinc finger protein is encoded by *Arabidopsis LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. Cell 88, 685-694.

Dionisio-Sese ML, Ishikura M, Maruyama T & Miyachi S (1997). UV-absorbing substances in the tunic of a colonial ascidian protect its symbiont, *Prochloron* sp., from damage by UV-B radiation. Mar. Biol. *128*, 455-461.

Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, Thomas CM, Harrison K & Jones JDG (1996). The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. Cell *84*, 451-459.

Dixon RA, Harrison MJ & Lamb CJ (1994). Early events in the activation of plant defense responses. Annu. Rev. Phytopathol. *32*, 479-501.

Doares SH, Syrovets T, Weiler EW & Ryan CA (1995). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defense genes through the octadecanoid pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *92*, 4095-4098.

Dong H, Delaney TP, Bauer DW & Beer SV (1999). Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. Plant J. 20, 207-215.

Dong X (1998). SA, JA ethylene, and disease resistance in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 1, 316-323.

Dorey S, Baillieul F, Pierrel MA, Saindrenan P, Fritig B & Kauffmann S (1997). Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. Mol. Plant-Microbe Interact. *10*, 646-655.

Dorey S, Kopp M, Geoffroy P, Fritig B & Kauffmann S (1999). Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitin. Plant Physiol. *121*, 163-171.

Dröge-Laser W, Kaiser A, Lindsay WP, Halkier BA, Loake GJ, Doerner P, Dixon RA & Lamb C (1997). Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase which phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. EMBO J. *16*, 726-738.

Droillard MJ, Güclü J, Le Caer JP, Mathieu Y, Guern J & Laurière C (1997). Identification of calreticulinlike protein as one of the phosphoproteins modulated in response to oligogalacturonides in tobacco cells. Planta *202*, 341-348.

Dufresne M, Bailey JA, Dron M & Langin T (1998). Clk1, a serine/threonine protein kinase-encoding gene, is involved in pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum* on Common Bean. Mol. Plant-Microbe Interact. 11, 99-108.

Dumas B, Freyssinet G & Pallett KE (1995). Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings. Plant Physiol. *107*, 1091-1096.

Dunlap WC & Chalker BE (1986). Identification and quantitation of near-UV absorbing compounds (S-320) in a hermatypic scleractinian. Coral Reefs 5, 155-159.

Dunlap WC & Yamamoto Y (1995). Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. Comp. Biochem. Physiol. 112B, 105-114.

Dunlap WC, Williams D, McB, Chalker BE & Banaszak AT (1989). Biochemical photoadaptations in vision: UV-absorbing pigments in fish eye tissues. Comp. Biochem Physiol. 93B, 601-607.

Durner J & Klessig DF (1999). Nitric oxide as a signal in plants. Cur. Opi. Plant Biol. 2, 369-374.

Durner J, Shah J & Klessig DF (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends Plant Sci. *2*, 266-274.

Durner J, Wendehenne D & Klessig DF (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP ribose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *95*, 10328-10333.

Dwyer SC, Legendre L, Low PS & Leto TL (1996). Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunologically related proteins. Biochim. Biophys. Acta 1289, 231-237.

Ebel J & Mithöfer A (1998). Early events in the elicitation of plant defence. Planta 206, 335-348.

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

Eckey-Kaltenbach H, Kiefer E, Grosskopf E, Ernst D & Sandermann H Jr (1997). Differential transcript induction of parsley pathogenesis-related proteins and of a small heat shock protein by ozone and heat shock. Plant Mol. Biol. 33, 343-350.

El Ghaouth A, Arul J, Benhamou N, Asselin A, Bélanger RR (1994). Effect of chitosan on cucumber plants: Suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. Phytopathol. *84*, 313-320.

Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P & Raskin I (1992). Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. Cell 70, 879-886.

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

Epple P, Apel K & Bohlmann H (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. Plant Cell 9, 509-520.

Farmer EE & Ryan CA (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 7713-7716.

Farmer EE & Ryan CA (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. Plant Cell *4*, 129-134.

Farmer EE (1994). Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. Plant Mol. Biol. *26*, 1423-1437.

Farmer EE, Moloshok TD, Saxton MJ & Ryan CA (1991). Oligosaccharide signaling in plants: Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation. J. Biol. Chem. *266*, 3140-3145.

Favre-Bonvin J, Bernillon J, Salin N & Arpin N (1987). Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. Phytochem. 26, 2509-2514.

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

Felix G, Grosskopf DG, Regenass M, Basse CW & Boller T (1991b). Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells. Plant Physiol. 97, 19-25.

Felix G, Regenass M & Boller T (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinisation, changes in protein phosphorylation, and establishement of a refractory state. Plant J. *4*, 307-316.

Felix G, Regenass M, Spanu P & Boller T (1994). The protein phosphatase inhibitor calyculin A mimics elicitor action in plant cells and induces rapid hyperphosphorylation of specific proteins as revealed by pulse labeling with ³³P phosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *91*, 952-956.

Felton GW, Korth KL, Bi JL, Wesley SV, Huhman DV, Mathews MC, Murphy JB, Lamb C & Dixon RA (1999). Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory. Curr. Biol. 9, 317-320.

Flor HH (1971). Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. 9, 275-296.

Fournier J, Pouénat ML, Rickauer M, Rabinovitch-Chable H, Rigaud M & Esquerré-Tugayé MT (1993). Purification and characterization of elicitor-induced lipoxygenase in tobacco cells. Plant J. 3, 63-70.

Franklin LA, Yakovleva I, Karsten U & Lüning K (1999). Synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae) and the consequences for sensitivity to ultraviolet B radiation. J. Phycol. 35, 682-693.

Frederick RD, Thilmony RL, Sessa G & Martin GB (1998). Recognition specificity for the bacterial avirulence protein AvrPto is determined by Thr-204 in the activation loop of the tomato Pto kinase. Mol. Cell *2*, 241-245.

Friedrich L, Lawton K, Ruess W, Masner P, Specker N, Gut Rella M, Meier B, Dincher S, Staub T, Uknes S, Métraux JP, Kessmann H & Ryals J (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. Plant J. 10, 61-70.

Fritig B, Gosse J, Legrand M & Hirth L (1973). Changes in phenylalanine ammonia-lyase during the hypersensitive reaction of tobacco to TMV. Virology *55*, 371-379.

Fritig B, Heitz T & Legrand M (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. Curr. Opin. Immunol. 10, 16-22.

Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H & Ryals J (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. Science *261*, 754-756.

Gelli A, Higgins VJ & Blumwald E (1997). Activation of plant plasma membrane Ca²⁺-permeable channel by race-specific fungal elicitors. Plant Physiol. *113*, 269-279.

Gianinazzi S, Martin C & Vallee JC (1970). Hypersensitivity to viruses, temperature and soluble proteins in *Nicotiana Xanthi n.c.* Appearance of new macromolecules at the repression of viral synthesis. C R Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D 270, 2383-2386.

Glazebrook J & Ausubel FM (1994). Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *91*, 8955-8959.

Glazebrook J (1999). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. Curr. Opin. Plant Biol. *2*, 280-286.

Glazebrook J, Zook M, Mert F, Kagan I, Rogers EE, Crute IR, Holub EB, Hammerschmidt R & Ausubel FM (1997). Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. Genetics 146, 381-392.

Glazener JA, **Orlandi EW & Baker CJ** (1996). The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive reaction cell death. Plant Physiol. *110*, 759-763.

Goff LJ (1983). Marine algal interactions: epibiosis, endobiosis, parasitism and disease. In: (Tseng CK, eds) Proceedings of the Joint China US. Phycol. Symposium. Sci. Press. Beijing. 221-274.

Gonzalez ME, Alarcon B & Carrasco L (1987). Polysaccharids as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. Antimicrob. Agents Chemother., *31*, 1388-1393.

Görlach J, Raesecke H, Rentsch D, Regenass M, Roy P, Zala M, Keel C, Boller T, Amrhein N & Schmid J (1995). Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor-treated, cultured tomato cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *92*, 3166-3170.

Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H & Ryals J (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell 8, 629-643.

Granado J, Felix G & Boller T (1995). Perception of fungal sterols in plants. Plant Physiol. 107, 485-490.

Grayburn WS, Schneider R, Hamilton-Kemp TR, Bookjans G, Ali K & Hildebrand DF (1991). Soybean leaves contain multiple lipoxygenases . Plant Physiol. 95, 1214-1218.

Greenberg JT (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 525-545.

Greenberg JT, Guo A, Klessig DF & Ausubel FM (1994). Programmed cell death in plants: a pathogentriggered response activated coordinately with multiple defense functions. Cell 77, 551-563.

Greene RM & Gérard VA (1990). Effects of high-frequency light fluctuations on growth and photoacclimation of the red alga *Chondrus crispus*. Mar. Biol. 105, 337-344.

Groom OJ, Torres MA, Fordham-Skelton AP, Hammond-Kosack KE, Robinson NJ & Jones JDG (1996). *rbohA*, a rice homologue of the mammalian gp91phox respiratory burst oxidase. Plant J. 10, 515-522.

Grosskopf DG, Felix G & Boller T (1990). K-252a inhibits the response of tomato cells to fungal elicitors *in vivo* and their microsomal protein kinase *in vitro*. FEBS Lett. 275, 177-180.

Gschwend PM & Macfarlane JK (1986). Polybromomethanes. A year round study of their release to seawater from Ascophyllum nodosum and Fucus vesiculosis. Organic Goechem. 305, 314-322.

Gschwend PM, Macfarlane JK & Newman KA (1985). Volatile organic compounds released to seawater from temperate marine macroalgae. Science 299, 1033-1035.

Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM & Zenk MH (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitorinduced pland cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *89*, 2389-2393.

Haenen GRMM & Bast A (1999). Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. Methods in enzymology 300, 490-503.

Hahlbrock K, Scheel D, Logemann E, Nürnberger T, Parniske M, Reinold S, Sacks WR & Schmelzer E (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4150-4157.

Hahn MG (1996). Microbial elicitors and their receptors in plants. Annu Rev. Phytopathol. 34, 387-412.

Hahn MG, Darvill AG & Albersheim P (1981). Host-pathogen interactions XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. Plant Physiol. 68, 1161-1169.

Hain R, Reif HJ, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, Wiese W, Schmelzer E, Schreier PH, Stocker RH & al (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature *361*, 153-156.

Hammond-Kosack KE & Jones JDG (1997). Plant disease resistance genes. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 575-607.

Hammond-Kosack KE, Silverman P, Raskin I & Jones JDG (1996). Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* induce changes in cell morphology and the synthesis of ethylene and salicylic acid in tomato plants carrying the corresponding *Cf* disease resistance gene. Plant Physiol. *110*, 1381-1394.

He SY, Huang HC & Collmer A (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Harpin Pss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. Cell 73, 1255-1266.

Heesch S & Peters AF (1999). Scanning electron microscopy observation of host entry by two brown algae endophytic in Laminaria saccharina (Laminariales, Phaeophyceae). Phycol. Res. 47, 1-5.

Heitz T, Bergey D & Ryan CA (1997). A gene encoding a chloroplast lipoxygenase is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate in tomato leaves. Plant Physiol. *114*, 1805-1809.

Heitz T, Segond S, Kauffmann S, Geoffroy P, Prasad V, Brunner F, Fritig B & Legrand M (1994). Molecular characterization of a novel tobacco PR protein: a new chitinase/lysosyme. Mol. Gen. Genet. 245, 246-254.

Henderson LM, Chappell JB & Jones OTG (1989). Superoxide generation is inhibited by phospholipase A2 inhibitors: role for phospholipase A2 in the activation of the NADPH oxidase. Biochem. J. *264*, 249-255.

Hermann KM (1995a). The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. Plant Physiol. 107, 7-12.

Hermann KM (1995b). The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. Plant Cell 7, 907-919.

Hewson WD & Hager LP (1980). Bromoperoxidase and halogenated lipids in marine algae. J. Phycol. *16*, 340-345.

Heyraud A, Colin-Morel P, Girond S, Richard C & Kloareg B (1996). HPLC analysis of saturated and unsaturated oligoguluronates and oligomannuronates. Application to the determination of the action pattern of *Haliotis tuberculata* alginate lyase. Carbohydr. Res. 291, 115-126.

Hilbert JL, Costa G & Martin F (1991). Ectomycorrhizin symbiosis and polypeptide change during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. Plant Physiol. 97, 977-984.

Hirt H (1997). Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. Trend. Plant Sci. 2, 11-15.

Holliday MJ & Keen N (1982). The role of phytoalexins in the resistance of soybean leaves to bacteria: effect of glyphosate on glyceollin accumulation. Phytopatho. 72, 1470-1474.

Howe GA & Ryan CA (1999). Suppressors of systemin signaling identify genes in the tomato wound response pathway. Genetics 153, 1411-1421.

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

Hückelhoven R, Fodor J, Preis C & Kogel K-H (1999). Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. Plant Physiol. *119*, 1251-1260.

Hunt MD, Delaney TP, Dietrich RA, Weymann KB, Dangl JL & Ryals JA (1997). Salicylate independent lesion formation in *Arabidopsis Isd* mutants. Mol. Plant-Microbe Interact. 10, 531-536.

Hurkman WJ & Tanaka CK (1996). Germin gene expression is induced in wheat leaves by powdery mildew infection. Plant Physiol. *111*, 735-739.

Inuis H, Yamaguchi Y & Hirano S (1997). Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalaninie ammonia-lyase induction in rice suspension culture. Biosci. Biotech. Biochem. *61*, 975-978.

Jabs T, Dietrich RA & Dangl JF (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. Science 273, 1853-1856.

Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K & Scheel D (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4800-4805.

Jaffray AE & Coyne VE (1999). Investigation of Gracilaria gracilis defence genes expressed in response to bacterial infection. 2 ND European Phycological Congress. Book of abstracts (101).

Jin D & West C (1984). Characteristics of galacturonic acid oligomers as elicitors of casbene synthetase activity in castor bean seedlings. Plant Physiol. *74*, 989-992.

Johal GS & Rahe JE (1988). Glyphosate, hypersensitivity and phytoalexin accumulation in the incompatible bean anthracnose host-parasite interaction. Physiol. Mol. Plant Pathol. *32*, 267-281.

John M, Rörhig H, Schmidt J, Walden R & Schell J (1997). Cell signaling by oligosaccharides. Trends Plant Sci. 2, 111-115.

Johnston KH & McCandless EL (1973). Enzymic hydrolysis of the potassium chloride soluble fraction of carrageenan: and properties of ' -carrageenase ' from *Pseudomonas carrageenovora*. Can. J. Microbiol. 19, 779-788.

Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, & Jones JDG (1994). Isolation of the tomato *Cf*-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. Science 266, 789-793.

Joubert JM, Yvin JC, Barchietto T, Seng JM, Plesse B, Klarzynski O, Kopp M, Fritig B & Kloareg B (1998). A 1-3 glucan, specific to a marine alga, stimulates plant defence reactions and induces broad range resistance against pathogens. Brighton Crop. Protection. Conference Pest and diseases. *2*, 441-448.

Kamoun S, Young M, Förster H, Coffey MD & Tyler BM (1994). Potential role of elicitins in the interaction between *Phytophthora* species and tobacco. App. Env. Microbiol. 60, 1593-1598.

Kamoun S, Young M, Glascock CB & Tyler BM (1993). Extracellular protein elicitor from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to a bacterial and fungal phytopathogens. Mol. Plant-Microbe Interact. 6, 15-25.

Karentz D, Mc Euen FS, Land MC & Dunlap WC (1991). Survey of mycosporine-like amino acid compouds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. Mar. Biol. *108*, 157-166.

Karsten U, Franklin LA, Lüning K & Wiencke C (1998). Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). Planta 205, 257-262.

Katz VA, Thulke OU & Conrath U (1998). A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. Plant Physiol. *117*, 1333-1339.

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

Kauss H, Jeblick W & Domard A (1989). The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. Planta *178*, 385-392.

Keen NT (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Genet. *24*, 447-463.

Keen NT & Dawson WO (1992). Pathogen avirulence genes and elicitors of plant defense. In Plant gene research, genes involved in plant defense, T Boller and F. Meins, eds. (Wien: Springer Verlag), pp. 85-114.

Keen NT, Holliday MJ & Yoshikawa M (1982). Effects of glyphosate on glyceollin production and the expression of resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea in soybean. Phytopathol. 72, 1467-1469.

Keith B, Dong X, Ausubel FM & Fink GR (1991). Differential induction of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase genes in *Arabidopsis thaliana* by wounding and pathogenic attack. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8821-8825.

Keller H, Pamboukdjian N, Ponchet M, Poupet A, Delon R, Verrier JL, Roby D & Ricci P (1999). Pathogen-induced elicitin production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. Plant Cell 11, 223-235.

Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon R & Lamb C (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. Plant Cell *10*, 255-266.

Kieffer F, Simon-Plas F, Maune BF & Blein JP (1997). Tobacco cells contain a protein, immunologically related to the neutrophil small G protein Rac2 and involved in elicitor-induced oxidative burst. FEBS Lett. 403, 149-153.

Kim CH & Palukaitis P (1997). The plant defense response to cucumber mosaic virus in cowpea is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. EMBO J. 16, 4060-4068.

Kim JF & Beer SV (1998). HrpW of Erwinia amylovora, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. J. Bacteriol. 180, 5203-5210.

Kindness G, Long WF & Williamson FB (1980). Anticoagulant effects of sulfated polysaccharides in normal and anti-thrombin III- deficient plasmas. Br. J. Pharmac. 69, 675-677.

Klarzynski O, Plesse B, Richard C, Joubert JM, Yvin JC, Lahaye M, Kopp M, Kloareg B & Fritig B (2000). Linear -1,3 glucans are strong elicitors of plant defence responses. (soumis dans Plant Physiol).

Kloareg B & Quatrano RS (1988). Structure of cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 26, 259-315.

Knoester M, Van Loon LC, Van den Heuvel J, Hennig J Bol JF & Linthorst HJM (1998). Ethyleneinsensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1933-1937.

Knorr DA & Dawson WO (1988). A point mutation in the tobacco mosaic virus capsid protein gene induces hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 170-174.

Kobayashi A, Tai A, Kanzaki H & Kawazu K (1993). Elicitor-active oligosaccharides from algal laminaran stimulate the production of antifungal compounds in alfalfa. Z. Naturforsch 48c, 575-579.

Koch E, Meier BM, Eiben HG & Slusarenko A (1992). A lipoxygenase from leaves of tomato (Lycopersicon esculentum.) is induced in response to plant pathogenic *Pseudomonas*. Plant Physiol. 99, 571-576.

Koga J, Yamauchi T, Shimura M, Ogawa N, Oshima K, Umemura K, Kikuchi M & Ogasawara N (1998). Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. J. Biol. Chem. 273, 31985-31991.

Kombrink E & Somssich IE (1995). Defense responses of plants to pathogens. Adv. Bot. Res. 21, 1-34.

Kuc J (1995). Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. Annu. Rev. Phytopathol. 33, 275-297.

Küpper FC, Kloareg B, Guern J & Potin P (2000). Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp Laminaria digitata. (Soumis dans Plant Physiol.)

Küpper FC, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre JM, Vilter H & Kloareg B (1998). Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. Planta. *207*, 163-171.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

Lamb C & Dixon RA (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 251-275.
Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Ùknes S & Ryals J (1995). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. Mol. Plant-Microbe Interact. 8, 863-870.

Lawton KA, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessmann H, Staub T & Ryals J (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant J. 10, 71-82.

Lawton KA, Potter SL, Uknes S & Ryals J (1994). Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. Plant Cell *6*, 581-588.

Lawton MA & Lamb CJ (1987). Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding, and infection. Mol. Cell Biol. 7, 335-341.

Lee S, Suh S, Kim S, Crain RC, Kwak JM; Nam H-G & Lee Y (1997). Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants. Plant J. *12*, 547-556.

Legendre L, **Heinstein PF & Low PS** (1992). Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. J. Biol. Chem. *267*, 20140-20147.

Legendre L, Rueter S, Heinstein PF & Low PS (1993a). Characterization of the oligogalacturonideinduced oxidative burst in cultured soybean (Glycine max) cells. Plant Physiol. *102*, 233-240.

Legendre L, Yueh YG, Crain R, Haddock N, Heinstein PF & Low PS (1993b). Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. J. Biol. Chem. *268*, 24559-24563.

Legrand M, Kauffmann S, Geoffroy P & Fritig B (1987). Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6750-6754.

Lépagnol-Descamps V, Richard C, Lahaye M, Potin P, Yvin JC & Kloareg B (1998). Purification and determination of the action pattern of *Haliotis tuberculata* laminarinase. Carbohydr. Res. 310, 283-289.

Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé J-C & Dénarié J (1990). Symbiotic hostspecificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature 344, 781-784.

Leshem YY, Haramaty E, Iluz D, Malik Z, Sofer Y, Roitman L & Leshem Y (1997). Effect of stress nitric oxide (NO): Interaction between chlorophyll fluorescence, galactolipid fluidity and lipoxygenase activity. Plant Physiol. Biochem. *35*, 573-579.

Lev S, Sharon A, Hadar R, Ma H & Horwitz BA (1999). A mitogen-actived protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: Diverse roles for mitogen-actived protein kinase homologs in foliar pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *23*, 13542-13547.

Levine A, Pennell RI, Alvarez ME, Palmer R & Lamb C (1996). Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. Curr. Biol. *6*, 427-437.

Levine A, Tenhaken R, Dixon R & Lamb C (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell *79*, 583-593.

Lortat-Jacob H, Turnbull JE & Grimaud J-A (1995). Molecular organization of the interferon -binding domain in heparan sulphate. Biochem. J. 310, 497-505.

Lovelock JE, Maggs RJ & Wade RJ (1973). Halogenated hydrocarbons in and over the Atlantic. Nature 241, 194-196.

Maher EA, Bate NJ, Ni W, Elkind Y, Dixon RA & Lamb CJ (1994). Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels preformed phenylpropanoid products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7802-7806.

Maina G, Allen RD, Bhatia SK & Stelzig DA (1984). Phenol metabolism, phytoalexins, and respiration in potato tuber tissue treated with fatty acids. Plant Physiol. *76*, 735-738.

Malamy J & Klessig DF (1992). Salicylic acid and plant disease resistance. The Plant Journal 2, 643-654.

Manchenko GP (1994). Peroxidase. In handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels (Boca Raton, FL: CRC Press), 94.

Manley SL & Dastoor MN (1987). Methyl halide (CH₃X) production from the giant kelp, Macrocystiss, and estimates of global CH₃X production by kelp. Limnol. Oceanogr. *32*, 709-715.

Manley SL, Goodwin K & Nort WJ (1992). Laboratory production of bromoform, methylene bromide, methyl iodide by macroalgae and distribution in nearshore southern California waters. Limnol. Oceanogr. 37, 1652-1659.

Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganal MW, Spivey R, Wu T, Earle ED & Tanksley SD (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene confering disease resistance in tomato. Science 262, 1432-1436.

Mathieu Y, Sanchez FJ, Droillard MJ, Lapous D, Laurière C & Guern J (1996a). Involvement of protein phosphorylation in the early steps of transduction of the oligogalacturonide signal in tobacco cells. Plant Physiol. Biochem. *34*, 399-408.

Mathieu Y, Lapous D, Thomine S, Laurière C & Guern J (1996b). Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. Planta 199, 416-424.

Mauch F, Hadwiger LA, Boller T (1984). Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitor. Plant Physiol. *76*, 607-611.

Mauch-Mani B & Métraux JP (1998). Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. Annals of Botany *82*, 535-540.

Mauch-Mani B & Slusarenko AJ (1996). Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Perenospora parasitica*. Plant Cell 8, 203-212.

May MJ, Hammond-Kosack KE & Jones JDG (1996). Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxydation in the Cf-gene-dependent defense response of tomato codyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. Plant Physiol. *110*, 1367-1379.

Mayers B & Hemmens B (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. Trends Biochem. Sci. *22*, 477-481.

McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE & Browse J (1997). Jasmonate is essential for insect defense *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5473-5477.

McCandless EL, Craigie JS & Walter JA (1973). Carrageenans in the gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus crispus*. Planta *112*, 201-212.

McCandless EL, West JA & Guiry MD (1983). Carrageenan patterns in the Gigartinaceae. Biochem. Syst. Biol. 11, 175-182.

McCue KF & Conn EE (1989). Induction of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase activity by fungal elicitor in cultures of *Petroselinum crispum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 7374-7377.

McLusky SR, Bennett M, Beale MH, Lewis MJ, Gaskin P & Mansfield JW (1999). Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are assiociated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. Plant J. 17, 523-534.

Mehdy MC (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. Plant Physiol. 105, 467-472.

Mehdy MC, Sharma YK, Sathasivan K & Bays NW (1996). The role of activated oxygen species in plant disease resistance. Physiol. Plant. 98, 365-374.

Meier BM, Shaw N & Slusarenko AJ (1993). Spatial and temporal accumulation of defense gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacterial-induced hypersensitive cell death. Mol. Plant Microbe Interact. 6, 453-466.

Messner B & Boll M (1993). Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin like material in a cell suspension culture of spruce (*Picea abies*). Plant Cell Tissue Organ Cult. *34*, 261-269.

Michel G, Barbeyron B, Flament D, Vernet T, Kloareg B & Dideberg O (1999). Expression, purification, crystallisation and preliminary X-ray analysis of the kappa-carrageenase from *Pseudoalteromonas* carrageenovora. Crystal Acta. D55, 918-920.

Milat M-L, Ducruet JM, Ricci P & Blein JP (1991b). Physiological and structural changes in Tobacco leaves treated with cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. Phytopathology. 81, 1364-1368.

Milat M-L, Ricci P, Bonnet P & Blein JP (1991a). Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. Phytochem. 30, 2171-2173.

Miller KJ, Hadley JA & Gustine DL (1994). Cyclic -1,6-1,3-glucans of *Bradyrhizobium jasponicum* USDA 110 elicit isoflavonoid production in the soybean (Glycine max) host. Plant Physiol. 104, 917-923.

Mithöfer A, Bhagwat AA, Feger M & Ebel J (1996). Suppression of fungal -glucan-induced plant defence soybean (Glycine max. L.) by cyclic 1,3-1,6- -glucans from the symbiont *Bradyrhizobium jasponicum*. Planta 199, 270-275.

Mittler R & Lam E (1995). Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response. Plant Cell 7, 1951-1962.

Mittler R, Feng X & Cohen M (1998). Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. Plant Cell 10, 461-473.

Mittler R, Shulaev V & Lam E (1995). Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. Plant Cell 7, 29-42.

Moore RE (1977). Volatile compounds from marine algae. Acc. Chem. Res. 10, 40-47.

Moyen C, Hammond-Kosack KE, Jones J, Knight MR & Johannes E (1998). Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca²⁺ mobilization from intra- and extracellular compartments. Plant Cell Environ. *21*, 1101-1112.

MpigaP, Bélanger RR, Paulitz TC & Benhamou N (1997). Increased resistance to Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici in tomato plants treated with the endophytic bacterium, *Pseudomonas fluorescens*, strain 63-28. Physiol. Mol. Plant Pathol. 50, 301-320.

Mtolera MSP, Collén J, Pedersén M, Ekdahl A, Abrahamsson K & Semesi AK (1996). Stress-induced production of volatile halogenated organic compounds in *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) caused by elevated pH and high light intensities. Eur. J. Phycol. 31, 89-95.

Narvaez-Vasquez J, Florin-Christensen J & Ryan CA (1999). Positional specificity of phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. Plant Cell 11, 2249-2260.

Nawrath C & Métraux JP (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inocultaion. Plant Cell *11*, 1393-1404.

Niderman T, Genetet I, Bruyère T, Gees R, Stintzi, A Legrand M, Fritig B & Mösinger E (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. Plant Physiol. 108, 17-27.

Nightingale PD, Malin G & Liss PS (1995). Production of chloroform and other low molecular weight halocarbons by some species of macroalgae. Limnol. Oceanogr. 40, 680-689.

Noda HH, Amano K, Arashima S, Hashimoto & Nisizawa K (1989). Antitumor activity of polysaccharides and lipids from marine algae. Nippon Suisan Gakkaishi, *55*, 1265-1271.

Noritake T, Kawakita K & Doke N (1996). Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. Plant Cell Physiol. *37*,113-116.

Norman C, Vidal S & Palva ET (1999). Oligogalacturonide-mediated induction of a gene involved in jasmonic acid synthesis in response to the cell-wall-degrading enzymes of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. Mol. Plant Microbe Interact. *12*, 640-644.

Nürnberger T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K & Scheel D (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes tiggers multiple defense responses. Cell *78*, 449-460.

Oetiker JH, Olson DC, Shiu OY & Yang SF (1997). Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Mol. Biol. 34, 275-286.

Ohta H, Shida K, Peng YL, Fusurawa I, Shishiyama J, Aibara S & Morita Y (1990). The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of antifungal substances. Plant Cell Physiol. *31*, 1117-1122.

O'Kelly CJ (1982). Observation in marine Chaetophoraceae (Chlorophyta). III. The structure, reproduction and the life history of *Endophyton ramosum*. Phycologia 21, 247-257.

Orozco-Cardenas M & Ryan CA (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *96*, 6553-6557.

Otte O & Barz W (1996). The elicitor-induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structure proteins. Planta *200*, **238**-246.

Pallas JA, Paiva NL Lamb C & Dixon RA (1996). Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. Plant J. 10, 281-293.

Parchmann S, Gundlach H & Mueller MJ (1997). Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. Plant Physiol. *115*, 1057-1064.

Parker JE, Schulte W, Hahlbrock K & Scheel D (1991). An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. Mol. Plant-Microbe Interact. 4, 19-27.

Pearce G, Strydom D, Johnson S & Ryan CA (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. Science *253*, 895-898.

Pedersén M, Collén J, Abrahamsson K & Ekdahl A (1996). Production of halocarbons from seaweeds: an oxidative stress reaction? Sci. Mar. 60 (Suppl. 1) 257-263.

Pellegrini L, Rohfritsch O, Fritig B & Legrand M (1994). Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. Plant Physiol. *106*, **877-886**.

Peng YL, Shirano Y, Ohta H, Hibino T, Tanaka K & Shibata D (1994). A novel lipoxygenase from rice. Primary strucure and specific expression upon incompatible injection. J. Biol. Chem. *269*, 3755-3761.

Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Métraux JP & Broekaert WF (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. Plant Cell 10, 2103-2113.

Penninckx IAMA, Eggermont K, Terras FRG, Thomma BPHJ, de Samblanx GW, Buchala A, Métraux JP, Manners JM & Broekaert WF (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. Plant Cell 8, 2309-2323.

Peters AF & Burkhardt E (1998). Systematic position of the kelp endophyte Laminarionema elsbetia (Phaeophyceae, Ectocarpales sensu lato) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. Phycolog. 37, 114-120.

Peters AF & Ellertsdòttir E (1996). New record of the kelp endophyte Laminarionema elsbetia (Phaeophyceae, Ectocarpales) at Helgoland and its life history in culture. Nova Hedwigia 62, 341-349.

Piedras P, Hammond-Kosack KE, Harrison K & Jones JDG (1998). Rapid Cf-9- and Avr9-dependent production of active oxygen species in tobacco suspension cultures. Mol. Plant-Microbe Interat. *11*, 1155-1166.

Références bibliographiques

Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ & Van Loon LC (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell 10, 1571-1580.

Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Sela-Buurlage MB, Van den Elzen PJM, Melchers LS & Cornelissen BJC (1994). A novel pathogen- and wound-inductible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. Plant Physiol. 104, 109-118.

Popham P, Pick S & Novacky A (1995). The effect of harpin from *Erwinia amylovora* on the plasmalemma of suspension-cultured tobacco cells. Physiol. Mol. Plant Pathol. 47, 39-50.

Potin P, Bouarab K, Küpper F & Kloareg B (1999). Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interaction. Curr. Opin. Microbiol. *2*, 276-283.

Potin P, Richard C, Barbeyron T, Henrissat B, Gey C, Petillot Y, Forest E, Dideberg O, Rochas C & Kloareg B (1995). Processing and hydrolytic mechanism of the *cgk*A-encoded -carrageenase of *Alteromonas carrageenovora*. Eur. J. Biochem. 228, 971-975.

Potin P, Sanseau A, Le Gall Y, Rochas C & Kloareg B (1991). Purification of a new -carrageenase from a marine *Cytophaga*-like bacterium. Eur. J. Biochem. 201, 241-247.

Praillet C, Grimaud J-A, Lortat-Jacob H (1998). Les protéoglycanes I. Molécules aux multiples fonctions...futures molécules thérapeutiques? m/s 14, 412-420.

Pruvost J, Connan O, Marty Y & Le Corre P (1999). A sampling device for collection and analysis of volatile halocarbons in coastal and oceanic waters. Analyst *124*, 1389-1394.

Pueschel CM & Van der Meer JP (1985). Ultrastructure of the fungus *Petersenia palmariae* (Oomycetes) **parasitic on the alga** *Palmaria mollis* (Rhodophyceae). Can. J. Bot. 63, 409-418.

Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R & Guern J (1997). Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. Plant Cell 9, 2077-2091.

Raghukumar C & Chandramohan D (1988). Changes in the marine green alga *Chaetomorpha media* on infection by a fungal pathogen. Bot. Mar. *31*, 311-315.

Rajasekhar VK, Lamb C & Dixon RA (1999). Early events in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent *Pseudomonas syringae* pv glycinea. Plant Physiol. 120, 1137-1146.

Rancé I, Fournier J & Esquerré-Tugayé MT (1998). The incompatible interaction between *Phyophthora* parasitica var. nicotianae race O and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxigenase sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6554-6559.

Requena L. & Bornemann S (1999). Barley (*Hordeum vulgare*) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme. Biochem. J. 343, 185-190.

Reuber TL, Plotnikova JM, Dewdney J, Rogers EE, Wood W & Ausubel FM (1998). Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. Plant J. 16, 473-485.

Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, Billard V, Michel G & Pernollet JC (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. Eur. J. Biochem. 183, 555-563. **Ricci P, Trentin F, Bonnet P, Venard P, Mouton-Perronnet F & Bruneteau M** (1992). Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco by isolates of *Phytophthora* parasitica. Plant Pathol. 41, 298-307.

Rickauer M, Bottin A & Esquerré-Tugayé M-T (1992). Regulation of proteinase inhibitor production in tobacco cells by fungal elicitors, hormonal factors and methyl jasmonate. Plant Physiol. Biochem. *30*, 579-584.

Roche P, Debellé F, Maillet F, Lerouge P, Faucher C, Truchet G, Dénarié J & Promé J-C (1991). Molecular basis of symbiotic host specificity of *Rhizobium meliloti*: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. Cell 67, 1131-1143.

Rogers EE, Glazebrook J & Ausubel FM (1996). Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* camalexin and its role in *Arabidopsis*-pathogen interactions. Mol. Plant Microbe Interact. 9, 748-757.

Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig DF, Hirt H & Jones JDG (1999). Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. Plant Cell. *11*, 273-287.

Romero A, Alamillo JM & Garcia-Olmedo F (1997). Processing of thionin precursors in barley leaves by a vacuolar proteinase. Eur. J. Biochem. 243, 202-208.

Rosahl S (1996). Lipoxygenases in plants - Their role in development and stress response. Z. Naturforsch. 51c, 123-138.

Royo J, Leon J, Vancanneyt G, Albar JP, Rosahl S, Ortego F, Castanera P & Sanchez-Serrano JJ (1999). Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1146-1151.

Rustérucci C, Stallaert V, Milat ML, Pugin A, Rucci P & Blein JP (1996). Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitins in *Nicotiana*. Plant Physiol. 111, 885-891.

Ryan CA & Farmer EE (1991). Oligosaccharide signaling in plants. Annu. Rev. Cell. Biol. 3, 295-317.

Ryan CA (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 28, 425-449.

Ryerson DE & Heath MC (1996). Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. Plant Cell *8*, 393-402.

Sadir R, Forest E & Lortat-Jacob H (1998). The heparan sulfate binding sequence of interferonincreased the on rate of the interferon- -interferon- receptor complex formation. J. Biol. Chem. 273, 10919-10925.

Sanchez PC, Correa JA & Garcia-Reina G (1996). Host-specificity of Endophyton ramosum (Chlorophyta), the causative agent of green patch disease in *Mazzaella laminarioides* (Rhodophyta). Eur. J. Phycol. 31, 173-179.

Saravitz DM & Siedow JN (1995). The lipoxygenase isozymes in soybean [Glycine max (L.) Merr.] leaves. Changes during leaf development, after wounding, and following reproductive sink removal. J. Agric. Food. Chem. 33, 852-855.

Sawabe T, Makino H, Tatsumi M, Nakano K, Tajima K, Iqbal MM, Yumoto I, Ezura Y, Christen R (1998). *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria jasponica*. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 769-774.

Schaller A (1999). Oligopeptide signalling and the action of systemin. Plant Mol. Biol. 40, 763-769.

Schaller A & Oecking C (1999). Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. Plant Cell *11*, 263-272.

Schaller A & Ryan CA (1994). Identification of a 50-kDa systemin-binding protein in tomato plasma membranes having Kex2p-like properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11802-11806.

Scheel D (1998). Resistance response physiology and signal transduction. Curr. Opin. Plant Biol. 1, 305-310.

Scheer JM & Ryan CA (1999). A 160-kD systemin receptor on the surface of Lycopersicon peruvianum suspension-cultured cells. Plant Cell 11, 1525-1536.

Schuster AM & Davies E (1983). Ribonucleic acid and protein metabolism in pea epicotyls. II. Response to wounding in aged tissue. Plant Physiol. 73, 817-821.

Schweizer P, Buchala A, Silverman P, Seskar M, Raskin I & Métraux JP (1997). Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels. Plant Physiol. *114*, 79-88.

Schweizer P, Christoffel A & Duller R (1999). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of weat confers disease resistance. Plant J. 5, 541-552.

Schweizer P, Gees R & Mösinger E (1993). Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (Hordeum vulgare L.) with the powdery mildew *Erisiphe graminis* f. sp. hordei. Plant Physiol. 102, 503-511.

Segal AW & Abo A (1993). The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. Trends Biochem. Sci. 18, 43-47.

Seskar M, Shulaev V & Raskin L (1998). Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. Plant Physiol. 116, 387-392.

Sharan M, Taguchi G, Gonda K, Jouke T, Shimosaka M, Hayashida N & Okazaki M (1998). Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopolectin and scopolin in tobacco cell cultures. Plant Sci. *132*, 13-19.

Sharon A, Amsellem Z & Gressel J (1992). Glyphosate suppression of an elicited defense response: increased susceptibility of *Cassia obtusifolia* to a mycoherbicide. Plant Physiol 98, 654-659.

Shick JM, Lesser MP & Stochaj WR (1991). Ultraviolet radiation and photooxidative stress in zooxanthellate Anthozoa: the sea anemone *Phyllodiscus semoni* and the octocoral *Clavularia* sp. Symbiosis 10, 145-173.

Shick JM, Lesser MP, Dunlap WC, Stochaj WR, Chalker BE & Wu Won J (1995). Depth-dependent responses to solar ultraviolet radiation and oxidative stress in the zooxanthellate coral Acropora microphthalma. Mar. Biol. 122, 41-51.

Shimonishi M, Kuwamoto S, Inoue H, Wever R, Ohshiro T, Izumi Y & Tanabe T (1998). Cloning and expression of the gene for a vanadium-dependent bromoperoxidase from a marine macro-alga, *Corallina pilulifera*. FEBS Letters 428, 105-110.

Shulaev V, Leon J & Raskin I (1995). Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco. Plant Cell 7, 1691-1701.

Shulaev V, Silverman P & Raskin I (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. Nature 385, 718-721.

Simpson FJ & Shacklock PF (1979). The cultivation of *Chondrus crispus*. Effect of temperature on growth and carrageenan production. Bot. Mar. 22, 295-298.

Simpson SD, **Ashford DA**, **Harvey DJ & Bowles DJ** (1998). Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. Glycobiology. 8, 579-583.

Sivalingam PM, Ikawa T & Nisizawa K (1976). Isolation and physico-chemical properties of a substance 334 from the red alga, *Porphyra yezoensis* Ueda. Bot. Mar. 19, 1-7.

Smith-Becker J, Marois E, Huguet EJ, Midland SL, Sims JJ & Keen NT (1998). Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. Plant Physiol. *116*, 231-238.

Spiro MD, Ridley BL, Eberhard S, Kates KA, Mathieu Y, O'Neill MA, Mohnen D, Guern J, Darvill A & Albersheim P (1998). Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. Plant Physiol. *116*, 1289-1298.

Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis GE & Jones JDG (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. Science *268*, 661-667.

Staskawicz BJ, Dahlbeck D & Keen N (1984). Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on Glycine max (L.) Merr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *81*, 6024-6028.

Stennis MJ, Chandra S, Ryan CA & Low PS (1998). Systemin potentiates the oxidative burst in cultured tomato cells. Plant Physiol. *117*, 1031-1036.

Sticher L, Mauch-Mani B & Métraux JP (1997). Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. *35*, 235-270.

Stintzi A, Geoffroy P, Bersuder D, Fritig B & Legrand M (1993b). cDNA cloning and expression studies of tobacco class III chitinase-lysozymes. In Mechanisms of Plant Defense Responses, B. Fritig and M. Legrand, eds. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 312-315.

Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M & Fritig B (1993a). Plant "Pathogenesis-Related" proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie 75, 687-706.

Stratmann JW & Ryan CA (1997). Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 11085-11089.

Strobel NE, Gopalan JS, Kuc JA & He SY (1996). Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. syringae 61 hrpAPss protein. Plant J. 9, 431-439.

Subramaniam R, Després C & Brisson N (1997). A functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defese response in potato. Plant Cell 9, 653-664.

Tavernier E, Wendehenne D, Blein JP & Pugin A (1995). Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinceous elicitor of a hypersensitive reaction in tobacco cells. Plant Physiol. *109*,1025-1031.

Terras FRG, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue BPA & Broekaert WF (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. Plant Cell *7*, 573-588.

Terras FRG, Penninckx IAMA, Goderis IJ & Broekaert WF (1998). Evidence that the role of plant defensions in radish defense responses is dependent of salicylic acid. Planta 206, 117-124.

Theiler R, Cook JC, Hager LP & Siuda JF (1978). Halocarbon synthesis by bromoperoxidase. Science *202*, 1094-1096.

Thevissen K, Ghazi A, De Samblanx GW, Brownlee C, Osborn RW & Broekaert WF (1996). Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. J. Biol. Chem. 271, 15018-15025.

Thevissen K, Terras FR & Broekaert WF (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. Appl. Environ. Microbiol. *65*, 5451-5458.

Thomma BPHJ, Nelissen I, Eggermont K & Broekaert WF (1999). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. Plant J. 19, 163-171.

Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE & Jones JDG (1998). Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). Plant J. 14, 365-370.

Trione EJ, Leach CM & Mutch JT (1966). Sporogenic substances isolated from fungi. Nature 212, 163-164.

Truchet G, Roche P, Lerouge P, Vasse J, Camut S, De Billy F, Promé J-C & Dénarié J (1991). Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organo-genesis in alfalfa. Nature 351, 670-673.

Tsujino I, Yabe K & Sekikawa I (1980). Isolation and structure of a new amino-acid, shinorine, from the red alga *Chondrus yendoi* Yamada et Mikami. Bot. Mar. 23, 65-68.

Umemoto N, Kakitani M, Iwamatsu A, Yoshikawa M, Yamaoka N, Ishida I (1997). The structure and function of a soybean -glucan-elicitor-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *94*, 1029-1034.

Van Camp WV, Van Montagu M & Inzé D (1998). H₂O₂ and NO: Redox signals in disease resistance. Trends Plant Sci. 3, 330-334.

Van den Ackerveken GFJM, Van Kan JAL, De Wit PJGM (1992). Molecular analysis of the avirulence gene avr9 of the fungal tomato pathogen *Cladosporium* fully supports the gene-for-gene hypothesis. Plant J. 2, 359-366.

Van der Meer JP & Pueschel CM (1985). Petersenia palmariae n. sp. (Oomycetes): a pathogenic parasite of the red alga Palmaria mollis (Rhodophyceae). Can. J. Bot. 63, 404-408.

Van Kan JA, Van den Ackerveken GF & de Wit PJ (1991). Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene avr9 of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. Mol. Plant Microbe Interact. 4, 52-59.

Van Loon LC & Van Kammer A (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun NN. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. Virology 40, 199-211.

Vera-Estrella R, Higgins VJ & Blumwald E (1994). Plant defense response to fungal pathogens. Plant Physiol. *106*, 97-102.

Véronési C, Rickauer M, Fournier J, Pouénat ML, Esquerré-Tugayé MT (1996). Lipoxygenase gene expression in the tobacco-Phyophthora parasitica var nicotianae interaction. Plant Physiol. 112, 997-1004.

Viard MP, Martin F, Pugin A & Blein JP (1994). Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. Plant Physiol. *104*, 1245-1249.

Vidal S, Eriksson ARB, Montesano M, Denecke J & Palva ET (1998). Cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora* cooperate in the salicylic acid-dependent induction of a plant defense response. Mol. Plant-Microbe Interact. *11*, 23-32.

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

Vijayan P, Shocket J, Lévesque CA, Cook RJ & Browse J (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7209-7214.

Walker-Simmons M, Hadwiger L & Ryan CA (1983). Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the anti-fungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. Biochem. Biophys. Res. Commun. *110*, 194-199.

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

Wei Y, Zhang Z, Andersen CH, Schmelzer E, Gregersen PL, Collinge DB, Smedegaard-Petersen V & Thordal-Christensen H (1998). An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant Mol. Biol. 36, 101-112.

Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A & Beer SV (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Nature 257, 85-88.

Weinberger F, Friedlander M & Gunkel W (1994). A bacterial facultative parasite of *Gracilaria* conferta. Dis. Aquat. Org. 18, 135-141.

Weinberger F, Friedlander M & Hoppe H-G (1999). Oligoagars elicit a physiological response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). J. Phycol. 35, 747-755.

Weinberger F, Hoppe H-G & Friedlander M (1997). Bacterial induction and inhibition of a fast necrotic response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). J. Appl. Phycol. 9, 277-285.

Weinberger F, Hoppe H-G, Richard C, Kloareg B, Kashman Y & Friedlander M (2000). Two distinct recepting systems for oligoagar elicitors are present in the red alga *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). (soumis dans Plant Physiol.).

Wever R, Tromp MGM, Krenn BE, Marjani A & Van Tol M (1991). Brominating activity of the seaweed Ascophyllum nodosum: impact on the biosphere. Environ. Sci. Technol. 25, 446-449.

Wojtaszek P (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem. J. 322, 681-692.

Xing T, Higgins VJ & Blumwald E (1997). Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to plasma membrane of tomato cells. Plant Cell 9, 249-259.

Xu H & Heath MC (1998). Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. Plant Cell *10*, 585-597.

Xu JR & Hamer JE (1996). MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus Magnaporthe grisea. Genes Dev. *10*, 2696-2706.

Xu JR, Staiger CJ & Hamer JE (1998). Inactivation of the mitogen-actived protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *95*, 12713-12718.

Xu Y, Chang PFL, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM & Bressan RA (1994). Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. Plant Cell 6, 1077-1085.

Yang Y, Shah J & Klessig DF (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. Genes Dev. *11*, 1621-1639.

Yu I-C, Parker J & Bent AF (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabodopsis dnd1* mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7819-7824.

Yu LM (1995). Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *92*, 4088-4094.

Zablackis E, Vreeland V, Doboszewski B & Laetsch WM (1991). Differential localization of carrageenan gelling sequences in *Kappaphycus alvarezii* var. *Tambalang* (Rhodophyta) with FITC-conjugated carrageenan oligosaccharides. J. Phycol. 27, 241-248.

Zhang S, Du H & Klessig DF (1998a). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitins from *Phytophthora* spp. Plant Cell 10, 435-449.

Zhan S & Klessig DF (1997). Salicylic acid activates a 48 kD MAP kinase in tobacco. Plant Cell. 9, 809-824.

Zhang S & Klessig DF (1998b). Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7433-7438.

Zhang Z, Collinge DB & Thordal-Christensen H (1995). Germin-like oxalate oxidase, a H_2O_2 -producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant J. 8, 139-145.

Zhou F, Zhang Z, Gregersen PL, Mikkelsen JD, Neergaard Ed, Collinge DB & Thordal-Christensen H (1998). Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. Plant Physiol. *117*, 33-41.

Zimmermann S, Frachisse JM, Thomine S, Barbier-Brygoo H & Guern J (1998). Elicitor-induced chloride efflux and anion channels in tobacco cell suspensions. Plant Physiol. Biochem. *36*, 665-674.

Zimmermann S, Nürnberger T, Frachisse JM, Wirtz W, Guern J, Hedrich R & Schell D (1997). Receptormediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2751-2755.

ANNEXE

Milieu de culture SFC

Solutions stocks :

1. Fer

Préparer 367 mg/l de sels sodium ferrique éthylène diamine acide tétra-acétique dans de l'eau distillée.

2. Phosphates

Préparer 50 mM de (NaH₂PO₄,H₂O) dans de l'eau distillée.

3. Nitrates

Préparer 1 M de NaNO₃ dans de l'eau distillée.

4. Métaux

-Préparer séparément des solutions de 14 mg/ml de (MnCl2, $4H_2O$), 1 mg/ml de ZnCl₂, 47 µg/ml de (COCl₂, $6H_2O$) et 0.04 µg/ml de (CuCl₂, $2H_2O$) dans de l'eau distillée.

-Un volume de 50 ml de chacune de ces solutions est ajouté à une solution de Na₂EDTA (4.36 g/l).

-Bouillir l'ensemble pendant 10 minutes.

-Ajouter 1 l d'eau distillée et ajuster le pH à 7.5.

-Filtration avec un filtre de 0.2 µm.

5. Vitamines

-Préparer séparément des solutions de biotine (0.5 mg/l), d'acide folique(1 mg/l), de thiamine B_1 (1.5 mg/l) et de B_{12} (0.5 mg/l) dans de l'eau distillée.

-1.25 ml de ces solutions est ajouté à 250 ml d'eau de mer filtrée à 0.2 μ m.

Un volume de 2 ml de chacune de ces 5 solutions stocks (Fer, Phosphates, Nitrates, Métaux et Vitamines) est ajouté à 1 litre d'eau de mer filtrée avec un filtre de 0.2 μm (milieu SFC).

ARTICLES

Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte. <u>Bouarab, K.</u>, Potin, P., Correa, J.A., and Kloareg, B. (1999). Plant Cell, Vol. 11, 1635-1650.

The filamentous green alga Acrochaete operculata is able to completely colonize the sporophytic phase of the red alga Chondrus crispus; however it does not penetrate beyond the outer cell layers of the gametophytic thalli. Given that the isomorphic life cycle phases of C. crispus differ in the sulfation pattern of the extracellular matrix (ECM) galactans (carrageenans) and because A. operculata filaments are shown to feature carrageenolytic activity, we investigated whether carrageenan fragments modulate the pathogenicity of the parasite. Consistent with the ECM composition of the hostsusceptible generation, -carrageenan oligosaccharides induced a release of hydrogen peroxide, stimulated protein neosynthesis, increased carrageenolytic activity, and elicited the induction of specific polypeptides in the pathogen, resulting in a marked increase in pathogenicity. In contrast carrageenan oligosaccharides, i.e., ECM fragments from the host-resistant generation, did not induce a marked release of H_2O_2 from A. operculata filaments, hindered amino-acid uptake and enhanced their recognition by the host, resulting in an overall reduction in pathogen virulence. Moreover, C. crispus sporophytes and gametophytes were shown to behave differently in their initial response to challenge with cell-free extracts of A. operculata. Gametophytes exhibited a large burst of hydrogen peroxide whereas a small only was release d from the sporophytes. The oxidative burst was abolished in the gametophytes by the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium, resulting in a marked increase in pathogen virulence. The oxidative burst in C. crispus gametophytes was stronger when extracts were prepared from A. operculata filaments previously elicited with -carrageenan oligosaccharides. No burst was observed when these gametophytes were challenged with extracts prepared from pathogen cultures previously incubated in the presence of -carrageenan oligosaccharides. This report on a marine algal pathosystem definitively shows that as occurs in terrestrial plants, ECM oligosaccharides mediate host-pathogen interactions.

Natural or Oligosaccharide-Primed Resistance to Acrochaete operculata is Associated with the Activation of the Shikimic Acid Pathway in the Marine Red Alga Chondrus crispus . <u>Bouarab, K.</u>, Kloareg, B, and Potin, P. (2000) Plant Cell (Submited).

The filaments of the green alga are able to completely colonise the sporophytic generation of the red alga, whereas they do not penetrate beyond the outer cell layers of the gametophytic plants. A. operculata infection induces an important accumulation of UV-fluorescent compounds in C. crispus gametophytes at the sites of attempted penetration by zoospores but no accumulation is observed in the susceptible sporophytic phase. C. crispus gametophytes exhibited a large burst of hydrogen peroxide when challenged by pathogen extracts whereas a small amount only was released from the sporophytes, the susceptible host life-history phase. Inhibition of the oxidative burst by diphenyleneiodonium, an inhibitor of the mammalian NADPH oxidase prevents the accumulation of UV-fluorescent compounds at the sites of attempted penetration by zoospores and also abolishes resistance to A. operculata invasion in C. crispus gametophytes. Glyphosate, an inhibitor of the shikimate pathway, repress the activity of the shikimate dehydrogenase in C. crispus and prevents the accumulation of UV-fluorescent compounds at the sites of infection, it also abolishs resistance to A. operculata in C. crispus gametophytes. Yet, alginate oligosaccharide elicitors can trigger an oxidative burst in the host susceptible sporophytic phase. The kinetics of H_2O_2 production takes place in a dosedependent manner with saturation at 500 mg/ml of alginate oligosaccharide concentration. **Remarkably**, alginate oligosaccharide elicitors induce a protection against A. operculata invasion in C. crispus sporophytes lasting for up to 7 days. Pretreatment with alginate oligosaccharides at a concentration of 150 mg/ml strongly reduces the infection rate and primes the accumulation of UVfluorescent compounds at the few sites of zoospore penetration in C. crispus sporophytes. This resistance and oxidative burst were locally induced by alginate oligosaccharides in C. crispus sporophytes. This study emphasizes the potential role of oligosaccharide signals in activating protection against pathogens in marine plants and possible mechanisms of induced resistance are discussed.

Convergent signal pathways are required for the establishment of resistance to the green algal pathogenic Acrochaete operculata in the marine red alga Chondrus crispus. <u>Bouarab, K.</u>, Kloareg, and Potin, P. (2000). (Will Submited).

Chondrus crispus gametophytes exhibit a diphenyleneiodonium-sensitive oxidative burst after challenge with cell-free extracts from its green algal pathogenic endophyte Acrochaete operculata (Bouarab et al., 1999). This response to pathogen elicitors can also be blocked by Ca^{2+} and anion channel blockers as well as with phospholipases A_2 and C inhibitors. The protein kinase inhibitors, staurosporine and genistein completely inhibited this oxidative burst in C. crispus gametophytes, whereas MAP kinase specific inhibitors, apigenin and PD 98059 did not compromise the building up of AOS. Staurosporine, apigenin and PD 98059 were shown to abolish the resistance to *A. operculata* in *C. crispus* gametophytes and inhibited the accumulation of UV-autofluorescent compounds at the site of attempted penetration by *A. operculata* zoospores. Moreover, salicylhydroxamic acid did not interfere with the oxidative burst, but, likely acting as a lipoxygenase inhibitor, abolished the resistance to *A. operculata*. These pharmacological inhibitor studies suggest that ion fluxes, activation of protein kinases and phospholipases control AOS production in *C. crispus* gametophytes, whilst pathogen recognition also likely induced convergent signal pathways downstream or independent from the oxidative burst leading to the establishment of resistance to *A. operculata*.

The Chondrus crispus-Acrochaete operculata host-pathogen association, a novel model in glycobiology and applied phycopathology. <u>Bouarab, K</u>., Potin, P., Correa, J.A., and Kloareg, B. (2000). J. Appl. Phycol. (submited).

We review here our ongoing research on the oligosaccharide signals involved in cell-cell recognition in the *Chondrus crispus-Acrochaete operculata* host-pathogen association. In this pathosystem, the host gametophytes are resistant to the pathogen, whereas the sporophytic generation is sensible to infection. We have shown that the virulence of the green algal pathogen is mediated by the recognition of carrageenan oligosaccharides released from its red algal host: kappa-carrageenan oligosaccharides inhibit *A. operculata* virulence while lambda carrageenan oligosaccharides enhance its pathogenicity (Bouarab et al., 1999). It appears that the recognition of *A. operculata* by *C. crispus* also involves an oligosaccharidic signal. This signal is present in the non-virulent form of the pathogen whereas it is absent from the virulent form. Altogether this pathosystem offers a novel, unique model to investigate the perception of oligosaccharide signals in plant-pathogen interactions. The possible applications of this research to develop new strategies for disease control in maricultured algal crops are discussed.

RESUME

Résumé

Chondrus crispus (Gigartinales, Rhodophycées) est une algue rouge qui se caractérise par un cycle de vie isomorphe, dans lequel le sporophyte (diploïde) et les gamétophytes (haploïdes) sont virtuellement identiques sur le plan morphologique. L'algue est exploitée pour la production industrielle des polysaccharides de sa paroi cellulaire, nommés carraghénanes, comme agents de texture. Le sporophyte contient des carraghénanes de type lambda, tandis que le gamétophyte contient exclusivement des carraghénanes de type kappa, dans l'épiderme et une partie du cortex et iota dans la deuxième partie du cortex ainsi que la medulla. L'endophyte algue verte *Acrochaete operculata* est capable d'envahir complètement la phase sporophytique de l'algue rouge, tandis qu'il ne pénètre pas dans la phase gamétophytique, au delà des premières couches de cellules.

Nos résultats montrent que les signaux oligosaccharidiques sont impliqués dans l'interaction *Chondrus crispus-Acrochaete operculata*. Nous avons montré que la virulence de l'algue verte pathogène est médiée par la reconnaissance des oligosaccharides libérés par son hôte : l'oligokappa-carraghénane inhibe la virulence d'A. *operculata* alors que l'oligolambda-carraghénane augmente sa pathogénicité. La reconnaissance d'A. *operculata* par *C. crispus* implique aussi des signaux oligosaccharidiques. Les événements de transduction du signal, incluant l'activation des phospholipases C et A2, des flux ioniques, des phosphorylations et déphosphorylations des protéines, de la NADPH oxydase, des MAP kinases et de la lipoxygénase, sont induits par cet oligosaccharide d'A. *operculata*. Ce signal apparaît être présent dans la forme non virulente du pathogène tandis qu'il est absent dans la forme virulente. Ce signal est aussi impliqué dans la régulation de la biosynthèse des composés fluorescents dans l'UV autour des sites de pénétration par les zoospores d'A. *operculata* chez les gamétophytes de *C. crispus*. Par ailleurs, les oligoalginates élicitent un burst oxydatif, induisent la résistance, une protection durable et l'accumulation de composés autofluorescents autour des sites d'infection par les zoospores d'A. *operculata* dans le sporophyte de *C. crispus*. Ces signaux oligosaccharidiques induisent la production de composés de type "mycosporines-like amino acids" et aussi de composés halogénés volatils chez *C. crispus*. Cette étude accentue le rôle potentiel des signaux oligosaccharidiques dans l'activation de la protection des plantes contre les agents pathogènes.

Mots clés : interactions plante-pathogène, oligosaccharides, signalisation, espèces activées de l'oxygène, composés autofluorescents, protection, réponses de défense, virulence, algue rouge, algue verte.

Abstract

C. crispus (Gigartinales, Rhodophyceae) is a marine red alga with an isomorphic life history, comprising morphologically similar haploid gametophytes and diploid sporophytes. The alga is exploited for the industrial production of its cell wall polysaccharides, known as carrageenans, which are used as texturing agents. *C. crispus* sporophytes synthesize lambda-carrageenans whereas the gametophytes have kappa-carrageenans in the medulla and inner cortex and iota-carrageenans in the outer cortex and the epidermis. The green algal endophyte *Acrochaete operculata* is able to completely invade the sporophytic phase of the red alga *Chondrus crispus*, whereas it does not penetrate beyond the outer cell layers of the gametophytic phase.

Our results show that oligosaccharidic signals are involved in cell-cell recognition in the *Chondrus crispus*-*Acrochaete operculata* host-pathogen association and mediate a cross talk between both partners. We have shown that the virulence of the green algal pathogen is mediated by the recognition of carrageenan oligosaccharides released from its red algal host: kappa-carrageenan oligosaccharides inhibit *A. operculata* virulence while lambda-carrageenan oligosaccharides enhance its pathogenicity. Recognition of *A. operculata* by *C. crispus* is shown to also involve an oligosaccharidic signal. The signal transduction events including phospholipases C and A2 activation, ion fluxes, phosphorylation and/ or dephosphorylation of proteins, NADPH oxidase, MAP kinases and lipoxygenase activation, are induced by this *A. operculata* oligosaccharide. This signal appears to be present in the non-virulent form of the pathogen whereas it is absent from the virulent form. This signal was also involved in the regulation of the UVfluorescent compounds at the sites of attempted penetration by *A. operculata* zoospores in *C. crispus*. gametophytes In the other hand, the alginate oligosaccharides elicit, an oxidative burst, induce the resistance, the protection and the accumulation of UV-fluorescent compounds biosynthesis around the infection sites by *A. operculata* zoospores in *C. crispus* sporophytes These oligosaccharidic signals induce the production of mycosporine-like amino acids and also halogenated volatile compounds in *C. crispus*. This study emphasize the potentiel role of oligosaccharidic signals in activating protection against pathogen in plants.

Key words: plant-pathogen interactions, oligosaccharides, signalisation, oxygen activated species, autofluorescent compounds, protection, defense responses, virulence, red alga, green alga.